

개고사리의 기내 포자체 재생에 미치는 배지구성물질 및 배양방법의 영향

신소림, 이철희*

충북대학교 응용생명환경학부 원예과학과

Effect of Medium Components and Culture Methods on Shoots Regeneration from *Athyrium niponicum*

So Lim Shin and Cheol Hee Lee*

Department of Horticultural Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract - Present studies are carried out to find media components and culture methods for *in vitro* propagation of *Athyrium niponicum* and to establish the optimal economic masspropagation systems. Among pinnae, petiole and rhizome segments only rhizome segments produced young plants. Rhizome segments showed vigorous plant regeneration on 1/2MS medium and supplement to 1% sucrose and 50 mg · L⁻¹ NaH₂PO₄ were promoted the plant regeneration from rhizome segments. Kinetin was better than BA for plant regeneration and combination with 2 μM kinetin and 5 μM IBA was most efficient for plant regeneration. Solid or liquid medium with or without 0.1% activated charcoal in modified 1/2MS medium (1% sucrose, 50 mg · L⁻¹ NaH₂PO₄, 2 μM kinetin, 5 μM IBA, pH 5.8) were used to find the optimal culture methods. The plant regeneration from rhizome segments were most vigorous on solid medium without activated charcoal. The addition of activated charcoal were inhibited the plant regeneration from rhizome segments not only on solid medium but also liquid stationary or suspension culture.

Key words - Activated charcoal, IBA, Kinetin, NaH₂PO₄, Stationary culture, Suspension culture

서 언

개고사리[*Athyrium niponicum*(Mett.) Hance]는 우드풀과(Woodsiaceae)에 속하는 중형 양치식물로 조경 및 분화용 소재로 인기가 높으며, 최근에는 잎 추출물에서 항균, 항산화 활성이 밝혀져 건강 기능성 식물 소재로 인정받고 있다(Kim, 2003).

개고사리는 자연 돌연변이가 많이 발생하여 생육 환경에 따라 잎 가운데에 회색, 보라색, 연녹색의 무늬가 형성되기 때문에 영미권에서는 Japanese painted fern이라고 불리며(Foster, 1984), 무늬종은 일반 종에 비하여 고가로 거래된다. 그러나 유성번식 할 경우 이 형질이 후대로 고정되지 않는 경우가 있으므로 무성번식을 통한 대량번식법을

구축할 필요가 있다. 일반적으로 양치식물의 무성번식은 근경을 잘라 번식하는 근경삽이 주로 이용되고 있으나, 증식율이 낮아 대량생산에 한계가 있으므로 조직배양을 통한 동일 개체 대량생산법 구축이 시급하다.

양치식물의 포자체는 포복경 말단(runner tip) (Higuchi *et al.*, 1987), 근경(Higuchi and Amaki, 1989; Joung, 2005), 측아(side shoot) (Thaker *et al.*, 1998), 잎과 엽병(Joung, 2005) 등 다양한 부위가 포자체로 재생될 수 있으나, 식물에 따라 부위별 분화능이 다르므로 각 식물에 적합한 배양 부위를 구명하는 것이 중요하다. 또한 양치식물의 일부 기관은 절편을 배양하는 동안 절단면에서 분화가 시작되지 않고 잘려진 절편이 길이생장을 하는 경우도 있으므로, 기관의 절편을 그대로 치상하는 것 보다는 곱게 다져서 배양하는 것이 포자체 증식을 촉진하는데 유용한 것으로 알려져 있다(Joung, 2005).

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

일반적으로 양치식물은 영양물질의 농도가 낮은 배지에서 재분화가 왕성한 것으로 알려져 있으나(Camloha and Gogala, 1992; Higuchi and Amaki, 1989; Thakur *et al.*, 1998; Teng and Teng 1997), 종에 따라 무기물과 탄소원 등 영양물질의 요구도가 다르며, 배지구성물질의 종류 및 첨가량에 따라 식물체 분화능 및 분화된 식물의 형태 형성이 민감하게 반응하므로 절편의 분화능을 촉진시킬 수 있는 배지구성물질의 종류와 적정 첨가량을 구명하는 것이 매우 중요하다(Garcia and Furelli, 1987).

따라서 본 연구는 실내의 조경 및 기능성 천연소재로 수요가 많은 개고사리의 적정 대량생산방법을 개발하기 위하여 포자체 분화능이 우수한 개고사리의 부위를 선별하고, 개고사리의 절편으로부터 포자체의 분화를 촉진시킬 수 있는 적정 배지구성물질의 종류와 첨가량을 조사한 다음 적정 배지로부터 포자체의 분화를 촉진시킬 수 있는 효율적인 배양방법을 구명하기 위하여 시행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

연구에 사용한 개고사리는 기내에서 포자번식하여 발생한 유묘를 사용하였다. 강원도 인제군에서 채집한 다음 충북 청주시의 무가온 온실에서 재배한 개고사리의 포자엽을 음건하여 포자를 수집하였다.

파종하기 전 포자를 100 μM 의 sieve로 걸러 불순물을 제거한 다음 증류수에 24시간동안 침지하여 수분을 흡수시켰다. 포자가 담긴 현탁액은 15 cm의 원심분리용 튜브로 옮긴 후, 원심분리기(MF 80, 한일과학, Korea)를 이용하여 2000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 상정액을 제거하였으며, sodium hypochlorite 1.5%를 첨가하여 10분 동안 살균하였다. 살균 후 다시 원심분리하여 sodium hypochlorite를 제거한 뒤 멸균수로 5회 세척해 주었다. 포자는 2 mL의 멸균수와 함께 기본 MS배지에 파종하였으며, 11일 후 전엽체가 발아하기 시작하였다.

기내 포자발아로 형성된 전엽체로부터 유성생식으로 발생한 개고사리의 유묘를 2-3달 간격으로 계대배양한 다음 3-5 cm정도로 성장한 균일묘를 재료로 사용하였다.

적정 접종 부위 선별

적정 배양 부위를 구명하기 위하여 유묘를 엽신, 엽병

및 근경으로 나누어 메스로 곱게 다져 배양하였다. 연구에 사용한 기본 배지는 변형 1/2MS배지(sucrose 3%, 활성탄 0.05%, pH 5.8)를 기본 배지로 하여 100 mL의 test tube에 10 mL씩 분주한 다음 사면배지를 만들어 사용하였다.

배지구성물질의 종류 및 농도에 따른 영향

배지 내 무기물 및 비타민의 적정 첨가 농도를 구명하기 위하여 변형 MS배지(sucrose 3%, 활성탄 0.05%, pH 5.8)의 무기질 및 비타민의 농도를 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2배로 조절하여 사용하였다.

상기의 연구에서 구명된 적정 배지의 조건에서 탄소원 및 NaH_2PO_4 의 적정 첨가량을 구명하기 위하여 sucrose는 0, 1, 2, 3, 4%, NaH_2PO_4 는 0, 50, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 조절하여 배양하였다.

생장조절물질의 종류 및 첨가농도가 포자체 재생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 활성탄을 첨가하지 않은 1/2MS 배지에 kinetin과 BA를 1, 2, 5, 10 μM 로 단용 처리하거나, 1, 2, 5 μM 의 NAA 또는 IBA와 혼용첨가 하였으며, 배양 8주 후 포자체의 분화를 촉진하기 위하여 생장조절물질을 넣지 않고 활성탄을 0.1% 첨가한 배지로 이식하여 8주 동안 배양하였다.

배양방법 및 활성탄의 영향

포자체 재생에 미치는 배양방법 및 활성탄의 영향을 알아보기 위하여 상기의 연구결과에서 개고사리의 포자체 증식에 가장 적합한 것으로 나타난 배지 구성물질의 조합으로 배지를 조성한 다음 이를 고체배지 또는 액체배지로 만들어 배양하였으며, 액체배지는 정지배양하거나 100 rpm으로 현탁배양하였다. 이 때, 배양용기는 75 mL의 삼각플라스크를 이용하였으며, 배지는 30 mL씩 분주한 다음 메스로 균질화한 근경의 절편을 90 mg씩 접종하여 8주 동안 배양하였다. 이 때 각 배지에 활성탄을 첨가하지 않거나 0.1% 첨가하여 활성탄이 개고사리 포자체의 재생에 미치는 영향을 구명하였다.

배양조건 및 조사방법

배양기간 동안 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기는 형광등을 이용하여 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 16시간으로 조절하였다. 8주 또는 16주 동안 배양한 다음 형성된 포자체의 총 생체중, 신초의 수와 길이, 엽수, 뿌리의 수와 길이를 조사하였으며

유묘의 생육단계에 따라 근경의 길이신장이 이루어진 경우에는 근경의 길이를 측정하였다. 또한 양치식물의 분열조직인 GGB(green globular body)와 무포자생식에 의한 전엽체가 형성된 경우에는 생체중을 조사하였으며, 형성된 전엽체는 해부현미경(SMZ-U, Nikon, Japan) 및 video microscope(EGVMS 35, EG Tech, Korea)로 형태 및 생식기관의 형성을 관찰하였다. 모든 실험은 5반복 이상으로 수행하였으며, SAS version 9.1(SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 평균과 표준오차를 구하였다.

결과 및 고찰

적정 접종 부위 선발

기내에서 형성된 개고사리의 포자체를 엽신, 엽병, 근경으로 나누어 다져서 활성탄 0.1%가 첨가된 1/2MS배지에 배양한 결과 근경 절편에서 식물체 재생이 가장 왕성하였으며, 12주의 배양기간 동안 포자체로 미처 분화되지 못한 분열조직인 GGB(green globular body)와 소량의 전엽체도 형성되었다(Table 1). 엽신과 엽병 절편에서는 무포자

생식(apospory)에 의하여 전엽체가 생성되었으나, 포자체는 형성되지 않았다. 개고사리의 엽신, 엽병 및 근경의 절편으로부터 무포자생식으로 형성된 전엽체는 포자발아로 얻어진 전엽체와 형태적 차이는 나타나지 않았다(data not shown).

일반적으로 분열조직인 GGB는 성장조절물질을 첨가한 배지에서 배양된 절편에서 형성되는 것으로 알려져 있으나(Fernandez and Revilla, 2003), 개고사리 근경의 절편은 hormone free 배지에서도 절편이 GGB의 형태로 재생된 후, 포자체로 분화하는 특징을 보였다.

MS배지의 무기물 및 비타민의 적정 첨가량 구명

MS배지의 무기물 및 비타민의 농도를 1/8~2배 수준으로 조절하여 배양한 결과, 1/2MS배지에서 포자체 재생이 가장 왕성하였다. 그러나 1/2MS배지보다 영양물질의 농도가 높거나 낮은 경우는 포자체로 분화되지 못한 GGB가 많이 발생하였다(Table 2). 따라서 개고사리 근경의 절편은 성장조절물질의 첨가 없이도 GGB의 형태로 재생되었다가 배양환경이 적절한 경우, 포자체로 분화되는 것으로 판단

Table 1. Effect of explant sources on shoot regeneration and prothallus formation of *Athyrium niponicum* after 12 weeks in culture

Explant sources	Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Prothallus wt. (mg)	GGB wt. (mg)
Blade	1.07a ^z	0.0	0.0	0.0	0.0	1071a	0
Stipe	0.66a	0.0	0.0	0.0	0.0	662b	0
Rhizome	0.29a	13.8	4.8	1.7	0.0	30c	33

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 2. Effect of culture media on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* 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)	Prothallus wt. (mg)	GGB wt. (mg)
1/8MS	0.13a ^z	4.5bc	0.43b	3.6a	0.0	-	30a	134ab
1/4MS	0.19a	2.8bc	1.13ab	3.3a	0.8	1.1	26a	141ab
1/2MS	0.29a	14.5a	1.65a	4.6a	0.0	-	33a	32b
1MS	0.21a	5.3b	1.35ab	4.5a	0.0	-	53a	160ab
2MS	0.17a	0.0c	-	0.0b	0.0	-	0b	171a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

되었다. 1/2MS배지에서는 GGB의 포자체 분화 능력이 촉진되어 작은 크기의 GGB에서 다수의 포자체가 분화되었으나, 배지의 영양물질 농도가 낮을 경우, GGB의 일부가 포자체로 분화되었으나 그 비율이 낮았다. 한편 2MS배지에서 형성된 GGB는 12주의 배양기간 동안 포자체로 분화되지는 못하였으나, GGB의 생육상태는 1/8MS배지에서 형성된 GGB보다 우수하였다(data not shown).

연구의 결과, 개고사리의 근경 절편은 1/2MS배지에서 근경의 절편을 배양했을 때 8주 동안에 가장 많은 포자체를 형성하였으나, 2MS배지에서 배양했을 때에는 다수의 포자체로 분화할 수 있는 분열조직이 다수 형성되었다. 양치식물의 분열조직인 GGB는 어린 싹의 기원체(shoot primordia)들이 뭉쳐져 있어(Bertrand *et al.*, 1999; Fernandez and Revilla, 2003) 소량으로도 많은 수의 포자체를 재생할 수 있는 기관으로 알려져 있으므로(Fernandez *et al.*, 1996), 개고사리의 경우 2MS에서 절편을 배양하여 GGB의 형성을 촉진시킨 후, GGB의 포자체 분화가 촉진될 수 있는 배지 조건을 구명하여 필요한 시기에 GGB로부터 다수의 포자체를 발생시키는 것도 효과적인 배양방법이 될 수 있을 것으

로 생각되었다.

Sucrose와 NaH₂PO₄의 적정 첨가량

1/2MS배지의 sucrose 농도를 0~4%로 조절하여 실험한 결과, 1% 첨가구에서는 GGB의 포자체 분화가 왕성하여 초기에 형성된 GGB가 모두 포자체로 분화되었으며, 30 mg의 근경절편에서 약 50여개의 포자체가 형성되었다(Table 3). 배지 내 sucrose의 농도가 높아질수록 근경의 절편에서 발생한 GGB가 포자체로 분화되지 못하였으며, sucrose 무첨가구에서는 절편에서 GGB가 형성되지 않고 포자체로 분화되는 특징을 보였다.

NaH₂PO₄를 0-400 mg · L⁻¹으로 달리하여 첨가한 결과 개고사리의 근경 절편은 NaH₂PO₄를 50 mg · L⁻¹로 첨가했을 때 포자체 분화 및 생육이 가장 왕성하였다(Table 4). 그러나 100 mg · L⁻¹ 이상의 농도로 첨가했을 때에는 무첨가구보다 포자체의 재생이 억제되었으며, 400 mg · L⁻¹의 첨가구에서는 GGB의 포자체 분화 능력 및 재생된 포자체의 생육 모두 억제되었다.

Table 3. Effect of sucrose concentrations on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* after 10 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)	GGB wt. (mg)
0	0.04c ^z	4.7c	0.90b	3.0c	0.0b	-	4	0c
1	0.91a	51.4a	2.28a	5.2b	5.2a	0.76a	0	0c
2	0.92a	39.6b	2.62a	7.4a	5.8a	0.92a	0	14b
3	0.96a	41.6b	2.06a	5.6ab	3.8a	0.76a	0	43ab
4	0.36b	12.4c	1.00b	5.6ab	0.6b	0.10b	0	142a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 4. Effect of NaH₂PO₄ concentrations on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* after 10 weeks in culture

NaH ₂ PO ₄ (mg · L ⁻¹)	Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	GGB wt. (mg)
0	0.33b ^z	39.5b	0.88b	3.8a	1.2ab	0.18ab	7b
50	0.46a	63.3a	1.47a	4.0a	2.7a	0.20ab	5b
100	0.21c	24.0bc	0.90b	4.3a	1.3ab	0.17ab	2b
200	0.19cd	26.0bc	1.10b	4.0a	1.3ab	0.33a	17ab
400	0.12d	14.5c	0.80b	2.3b	0.3b	0.10b	24a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

적정 성장조절물질의 종류와 농도 구명

Kinetin과 BA를 단용으로 첨가하거나 NAA 또는 IBA를 혼용하여 첨가한 1/2MS 배지에 개고사리 근경의 절편을 다져서 2달 동안 배양한 후 형성된 GGB, 전엽체 및 포자체를 성장조절물질을 넣지 않고 활성탄 0.1%를 첨가한 1/2MS 배지로 이식하여 2달 동안 배양한 결과, 개고사리의 근경 절편은 2 μ M의 kinetin과 5 μ M의 IBA를 혼용첨가했을 때

포자체 재생이 가장 왕성하였다(Fig. 1, Table 5-8). 한편 BA를 첨가했을 때에는 무첨가구에 비하여 포자체의 재생이 억제되었으며, NAA 및 IBA와의 혼용 처리도 절편으로부터 포자체의 재생을 촉진하지 못하였다. 그러나 BA와 IBA를 혼용으로 첨가하여 근경의 절편을 배양했을 때에는 다른 처리구에 비하여 GGB가 많이 형성되는 특징을 보였으므로 BA와 IBA 혼용 첨가구에서 발생한 GGB로부터 포자체의

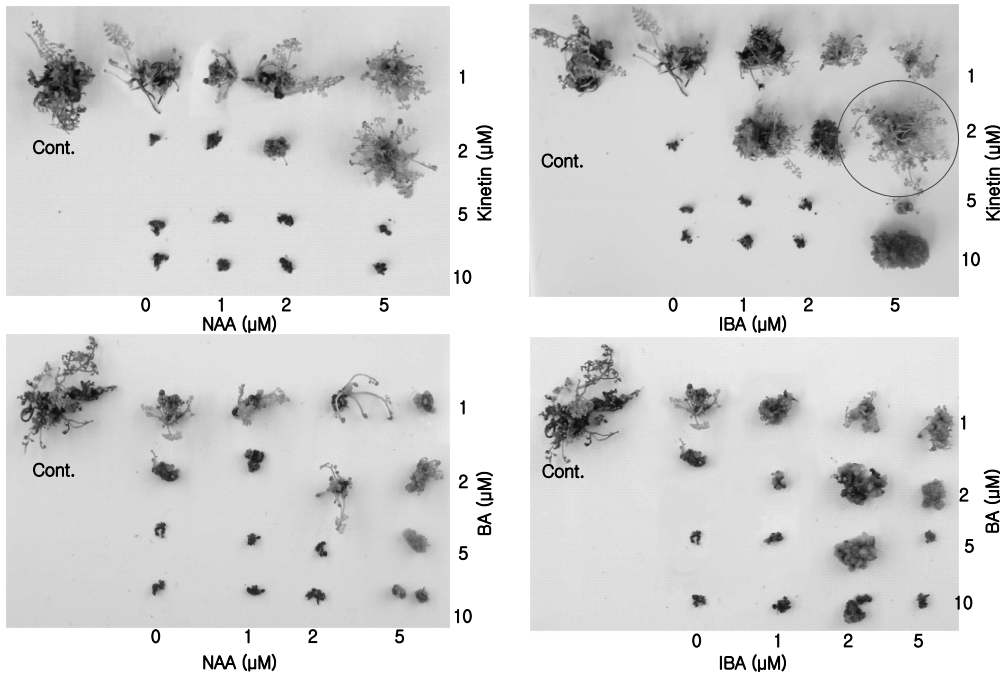


Fig. 1. Cultural response of rhizome segments of *Athyrium niponicum* cultured on 1/2MS media containing different growth regulators.

Table 5. Effect of growth regulators on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* after 4 months in culture

Growth regulator (μ M)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Rhizome length (cm)	GGB wt. (mg)	
Kinetin	0	0.28ab ^z	7.0bc	1.95a	4.3a	0.8bc	0.15b	0.15bc	0b	
	1	0	0.32a	13.5b	1.68ab	1.4b	2.0a	1.64a	0.38a	0b
		1	0.19ab	7.5bc	1.24c	1.8b	0.0c	-	0.12cd	21a
		2	0.09ab	20.7a	1.64ab	3.8a	1.0b	0.35b	0.18bc	20a
		5	0.17ab	22.5a	1.40bc	3.8a	0.2bc	0.20b	0.10cd	8ab
2	0								Dead	
	1								Dead	
	2	0.02b	5.0c	0.20d	1.2b	0.0c	-	0.00d	0b	
	5	0.24ab	11.5bc	1.85a	4.2a	1.0b	0.15b	0.27ab	0b	

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Explants cultured on all the media containing 5, 10 μ M kinetin were dead.

Table 6. Effect of growth regulators on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* after 4 months in culture

Growth regulator (μ M)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Rhizome length (cm)	GGB wt. (mg)
Kinetin	IBA								
0	0	0.28ab ^z	7.0cd	1.95ab	4.3ab	0.8b	0.15c	0.15bc	0e
1	0	0.32ab	13.2bc	1.68bc	1.4cd	2.0a	1.64a	0.38a	0e
	1	0.22b	18.7ab	0.98ef	2.0cd	1.0b	1.05b	0.14bc	101b
	2	0.17b	15.5b	1.44cd	4.2ab	0.6b	0.13c	0.24ab	0e
	5	0.09b	18.0ab	0.66gf	2.0cd	0.0b	-	0.20b	117a
2	0				Dead				
	1	0.68a	16.0b	1.16de	3.8b	0.0b	-	0.18b	30d
	2	0.27ab	18.5ab	0.38g	3.0bc	0.0b	-	0.15bc	0e
	5	0.42ab	24.5a	2.18a	5.5a	0.5b	0.30c	0.18b	0e

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Explants cultured on all the media containing 5, 10 μ M kinetin were dead.

Table 7. Effect of growth regulators on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* after 4 months in culture

Growth regulator (μ M)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Rhizome length (cm)	GGB wt. (mg)
BA	NAA								
0	0	0.28a ^z	7.0a	1.95a	4.3a	0.8	0.15	0.15b	0b
1	0	0.20a	7.5a	1.24b	2.0bc	0.0	-	0.14b	67a
	1	0.10a	4.5ab	0.66c	1.2c	0.0	-	0.26b	89a
	2	0.08b	2.5bc	1.35b	4.5a	0.0	-	0.50a	40a
	5	0.08b	1.2c	0.63c	1.1c	0.0	-	0.12b	84a
2	0	0.07b	1.0c	0.90bc	3.0ab	0.0	-	0.20b	73a
	1	0.04b	0.0c	-	0.0d	0.0	-	-	40a
	2	0.09b	0.0c	-	0.0d	0.0	-	-	57a
	5	0.09b	7.3a	0.92bc	2.4bc	0.0	-	0.18b	72a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Explants cultured on all the media containing 5, 10 μ M BA were dead.

형성을 유도할 수 있는 배양조건을 구명할 필요가 있는 것으로 생각된다.

한편, 개고사리 근경 절편은 같은 우드풀과의 청나래고사리(Shin and Lee, 2009)와 달리 생장조절물질 첨가에 의한 절편의 식물체 분화 촉진이 왕성하지 않은 경향을 보였는데, 이는 개고사리는 다른 양치식물과 달리 생장조절물질을 첨가하지 않아도 GGB가 형성되어 포자체 재생이 비교적 왕성하기 때문으로 생각되었다. 또한, 개고사리의 근

경 절편에서 형성된 GGB의 분화력을 높이기 위해서는 1% sucrose와 50 mg · L⁻¹의 NaH₂PO₄를 첨가하는 것이 효과적이지만, 본 연구에서는 sucrose를 3% 첨가한 1/2MS배지를 기본으로 하여 GGB의 분화력이 억제된 것도 포자체의 재생이 비교적 낮은 원인으로 생각된다. 따라서 1%의 sucrose와 50 mg · L⁻¹의 NaH₂PO₄를 첨가한 1/2MS배지에 kinetin 2 μ M과 IBA 5 μ M을 첨가하여 근경의 절편을 배양할 경우 더 많은 포자체가 형성될 것으로 생각된다.

Table 8. Effect of growth regulators on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* after 4 months in culture

Growth regulator (μ M)		Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Rhizome length (cm)	GGB wt. (mg)
BA	IBA								
0	0	0.28a ^z	7.0bc	1.95a	4.3a	0.8	0.15	0.15ab	0c
1	0	0.20a	7.5bc	1.24b	2.0bc	0.0	-	0.14ab	67b
	1	0.04a	0.0e	-	0.0d	0.0	-	-	42b
	2	0.13a	4.5cd	0.94c	1.6bc	0.0	-	0.24a	5b
	5	0.09a	13.3a	0.30d	1.17c	0.0	-	0.05c	31b
2	0	0.07a	1.0de	0.90c	3.0ab	0.0	-	0.20a	73b
	1	0.10a	8.8b	0.26d	1.2c	0.0	-	0.02c	96b
	2	0.30a	0.0e	-	0.0d	0.0	-	-	298a
	5	0.10a	0.0e	-	0.0d	0.0	-	-	96b

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Explants cultured on all the media containing 5, 10 μ M BA were dead.

Table 9. Effect of growth methods and activated charcoals on shoot regeneration from chopped rhizome segments of *Athyrium niponicum* after 16 weeks

Culture method	Activated charcoal (%)	Total fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)	Rhizome length (cm)	GGB wt. (mg)
Solid	0.0	0.58a ^z	55.7a	0.86b	3.0a	0.3a	0.10	0.18a	0.025a
	0.1	0.39b	21.7b	1.74a	3.7a	0.0a	-	0.21a	0.043a
Liquid stationary	0.0	0.08c	15.5bc	0.54b	2.0b	0.0a	-	0.10a	
	0.1				Dead				
Liquid suspension	0.0	0.06c	4.3c	0.50b	2.0b	0.0a	-	0.10a	0.017a
	0.1				Dead				

^zMeans separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

배양 방법 및 활성탄의 영향

상기의 연구에서 개고사리의 포자체 재생에 가장 효과적인 것으로 나타난 변형 1/2MS배지(sucrose 1%, NaH₂PO₄ 50 mg · L⁻¹, kinetin 2 μ M, IBA 5 μ M, pH 5.8)에 활성탄을 0 또는 0.1%첨가여 고체 또는 액체배지에서 배양한 결과, 개고사리의 근경 절편은 활성탄을 첨가하지 않은 고체 배지에서 포자체의 분화가 가장 우수하였으며, 90 mg의 근경 절편으로부터 55.7개의 포자체가 형성되었다(Table 9). 같은 우드풀과의 청나래고사리는 근경에서 형성된 side shoot의 절편을 액체배지에서 배양했을 때 포자체의 분화가 촉진되었으나(Thakur *et al.*, 1998), 개고사리의 근경 절편은 액체배지에서 정치 또는 현탁배양한 경우 모두 고체배지에서 배양했을 때보다 포자체의 분화 및 형성된 포

자체의 생육이 크게 억제되어 배양효율이 극히 낮은 것으로 나타났다. 한편, 활성탄은 포자체의 분화능을 크게 억제하는 경향을 보였으며, 활성탄을 첨가한 액체배지에서 배양한 경우에는 배양방법에 관계없이 모든 포자체 절편이 괴사하였다.

적 요

본 연구는 개고사리의 기내 조직배양 시 적정 배지구성 물질과 배양방법을 구명하여 효율적인 대량생산체계를 구축하기 위하여 시행하였다. 개고사리의 엽신, 엽병 및 근경의 절편 중 근경의 절편에서만 포자체가 분화되었다. 근경의 절편으로부터 포자체의 재생을 촉진시키기 위해서는 1/2MS

배지가 가장 적합하였으며, 배지 내 sucrose는 1%, NaH₂PO₄는 50 mg · L⁻¹으로 첨가하는 것이 가장 효과적이었다. 생장 조절물질은 BA보다 kinetin을 첨가하는 것이 포자체의 분화를 촉진하는데 적합하였으며, kinetin 2 μM와 IBA 5 μM를 혼용하여 첨가하는 것이 근경의 절편으로부터 포자체를 형성하는데 가장 효과적이었다. 포자체 형성에 가장 효과적인 것으로 나타난 변형 1/2MS배지(sucrose는 1%, NaH₂PO₄는 50 mg · L⁻¹, kinetin 2 μM와 IBA 5 μM, pH 5.8)에 활성탄을 0 또는 0.1% 첨가하여 고체 또는 액체배지에서 배양한 결과, 개고사리 근경의 절편은 고체배지에서 포자체의 재생 및 생육이 가장 우수하였다. 배지에 활성탄을 첨가하는 것은 고체, 액체 정치 및 액체 현탁배양 모두에서 근경 절편의 포자체 분화를 억제하였다.

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. 1992. *In vitro* culture of *Platyserium birfurcatum* gametophytes. Sci. Hort. 51:343-346.
- Foster, E.B. 1984. Ferns to know and grow. Timber press, Portland, U.S.A. pp. 85.
- Fernandez, H. and M.A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73:1-13.
- Fernandez, H., A.M. Bertrand and R. Sanchez-Tames. 1996. Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45:93-97.
- Garcia, E. and L. Furelli. 1987. Clonal mass propagation of the fern *Cyrtomium falcatum*. Acta Hort(ISHS). 212:655-660.
- 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.
- Higuchi, H., W. Amaki, and S. Suzuki. 1987. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Presl. Sci. Hort. 32:105-113.
- Joung, J.A. 2005. *In vitro* masspropagation and mutation breeding of pteridophyta native to Korea. Ph.D Diss., Chungbuk Natl. Univ., Chungju, Korea. pp. 96-159.
- Kim, M.J. 2003. Study on antimicrobial and antioxidant activities of *Athrium niponicum* extracts. Ph.D Diss., Dong-A Univ., Busan, Korea. pp. 61-63.
- Shin, S.L. and C.H. Lee. 2009. Medium composition affecting *in vitro* regeneration of *Matteuccia struthiopteris*. Flower Res. J. 17:93-100 (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. and M.C. Teng. 1997. *In vitro* regeneration patterns of *Platyserium birfurcatum* leaf suspension culture. Plant Cell Rep. 16:820-824.

(접수일 2010.8.24; 수락일 2010.12.9)