韓資植誌 22(5) : 394~402(2009)
Korean J. Plant Res.

Pteris cretica 'Wilsonii'의 기내 식물체 재생에 미치는 배지구성물질의 영향 및 기외순화

신소림, 이철희*
충북대학교 응용생명환경학부 원예과학과

Medium Composition Affecting *In Vitro* Plant Regeneration and Acclimation of *Pteris cretica* 'Wilsonii'

So Lim Shin and Cheol Hee Lee*
Dept. of Horticultural Science,Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract. Adventitious shoots were induced from pinnae, petiole and rhizome in *Pteris cretica* 'Wilsonii' in order to develop the efficient mass propagation method, using *in vitro* culture. Only homogenized rhizome segments could regenerate young sporophytes. Efficient regeneration of multiple shoots was obtained on the one-eighth strength MS medium containing 1% sucrose, and 50 mg·L^{-1} NaH_2PO_4. To achieve higher rate of regeneration from rhizome segments, rhizome segments were exposed to growth regulators for 2 months and then subcultured on hormone-free medium. The greatest shoot regeneration was obtained by 1 μM kinetin with 5 μM NAA. BA was effective in formation of GGB (kind of meristems), but they showed low shoot regeneration rate. Plants obtained from present experiments were transplanted to examine good environmental conditions for acclimation. Juvenile plants obtained by the one-eighth strength MS medium showed highest survival rate and vigorous growth at the seedling stage.

Key words - fern, NaH_2PO_4, plant growth regulator, sporophyte, tissue culture

서 언

*Pteris cretica*는 아프리카, 남유럽, 아시아 등에 널리 분포하고 있으며, 초장은 약 15～50 cm 정도이고 석회가 섞인 알카리성 토양에서 잘 자란다. 재배가 용이하여 실내·외 조경 소재로 많이 쓰이며 다양한 품종들이 각기 독특한 잎의 모양을 하고 있어, 국제적으로 여러 나라의 원예시장에서 중요한 관상식물로 취급되고 있다. *P. cretica*는 알록큰봉의꼬리(*P. cretica* cv. *albolineata*) 등을 포함한 많은 품종이 있는데, 그 중 *P. cretica* 'Wilsonii'는 시원하게 뻗은 잎의 끝이 풍성하게 갈라져 있어 인기가 높다(Foster, 1984; Jones, 1987).

Pteris cretica 'Wilsonii'의 대량생산방법으로는 기내에서 전엽체를 대량으로 생산하여 기외 이식하여 식물체를 유도하는 방법들이 보고되어 있다(Lee, 2007; Shin 등, 2009). 그러나 *Pteris cretica*는 다른 양치식물과는 달리 전엽체의 생식기관 중 장란기가 형성되지 않고 무배생식으로 식물체를 형성하는 확률이 높으므로(Raghavan, 2005; Sheffield와 Laird, 1986), 전엽체를 배양할 때 전엽체 증식 보다는 유묘의 형성이 왕성한 특징이 있다. 따라서 *Pteris cretica* 및 *Pteris cretica*의 여러 품종들은 전엽체 증식보다 무배생식으로 형성된 식물체의 재분화를 통하여 유묘를 형성하는 것이 대량생산에 적합하지만, 아직 기내에서 *Pteris cretica* 'Wilsonii'의 식물체를 이용한 증식방법은 보고된 바 없다. 식물의 절편을 이용한 무성번식법은 동일한 형질을 가진 개체를 생산할 수 있는 장점이 있으며, 특히 조직배양을 통한 무성번식은 단시간에 다량의 동일형질 개체를 생산할 수 있는 장점이 있다. 기내에서 양치식물을 번식할 때, 배양 가능한 부위는 포복경 말단(Higuchi 등, 1987), 근경(Higuchi와 Amaki, 1989; Joung, 2005), 측

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

아(Thakur 등, 1998), 잎 절편(Salome 등, 1987; Joung, 2005), 엽병(Joung, 2005) 등이 있으며, 식물 종에 따라 부위별 재생능력이 각기 다른 것으로 알려져 있다. 또한 식물체 절편은 배양환경에 따라 분화력에 차이를 보이는데, 종에 따라 적정 sucrose의 농도와 생장조절물질 종류 및 처리농도 등 영양요구도가 각기 다른 것으로 알려져 있다(Kwa 등, 1991; Thakur 등, 1998; Ambrozic-Dolinsek 등, 2002; Fernandez와 Revilla, 2003). 따라서 조직배양을 통한 대량생산법을 구축하기 위해서는 각 종에 맞는 배양 재료 및 기내 배양환경을 구명하는 것이 매우 중요하다.

본 연구는 관상용으로 이용가치가 높아 수요가 증가할 것으로 예상되는 *P. cretica* 'Wilsonii'의 식물체를 이용한 대량번식체계를 구축하기 위하여 적정 접종재료를 선별하고, 유묘 절편으로부터 신초의 재생 및 재생된 식물체의 생육에 미치는 배지의 무기물, 비타민, sucrose, NaH_2PO_4 및 생장조절물질의 영향을 구명하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

기내 배양중인 전엽체에서 무배생식에 의하여 형성된 유묘를 1/2MS배지(sucrose 1%, 활성탄 0.05%, pH 5.8)에 1~2달 간격으로 계대 배양하여, 3~5 cm의 길이로 자랐을 때 실험재료로 사용하였다. 적정 배양재료를 탐색하기 위하여 Fig. 1과 같이 유묘를 엽신, 엽병, 근경으로 나누어 각각 메스로 곱게 다진 후, 배지에 접종하였으며, 뿌리는 실험재료로 사용하지 않았다. 배지의 무기물 및 비타민의 적정 농도를 구명하기 위하여 기본 MS배지의 무기질 및 비타민의 농도를 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2배로 조절하여 사용하였다. 이 실험의 결과로 밝혀진 적정 배지를 기본배지로 하여 다음 실험들을 진행하였다.

Fig. 1. Mature sprophyte of *Pteris cretica* 'Wilsonii' and sections of young sporophytes obtained from *in vitro* culture.

탄소원의 최적 농도를 탐색하기 위하여 sucrose의 농도를 0, 1, 2, 3, 4%로 조절하여 사용하였으며, 적정 NaH_2PO_4의 농도를 구명하기 위하여 각 50, 100, 200, 400 $mg \cdot L^{-1}$의 농도로 달리 첨가하여 배양하였다. 적정 생장조절물질의 종류 및 농도를 탐색하기 위하여 cytokinin 계열의 kinetin과 BA를 1, 2, 5, 10 μM로 단용처리 하거나, auxin 계열인 NAA와 IBA를 1, 2, 5 μM로 혼용처리 하였으며, 배양 8주 후 hormone free 배지로 이식하여 8주 동안 추가로 배양하였다.

모든 실험은 100 mL의 시험관에 활성탄 0.1%을 첨가한 배지 10 mL를 분주하여 사면배지를 만들어 사용하였으며, 유묘의 절편은 30 mg 접종하여 12주 동안 배양하였다. 단, 생장조절물질을 이용한 실험에서는 활성탄을 첨가하지 않았으며, 총 16주 동안 배양하였다. 배양환경은 25±1℃, 광주기는 형광등을 이용하여 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$에서 16시간으로 조절하였으며, 실험종료 후 생체중, 신초의 수와 길이, 엽수, 뿌리의 수와 길이를 조사하였다.

순화실험은 MS배지의 무기물 및 비타민 농도별 실험을 마치고 형성된 유묘를 이용하였다. 각 처리구별로 형성된 유묘를 9×14 cm 크기의 사각포트에 심은 후, 높은 습도를 유지하기 위하여 깔망 밑에 물을 채워 둔 40×55×27 cm 크기의 흰색 사각상자(리빙박스, 대우화학, Korea)에 담아 70% 차광의 비닐하우스에서 순화시켰다. 12주 후 유묘의 생존율, 생체중, 신초장, 엽폭, 엽장, 엽병장, 엽신장, 엽수, 근수, 근장, 근경장을 조사하였다.

결과 및 고찰

접종재료의 영향

P. cretica 'Wilsonii'의 유식물을 엽신, 엽병, 근경으로 나누어 배양한 결과, 근경에서만 식물체가 재생되었으며, 엽신과 엽병의 조직은 배양 중 모두 괴사하였다(Table 1). 양치식물은 잎, 엽병, 뿌리, 포복경 끝 및 근경 등 다양한 부위가 기내 조직배양을 통하여 식물체로 재생될 수 있는 것으로 알려져 있다(Camloh 등, 1992; Bertrand 등, 1999; Jeong과 Lee, 2006). 그러나 *P. cretica* 'Wilsonii'는 엽신과 엽병의 절편은 배양 중 모두 괴사하였으며, 근경에서도 식물체의 재생이 왕성하게 이루어지지 않아 다른 양치식물에 비하여 재분화 능력이 비교적 낮은 것으로 생각되었다.

Table 1. Effect of explant sources on shoot regeneration of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 12 weeks in culture

Explant sources	Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)
Pinnae			Dead			
Petiole			Dead			
Rhizome	0.24	8.8	1.68	4.2	2.8	0.6

Table 2. Effect of culture media on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 12 weeks in culture

Culture media	Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)
1/8MS	0.05a[z]	5.5a	1.20a	4.6a	3.0a	0.63a
1/4MS	0.03a	3.0ab	0.78ab	5.0a	3.0a	0.20b
1/2MS	0.02a	2.0b	0.72ab	3.2ab	2.5ab	0.15b
1MS	0.03a	1.0b	1.10ab	3.0ab	0.0b	-
2MS	0.01a	1.0b	0.60b	1.0b	0.0b	-

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

P. cretica 'Wilsonii'의 근경 절편은 배양 약 2주 후에 분화가 시작되었으며, 4주 후에는 기관형성을 모두 마치는 것이 확인되었다. 그러나 총 12주의 배양기간 동안 신초와 뿌리의 길이생장이 왕성하지는 않았으므로, 절편의 기관형성 후에는 다른 배지로 이식하여 배양하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

배지의 무기물 및 비타민 농도의 영향

MS배지의 무기물 및 비타민의 농도를 1/8～2배 수준으로 조절하여 배양한 결과, 1/8MS배지에서 신초 재생 및 생육이 가장 우수하였다(Table 2). 배지에 첨가한 무기물 및 비타민의 농도가 높아질수록 신초의 재생 및 생육이 억제되었으며, 고농도의 무기물 및 비타민이 첨가된 배지에서는 근경조직의 기관형성능력이 현저히 억제되어 식물체로 분화되지 못한 유조직이 많이 형성되었다.

일반적으로 MS 기본배지에 함유된 고농도의 무기물은 양치식물의 식물체 조직으로부터 식물체의 재생(Teng, 1997; Thakur 등, 1998; Joeng과 Lee, 2006) 및 재생된 식물체의 형태발달을 억제하는 경향을 보인다(Garcia와 Furelli, 1987). 따라서 다양한 종류의 양치식물에서 1/2MS (Thakur 등, 1998; Joeng과 Lee, 2006) 또는 1/4MS배지 (Higuchi 등, 1987; Bertrand, 1999)와 같이 무기물 함량이 낮은 배지가 배양한 적합한 것으로 제시되었다. 본 연구에서 *P. cretica* 'Wilsonii'의 근경 절편은 기존에 제시된 배지보다 무기물의 함량이 더 낮은 1/8MS배지에서 신초 재생이 가장 왕성하였다. 따라서 차후 MS배지에 비하여 첨가되는 무기물 및 비타민의 종류가 적고 첨가 농도가 낮은 knop 또는 hyponex배지 등에서의 배양을 시도할 필요가 있는 것으로 생각된다.

Sucrose 농도의 영향

1/8MS배지의 sucrose 함량을 0～4%로 조절하여 배양한 결과 1% 첨가구에서 신초의 재생이 가장 왕성하였으며, 첨가량이 증가할수록 신초의 재생 및 생육이 억제되는 경향을 보였다(Table 3) 다른 양치식물의 절편 배양에 관한 연구(Wetmore, 1953; Thakur 등, 1998; Jeong과 Lee, 2006)에서도 1～2%의 sucrose가 포자체 재생에 효과적인 것으로 나타나 본 연구의 결과와 일치하였다. 결론적으로 *P. cretica* 'Wilsonii' 근경의 절편은 낮은 농도의 sucrose를 첨가하는 것이 식물체 재생을 촉진하는데 효율적이었으며, 재생된 유묘의 생육에도 양호하였다.

한편, sucrose를 첨가하지 않거나 1% 정도의 낮은 농도

Table 3. Effect of sucrose concentrations on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 12 weeks in culture

Sucrose (%)	Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Prothallus wt. (mg)
0	0.07b[z]	3.6bc	1.06c	1.0b	1.0b	1.08a	33a
1	0.72a	8.0a	2.38a	4.2a	4.0a	1.16a	3b
2	0.15b	6.0ab	1.76b	3.8a	2.6ab	5.34a	0b
3	0.03b	5.0ab	1.58b	2.8a	2.4ab	0.72a	0b
4	0.02b	1.7c	0.97c	1.3b	1.3b	0.33a	0b

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 4. Effect of NaH_2PO_4 concentrations on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 12 weeks in culture

NaH_2PO_4 ($mg \cdot L^{-1}$)	Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Prothallus wt. (mg)
0	0.05b[z]	5.0b	1.10a	2.4a	1.2a	0.30a	3
50	0.09a	9.7a	0.86b	1.4ab	1.6a	0.30a	0
100	0.02c	2.3c	0.40c	1.2b	1.0a	0.25a	0
200				Dead			
400				Dead			

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

로 첨가한 처리구에서는 무포자 생식에 의해 소량의 전엽체가 형성되었다. 무포자 생식에 의한 전엽체 형성은 다른 종에서도 나타나는데, *Asplenium nidus*의 식물체는 다져서 배양했을 때 절편의 일부 세포에서 전엽체가 재생되었다(Fernandez 등, 1993). 무포자 생식에 관여하는 기작과, 배양환경에 관한 연구는 아직 정확하게 이루어지지 않은 것으로 알려져 있으나(Fernandez와 Revilla, 2003), Teng과 Teng(1997)은 *Platycerium bifurcatum* 잎을 이용한 식물체 재생에 관한 연구에서 100개 이하의 세포로 이루어진 작은 잎의 절편은 무포자 생식에 의하여 전엽체로 발달하는 경향이 높다고 하였다.

NaH_2PO_4 공급량의 영향

1/8MS배지에 NaH_2PO_4를 첨가하여 배양한 결과, 50 $mg \cdot L^{-1}$의 첨가구에서 신초가 가장 왕성하게 재생되었다(Table 4). 일반적으로 배지에 첨가된 NaH_2PO_4는 양치식물의 포복경 끝이나 근경조직으로부터 재생된 식물체의 생장을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Paek 등, 1984; Garcia와 Furelli, 1987). 그러나 *P. cretica* 'Wilsonii'의 근경 절편의 경우 NaH_2PO_4가 오히려 유묘의 생육을 억제시키는 것으로 나타났으며, 200 $mg \cdot L^{-1}$ 이상의 첨가구에서는 절편이 모두 괴사하였다. 따라서 소량의 NaH_2PO_4를 첨가하여 식물체 재생을 촉진시킨 후, NaH_2PO_4가 첨가되지 않은 배지로 이식하여 유묘를 배양해야 할 것으로 생각된다.

생장조절물질의 영향

배양 절편으로부터 신초의 재생을 촉진하기 위하여, BA와 kinetin을 단용으로 첨가하거나 NAA 또는 IBA와 혼용 첨가한 1/8MS배지에 곱게 다진 근경의 절편을 8주 동안 배양하였다. 그 결과 생장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서는 절편에서 식물체가 분화되었으나, 생장조절물질 첨가구에서는 대부분 식물체로 바로 분화되지 않고 분열조직인 GGB(green globular body)가 형성되었다. GGB는 형태적으로 캘러스와 유사하며, 기능적으로는 어린 싹의 기

원체(shoot primordia)들이 뭉쳐져 있는 분열조직의 일부이다(Bertrand 등, 1999; Fernandez와 Revilla, 2003). 또한 소량으로도 많은 수의 식물체로 재생이 가능하여 대량생산을 위해 매우 유용한 조직으로 알려져 있다(Fernandez 등, 1996a; Fernandez 등, 1996b).

형성된 GGB로부터 유묘의 분화를 유도하기 위하여 8주 동안 형성된 GGB와 유묘 및 근경의 절편을 생장조절물질은 첨가하지 않고 활성탄을 0.1% 첨가한 1/8MS배지로 이식하여 8주 동안 추가로 배양하였다. 연구의 결과, 절편에서 신초의 분화를 촉진하기 위해서는 kinetion이 BA 보다 효과적이었으며, BA와 kinetin 모두 단용 첨가 보다는 auxin계 호르몬인 NAA 또는 IBA와 혼용첨가 하였을 때 근경 절편으로부터 신초의 분화가 촉진되었다(Table 5-8). 그러나 BA와 kinetin 첨가구에서 공히 5 μM 이상을 첨가

Table 5. Effect of growth regulators on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 16 weeks in culture

Growth regulator (μM)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	GGB wt. (mg)
BA	NAA							
0	0	0.10a[z]	5.8bc	1.44a	6.8a	6.6a	1.38a	0b
1	0	0.08a	3.5c	0.66b	1.6c	0.2b	0.40a	22a
	1	0.05a	9.3a	0.68b	2.4bc	0.0b	-	22a
	2	0.03a	4.0c	0.36cd	1.8c	0.6b	0.67a	7b
	5	0.12a	6.5abc	0.36cd	3.6b	0.0b	-	23a
2	0	0.05a	5.0c	0.78b	2.1c	0.0b	-	14ab
	1	0.06a	8.5ab	0.58bc	3.1b	0.0b	-	0b
	2	0.09a	4.0c	0.66b	1.8c	1.0b	0.95a	4b
	5	0.05a	3.0c	0.30d	1.3c	0.0b	-	13ab

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.
Explants cultured on all the media containing 5, 10 μM BA were dead.

Table 6. Effect of growth regulators on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 16 weeks in culture

Growth regulator (μM)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	GGB wt. (mg)
BA	IBA							
0	0	0.10c[z]	5.8b	1.44a	6.8a	6.6a	1.38a	0c
1	0	0.04c	4.5c	0.42cd	3.4bc	0.0c	-	8b
	1	0.07c	12.0a	0.82b	4.4b	0.6bc	0.10b	6b
	2	0.03c	2.5cd	0.50cd	2.5bc	0.0c	-	5b
	5	0.47a	3.5cd	0.46cd	3.6bc	1.2bc	0.33b	58b
2	0	0.05c	5.0bc	0.62bc	2.8bc	1.4b	0.10b	5b
	1	0.04c	3.5cd	0.28d	1.8c	0.0c	-	4b
	2	0.04c	3.0cd	0.40cd	2.3c	0.3bc	0.10b	10b
	5	0.19b	0.0d	-	0.0d	-	-	192a

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.
Explants cultured on all the media containing 5, 10 μM BA were dead.

하는 경우 절편체가 고사하는 경향을 보였다.

BA 첨가구에서는 BA 1 μM와 옥신(NAA, IBA) 1 μM을 각각 혼용하여 첨가하는 것이 신초의 분화에 가장 효과적이었다(Table 5-6) 특히 BA와 IBA를 1 μM 씩 혼용첨가할 때 식물체의 분화가 가장 왕성하였으며, 무첨가구보다 각각 1.6, 1.7배 많은 신초가 재생되었다. BA 첨가구에서는 옥신의 첨가에 관계없이 다량의 GGB가 유도되었는데, BA에 의하여 형성된 GGB는 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지로 이식되어도 대부분 유묘로 분화하지 못하는 경향을 보였다.

일반적으로 생장조절물질의 처리는 외식편의 기관형성에 영향을 미치며, 특히 배지 내 미량의 cytokinin 첨가는 양치식물 외식편의 기관형성을 촉진하는 경향을 보인다. 그러나, 일부 양치식물은 BA가 첨가된 배지에서 장기간 식물체 절편을 배양할 경우 절편이 괴사할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(Fernandez 등, 1996b; Fernadez와 Revilla,

Table 7. Effect of growth regulators on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 16 weeks in culture

Growth regulator (μM)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	GGB wt. (mg)
Kinetin	NAA							
0	0	0.10ab[z]	5.8b	1.44a	6.8a	6.9a	1.38a	0
1	0	0.03c	8.5b	0.58b	3.0bc	0.6d	0.87a	0
	1	0.01c	2.5b	0.62b	3.0bc	0.0d	-	0
	2	0.07bc	7.0b	0.80b	3.0bc	4.2b	1.60a	0
	5	0.15a	23.5a	1.16a	4.6b	2.4c	1.25a	0
2	0	0.01c	5.5b	0.73b	3.0bc	0.3d	0.70a	4
	1	0.02c	2.5b	0.48b	1.4c	0.8cd	0.90a	0
	2	0.02c	3.0b	0.57b	3.0bc	0.0d	-	0
	5	0.03c	4.0b	1.23a	3.3b	1.3cd	0.73a	0

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.
Explants cultured on all the media containing 5, 10 μM kinetin were dead.

Table 8. Effect of growth regulators on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' after 16 weeks in culture

Growth regulator (μM)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	GGB wt. (mg)
Kinetin	IBA							
0	0	0.10ab[z]	5.8b	1.44a	6.8a	6.6a	1.38c	0
1	0	0.03c	9.0b	0.74de	4.2bc	0.0c	-	0
	1	0.09abc	6.0b	1.00c	4.2bc	2.8b	3.46ab	0
	2	0.11a	16.5a	0.98cd	4.0bc	1.2b	1.18c	0
	5	0.09abc	7.5b	1.22ab	4.4bc	2.0b	4.58a	0
2	0	0.04bc	7.0b	0.70e	3.8bc	0.0c	-	0
	1	0.07abc	6.3b	1.14bc	5.4ab	2.6b	1.50c	10
	2	0.09abc	7.3b	1.34ab	3.8bc	2.0b	2.74b	0
	5	0.11a	10.0b	1.44a	3.0c	2.6b	2.84b	0

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.
Explants cultured on all the media containing 5, 10μM kinetin were dead.

2003). 본 연구에서는 1～2 μM의 BA를 첨가할 때는 절편이 괴사하지 않고 오히려 무첨가구나 kinetin 첨가구 보다 많은 양의 GGB를 형성하였으나, BA 첨가구에서 형성된 GGB는 신초 분화율이 매우 낮았다. 따라서 차후 BA 첨가구에서 유도된 *P. cretica* 'Wilsonii'의 GGB에서 유묘를 효과적으로 분화시킬 수 있는 배양조건을 구명할 필요가 있다고 생각된다.

Kinetin 첨가구에서는 auxin을 혼용하여 첨가하는 것이 신초 분화에 효과적이었다(Table 7-8). 절편으로부터 식물체의 분화는 kinetin 1 μM과 NAA 5 μM 혼용 첨가구에서 가장 왕성하였으며, 30 mg의 근경 절편에서 약 23개의 신초가 형성되어 무첨가구에 비하여 4배 정도 높은 재생률을 보였다(Table 7). Kinetin과 IBA를 혼용할 경우 kinetin 1 μM과 IBA 2 μM을 혼용 첨가할 때 신초 재생이 가장 왕성하였다(Table 8). IBA는 NAA에 비하여 신초의 재생 효과는 낮았으나, IBA 첨가구에서 형성된 신초 및 뿌리의 길이생장이 촉진되었다.

한편, 모든 처리구에서 신초 및 뿌리의 길이생장은 생장조절물질 무첨가구에서 가장 왕성하였다. 이는 무첨가구에서는 근경 절편의 대부분이 GGB를 형성하지 않고 식물체로 직접 분화되어 신초를 형성하기 때문에 배양 8주 이내에 신초가 형성되고 길이생장을 하지만, 생장조절물질 처

Table 9. Effect of culture media on *ex vitro* growth of *Pteris cretica* 'Wilsonii' sporophytes after 12 weeks in acclimation

Culture media	Survival rate (%)	Total fresh wt. (g)	Plant height (cm)	Plant width (cm)	Frond length (cm)	Blade length (cm)	Stipe width (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Rhizome length (cm)
1/8MS	100.0	0.56a[z]	6.56a	7.08a	7.22a	3.02a	4.20a	9.6a	10.0a	7.62a	0.22a
1/4MS	87.5	0.40b	5.06b	5.90a	5.50b	2.40b	3.10b	8.2ab	10.0a	4.78ab	0.20a
1/2MS	50.0	0.19c	4.56b	4.08b	5.22b	1.44c	3.78ab	6.4b	7.6a	4.20b	0.20a
MS						Dead					
2MS						Dead					

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

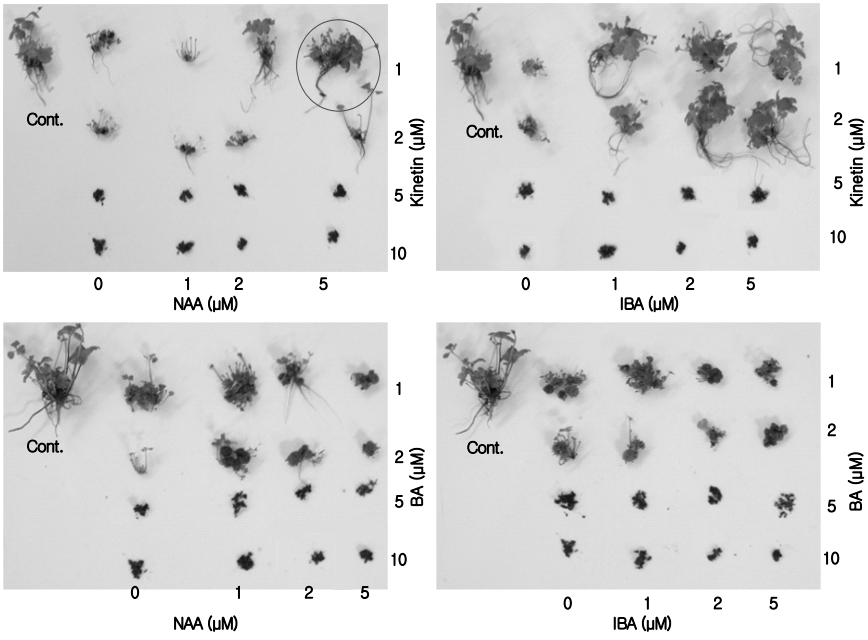

Fig. 2. Cultural response of rhizome segments of *Pteris cretica* 'Wilsonii' cultured on 1/8MS media containing different growth regulators.

리구에서는 초기 배양 후 8주 동안은 근경의 절편이 GGB로 분화되고 그 후 GGB로부터 신초가 분화되어 길이생장하기 때문에 신초의 길이생장에 소요되는 시간이 무첨가구에서 형성된 유묘보다 짧기 때문으로 생각되었다.

기외순화

배지 종류별로 배양하여 형성된 유묘를 사각포트에 이식하여 12주 동안 순화한 결과, 1/8MS배지에서 재생된 식물체는 모두 생존하였으며, 생육도 왕성하였다(Table 9). 그러나 MS와 2MS배지에서 형성된 유묘는 모두 고사하였다. 이는 MS와 2MS배지에서 형성된 유묘의 뿌리 발달이 미약하였기 때문으로 생각되었다(Table 2). 가시오가피 체세포배에서 분화된 식물체를 기외로 순화한 결과, 잎과 뿌리의 분화가 저조하고 2.5 cm보다 작은 유묘는 생존율이 극히 낮았다고 한다(Lee와 Yu, 2002). 본 연구에서도 생존율이 낮았던 MS와 2MS에서 형성된 유묘는 기외에 이식할 당시 크기가 1 cm 이하였으며, 잎과 뿌리의 분화 및 생육이 저조하였다. 따라서 기내 배양한 유묘를 기외로 순화할 때에는 2～3 cm 이상의 크기로 자라고 뿌리와 잎의 생육이 건실한 개체를 골라 이식하고, 그보다 크기가 작은 개체는 계대배양하여 생육을 증가시킬 후 순화시켜야 할 것으로 생각되었다.

적 요

기내배양을 이용하여 *Pteris cretica* 'Wilsonii'의 효율적인 대량번식법을 개발하기 위한 목적으로 근경, 엽신 및 엽병조직으로부터 식물체 재분화를 유도하였다. 그 결과, 균질화된 근경의 절편에서만 신초가 재생되었다. 식물체 재분화를 유도하는데 적합한 배지는 1%의 sucrose와 50 $mg \cdot mL^{-1}$의 NaH_2PO_4를 첨가한 1/8MS배지였다. 근경 절편으로부터 식물체의 재생을 촉진하기 위하여 생장조절물질이 첨가된 배지에서 2달 동안 절편을 배양한 후, 생장조절물질을 첨가하지 않은 배지로 이식한 결과, 1μM의 kinetin과 5 μM의 NAA를 혼용첨가한 처리구에서 신초의 재생이 가장 왕성하였다. BA 첨가구에서는 분열조직의 일종인 GGB가 다량 유도되었으나, 형성된 GGB에서 신초 재생율은 낮은 것으로 나타났다. MS배지의 적정 무기물 및 비타민의 농도를 구명하는 실험을 마친 뒤, 형성된 유묘를 이용하여 기외순화 시킨 결과, 1/8MS배지에서 형성된 유묘가 생존율이 가장 높았으며, 생육 또한 왕성하였다.

사 사

본 연구는 산업자원부·한국산업기술평가원지원의 지역협력 연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

Ambrozic-Dolinsek J., M. Camloh, B. Bohanec, and J. Zel. 2002. Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platycerium bifurcatum*). Plant Cell Rep. 20:791-796.

Bertrand, A.M., M.A, Albuerne, H. Fernandez, A. Gonzalez, and R. Sanchez-Tames. 1999. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57:65-69.

Camloh, M. and N. Gogala. 1992. *In vitro* culture of *Platycerium bifurcatum* gametophytes. Sci. Hort. 51:343-346.

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. 1996a. 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. Sachez-Tames. 1996b. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44:261-265.

Fernandez, H. and M.A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73:1-13.

Foster, F. G. 1984. Ferns to Know and Grow. Timber Press, Inc., New York. pp. 172-174.

Garcia, E. and L. Furelli. 1987. Clonal mass propagation of the fern *Cyrtomium falcatum*. Acta Hort. (ISHS) 212:655-660.

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.

Jeong, J.A. and C.H. Lee. 2006. Effects of medium composition on plant regeneration in *Asplenium incisum* Thunb. J. Kor. Flower Res. Soc. 14:176-185. (in Korean)

Jones, D.L. 1987. Encyclopaedia of ferns. Timber press, North America.

Joung, J.A. 2005. *In vitro* masspropagation and mutation breeding of Pteridophyta native to Korea. Ph.D. Diss., Chungbuk Natl. Univ., Cheongju. (in Korean)

Kwa, S.H., Y.C. Wee, and C.S. Loh. 1991. Production of aposporous gametophytes and calli from *Pteris vittata* L. pinnae strips cultured *in vitro*. Plant Cell Rep. 10:392-393.

Lee, S.H. and C.T. Yu. 2002. Effect of genotype and explant on somatic embryogenesis and acclimatization of *Acanthopanax senticosus*. Kor. J. Med. Crop Sci. 10:217-221. (in Korean)

Lee, Y.H. 2007. Masspropagation of Korea green native ferns *in Vitro* for developing materials of interior landscape architecture. J. Kor. Soc. People plants Environ. 10:65-73. (in Korean)

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. (in Korean)

Raghavan, V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes. Cambridge Univ. Press. New York.

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.

Sheffield, E. and S. Laird. 1986. Antheridia and archegonia of the apogamous fern *Pteris cretica*. Ann. Bot. 57:139-143.

Shin, S.L., J.K. Hwang, and C.H. Lee. 2009. Medium composition affecting *In Vitro* masspropagation and morphogenesis in prothalli of *Pteris cretica* 'Wilsonii'. Flower Res. J. 17:114-120. (in Korean)

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.

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 suspension culture. Plant Cell Rep. 16:820-824.

Wetmore, R.H. 1953. Carbohydrate supply and leaf development in sporeling ferns. Science 118:578.

(접수일 2009.2.27; 수락일 2009.8.12)