

평고비(*Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis*) 기내 포자체 재생에 영향을 미치는 배양부위와 배지구성물질

권혁준 · 신소림 · 이철희 · 김수영

Effect of explant parts and medium components on in vitro regeneration in *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis*

Hyuk Joon Kwon · So Lim Shin · Cheol Hee Lee · Soo-Young Kim

Received: 7 June 2017 / Revised: 19 October 2017 / Accepted: 23 October 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study was carried out to find culture materials (explant parts) and medium components (medium type, sucrose and NaH_2PO_4 concentration) for *in vitro* propagation of *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis* sporophyte. The results of study: chopped segments of leaf blades, stipes, rhizomes and roots were cultured on a 1/2MS medium supplemented with 0.1% activated charcoal. Among these explant types, only the rhizome segments produced young sporophyte, regenerating vigorously on a 1/8MS medium. Adjusting the sucrose concentration to 2% and supplement to $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 in the 1/8MS medium proved to be more efficient for plant regeneration. Consequently, the addition of 0.1% activated charcoal to a modified 1/8MS medium (2% sucrose, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , pH 5.8 and 0.8% agar) yielded the highest sporophyte regeneration.

Keywords Fern, NaH_2PO_4 , Masspropagation, Pteridophyta, Sporophyte

서 언

평고비(*Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis*)는 고비과(Osmundaceae) 고비속으로 우리나라 전역에서 자생하는 하록성 양치식물이다. 영양엽과 생식엽이 따로 있으며 초장은 1 m 내외로 자란다. 엽신은 2회 우상심열이며, 난상 피침형으로 정우편이 약간 꼬리처럼 길게 뻗는 형태적 특징이 있다(KFS 2005). 평고비는 관상용으로 사용되는 대표적인 양치식물이며, 새순은 식용이 가능하여 수요가 증가하고 있으나, 번식 방법이 규명되지 않아 대부분 산에서 굴취한 묘를 분주하여 공급하고 있는 실정이다. 그러나 수요에 비하여 공급량이 절대적으로 부족하여 고가에 거래되고 있다(Shin 2007).

양치식물은 포자를 이용한 유성번식, 포자체의 분주 등의 무성번식으로 증식할 수 있는데, 유성번식은 종에 따라 포자가 발아되기까지 많은 기간이 걸리며, 발아한 전엽체에서 포자체가 형성되는데도 오랜 시간이 걸리기 때문에 경제적으로 효율적인 번식방법이 될 수 없다. 느리미고사리(*Dryopteris tokyoensis*) 포자를 토양에 파종하여 번식시킨 결과 전엽체의 형성에 약 3달이 소요되었으며, 포자체의 잎이 길이가 3 cm 가 되기까지 약 8개월이 걸렸다고 한다(Won 2005). 무성번식은 포자가 발아하고 전엽체가 형성되어 수정하는데 걸리는 시간을 단축시킬 수 있으며, 모본의 유용형질과 동일한 유묘를 대량생산할 수 있는 장점이 있다(Lee 2004; Bharati et al. 2013). 양치식물은 지하경 및 근경을 이용하여 뿔어나가는 습성이 있으므로 농가에서는 주로 지하부를 잘라 분주하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이런 번식방법은 성숙한 개체를 손쉽게 얻을 수 있으나, 한 포기의 식물체에서 번식할 수 있는 양의 한계가 있으므로 효율적인 증식방법이 아니라고 생각된다(Lee 2004).

이에 기내배양을 통한 다양한 양치식물의 증식 연구가 진

[†]These authors contributed equally to this work.

H. J. Kwon[†] · S. L. Shin[†] · S.-Y. Kim (✉)
국립생물자원관
(National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Korea)
e-mail: sy7540@korea.kr

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)

행되었으나, 종에 따라 증식조건이 달라 배양부위, 배지구성물질의 종류와 첨가량 등의 연구가 매우 중요하다(Garcia and Furelli 1987; Bharati et al. 2013). 양치식물은 조직배양을 통해 잎, 엽병, 뿌리, 근경 등 다양한 부위로부터 식물체를 재생할 수 있으나, 식물 종에 따라 부위별 재생능력이 각기 다르다(Bertrand et al. 1999; Camloh and Gogala 1992; Jeong and Lee 2006a). 또한 양치식물 포자체 재생은 종과 식물 절편의 부위에 따라 sucrose와 NaH₂PO₄ 등의 배지구성물질의 종류와 영양요구도가 다르다(Ambrozic-Dolinsek et al. 2002; Fernandez and Revilla 2003; Kwa et al. 1991; Shin 2007; Thakur et al. 1998; Mikula et al. 2015a).

이에 본 연구는 식용 및 조경용 소재 등으로 활용가치가 높은 꿩고비의 기내 식물체 조직배양법을 개발하기 위하여 적정 배양재료와 배지구성물질 및 배양방법을 구명함으로써 균일묘의 생산을 통해 꿩고비의 산업적 이용을 확대하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험 재료

기내 포자발아로 형성된 전엽체의 유성생식으로 발생한 꿩고비의 유묘를 2~3달 간격으로 계대배양한 다음 3~5 cm 정도로 성장한 균일한 묘를 재료로 사용하였다.

배양부위별 포자체 형성

실험은 1/2MS배지(Murashige and Skoog, 1962)에 sucrose 3%, 활성탄 0.05%를 첨가한 후 pH 5.8로 조절한 배지를 기본으로 하여 100 mL의 시험관에 10 mL씩 분주한 다음 사면배지를 만들어 사용하였다. 적정 배양재료를 구명하기 위하여 기내에서 배양중인 유묘를 엽신, 엽병, 근경 및 뿌리의 4부분으로 나누어 메스로 곱게 다져 배양하였다. 모든 실험의 배양기간 동안 온도는 25±1°C, 광주기는 형광등을 이용하여 40 μmol·m⁻²·s⁻¹에서 16시간으로 조절하였다.

배지 농도별 포자체 형성

배지 내 무기물 및 비타민의 적정 첨가농도를 구명하기 위하여 변형 MS배지(sucrose 3%, 활성탄 0.05%, pH 5.8)의 무기물 및 비타민의 농도를 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2배로 조절하여 사용하였다. 본 연구에서 밝혀진 적정 배양재료(근경) 및 배지(1/8MS)를 이후 모든 실험의 기본조건으로 하였다.

Sucrose 및 NaH₂PO₄의 농도별 포자체 형성

Sucrose 및 NaH₂PO₄의 적정 첨가량을 구명하기 위하여 sucrose는 0, 1, 2, 3, 4%, NaH₂PO₄는 0, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹로 조절한 1/8MS 배지를 조성하여 근경을 배양한 후 포자체 형성을 조사하였다.

형태학적 측정 및 데이터 분석

12주 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. 무포자 생식에 의해 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 수행하였다. SAS version 9.1 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 각 처리구의 평균을 구하고 던컨의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

배양부위별 포자체 형성

꿩고비 포자체의 적정 배양재료를 구명하기 위해 포자체 절편 부위를 달리하여 배양한 결과, 근경에서 포자체 형성이 가장 우수하였다(Table 1). 엽신과 뿌리의 절편은 모두 괴사

Table 1 Effects of explant type on shoot regeneration and prothallus formation of *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis* after 12 weeks in culture

Explant type	Total fresh wt. (g)	No. of shoots (ea)	Shoot length (cm)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Prothallus wt. (mg)
Blade						
Stipe	0.03a ^z	3.06b	1.05b	0.00b	0.00b	11.35
Rhizome	0.02a	4.33a	2.26a	1.32a	0.53a	0.00
Root						

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

^ySurvival rate: 0.

Table 2 Effects of medium strength on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis* after 12 weeks in culture

Medium strength	Total fresh wt. (g)	No. of shoots (ea)	Shoot length (cm)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Prothallus wt. (mg)
1/8MS	0.11a ^z	6.32a	0.58a	2.75a	1.83a	90.04a
1/4MS	0.06b	3.34b	0.35ab	2.00ab	0.88b	29.38b
1/2MS	0.04b	3.29b	0.30ab	1.25ab	0.53bc	0.01c
1MS	0.04b	3.38b	0.24ab	2.00ab	0.42bc	0.04c
2MS						

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

^ySurvival rate: 0.

하였으며, 엽병에서는 분화되지 못한 포자체의 유조직과 전엽체가 형성되었다.

포자체를 이용한 양치식물의 기내번식은 잎, 근경, 엽병, 측아 등 다양한 부위를 이용하여 가능하며(Bertrand et al. 1999; Camloh and Gogala 1992; Jeong and Lee 2006a), 자생 양치식물인 개고사리(*Athyrium niponicum*)와 참쇠고비(*Cyrtoumium caryotideum* var. *coreanum*), 변산일엽(*Phyllitis scolopendrium*)의 식물체 재생 연구에서는 근경에서 포자체 형성이 왕성하다고 보고되어 있다(Jeong and Lee 2006, 2006b; Shin and Lee 2011). 또한 알록큰봉의꼬리(*Pteris cretica*) 품종인 "Wilsonii"는 엽신, 엽병 등의 절편은 모두 괴사하고 근경에서만 포자체가 형성되었다(Shin and Lee 2009b). 그 밖에도 *Adiantum capillus-veneis* (Salome et al. 1985), *Asplenium nidus* (Higuchi and Amaki 1989), *Matteuccia struthiopteris* (Thaker et al. 1998), *Nephrolepis*속(Higuchi et al. 1987; Padhya and Mehta 1982), *Polypodium cambricum* (Bertrand et al. 1999) 등 다양한 양치식물 근경조직에서 포자체 재생이 가장 왕성하여 근경을 이용한 식물체 대량번식 연구가 시도되었다. 본 연구의 꿩고비 절편도 다른 부위에 비해 근경에서 포자체의 유조직과 전엽체 형성이 우수하여 기내 증식용 재료로 근경이 적합한 것으로 판단되었다.

배지 농도별 포자체 형성

상기 연구에서 포자체 형성이 가장 우수하였던 근경 절편을 이용하여 배지농도를 달리하여 배양한 결과, 포자체 형성은 배지의 무기물 함량이 가장 낮았던 1/8MS 배지에서 가장 왕성하였으며, 2MS 배지에서 배양한 절편체는 모두 괴사하였다(Table 2).

일반적으로 양치식물 포자체 재생을 위한 배지는 농도를 조절된 MS 배지가 사용되고 있으며, MS 배지의 농도를 1/2 이하로 조절한 배지에서 포자체의 재분화가 왕성한 것으로 보고된 바 있다. 영양분이 적은 배지는 풍부한 배지에 비해 삼투압이 낮아 포자체 절편의 무배생식(apogamy)을 촉진 시키는 것으로 알려져 있으며(Raghavan 1989), 1/2MS (Joeng and



Fig. 1 Cultural response of the rhizome segments of *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis* cultured on different media

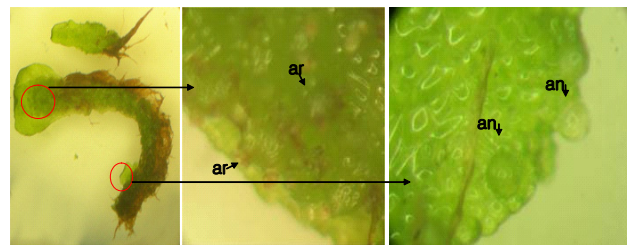


Fig. 2 Prothallus formed from the rhizome segment of *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis* on 1/8MS medium. an; antheridium, ar: archegonium

Lee 2006a; Thakur et al. 1998), 1/4MS배지(Higuchi et al. 1987; Bertrand et al. 1999)에서 포자체 재생이 왕성한 것으로 알려져 있다. 본 연구의 꿩고비 근경 절편도 선행 연구와 같은 경향으로 배지 농도가 낮아질수록 포자체 형성이 증가하여 1/8MS 배지에서 가장 많았다. 또한 근경 배양을 통해 형성된 꿩고비 포자체는 배지농도가 가장 낮았던 1/8MS배지에서 뿌리 발달이 가장 왕성하였다(Fig. 1). 같은 속인 고비(*Osmunda japonica*)의 포자체에서도 같은 경향으로 지상부에 비해 지하부의 생육이 우수하였다고 보고된 바 있다(Shin and Lee 2009a).

낮은 농도의 영양물질이 함유된 1/8MS와 1/4MS 배지에서는 무포자 생식에 의해 전엽체도 소량 발생하였다. 형성된 전엽체 형태는 가근 형성이 왕성하였으며, 장란기 쿠션을 따라 전엽체의 아랫부분이 비정상적으로 길어진 형태를 지니고 있었다(Fig. 2). 그러나 생식기관인 장란기와 장정기가 모두 정상적으로 형성되어, 형태가 다소 비정상적이더라도

유성생식을 통한 포자체 형성이 가능할 것으로 생각되었다.

Sucrose 및 NaH₂PO₄ 농도별 포자체 형성

평고비 근경의 포자체 형성을 위한 최적 sucrose 및 NaH₂PO₄ 농도를 구명하기 위해 연구를 수행한 결과, sucrose 농도에 따른 포자체 형성은 sucrose 2% 첨가구에서 가장 많았으며, sucrose 무첨가구에서는 포자체가 형성되지 않고 전엽체만 형성되었다(Table 3). Sucrose는 평고비 근경의 포자체 재생과 생육에 영향을 미쳤으나, 무포자 생식에 의한 전엽체 형성에 더 많은 영향을 주었다.

배양환경의 조절에 의해 포자체 조직에서 전엽체가 형성되는 무포자 생식이 가능하다는 것은 여러 학자들에 의하여 밝혀진 바 있다. *Platyserium bifuratum*의 엽조직은 sucrose를 1~2% 첨가한 경우에는 포자체가 형성되나, 0.01% 첨가하는 경우에는 전엽체가 형성되었으며(Ambrozic-Dolinsek et al. 2002), *Pteris vittata* 우편의 절편(pinae strip)은 저농도의 성장조절물질, sugar 및 sugar alcohols를 첨가한 처리구에서 무포자 생식이 일어나는 경향이 있다고 하였다(Kwa et al. 1991). 그러나 반드시 sucrose를 낮은 농도로 첨가하거나 첨가하지 않는 경우에만 무포자 생식이 유도되는 것은 아니며, *Microgramma vacciniifolia*의 경우에는 배지의 sucrose 농도가 높아질수록 포자체에서 전엽체가 형성되는 비율이 높아졌다고 하였다(Hirsh 1975). 또한 높은 농도의 sucrose를 첨가한 MS 배지에서 배우체는 보통의 하트모양의 배우체로 발달하지는 못하

지만, 분지를 발생시킨다는 결과도 있다(Wu et al. 2010). Sucrose 농도의 차이뿐만 아니라 배지 내 영양물질의 차이에 의하여 무포자 생식이 유도되는 경우가 있어(Shin 2007), 무포자 생식은 반드시 sucrose에 의하여 결정되는 것은 아니며, 배양절편이 포자체로 재생되기 어려운 환경에 노출되었을 때 포자체 대신에 전엽체로 재생되는 것으로 생각되었다. NaH₂PO₄ 농도를 달리하여 배양한 평고비 근경은 50 mg·L⁻¹ 첨가구에서 포자체의 재생이 가장 우수하였다(Table 4). 전반적으로 무첨가구에 비해 NaH₂PO₄ 첨가구에서 전엽체의 재생 및 생육이 왕성하였으나, 가장 농도가 높았던 400 mg·L⁻¹ 첨가구에서는 포자체의 재생과 생육이 오히려 억제되었으며, 무포자 생식에 의한 전엽체 형성이 왕성하였다.

배지 내 적정량의 NaH₂PO₄는 양치식물의 절편에서 재생된 포자체의 성장을 향상키는 것으로 알려져 있다(Garcia and Furelli 1987; Paek et al. 1984). *Anogramma leptophylla* 절편은 NaH₂PO₄를 첨가한 처리구에서만 포자체가 발생되었으며, *Cheilathes acrostica*는 NaH₂PO₄ 150 mg·L⁻¹ 처리구에서 포자체 발생수가 가장 많이 증가하였다고 보고된 바 있다(Moura et al. 2014). 또한 개고사리(*Athyrium niponicum*) 50 mg·L⁻¹, 변산일엽(*Phyllitis scolopendrium*) 200 mg·L⁻¹, 꼬리고사리(*Asplenium incisum*)는 400 mg·L⁻¹의 NaH₂PO₄를 배지에 첨가하여 배양하였을 때, 포자체 재생이 가장 왕성하였으나(Jeong and Lee 2006b, 2006c; Shin and Lee 2011), *P. cretica* 'Wilsonii'의 근경 절편의 경우에는 NaH₂PO₄ 첨가가 오히려 포자체 생육을 억제하였다고 보고되었다(Shin and Lee 2009b). 따라서 양치식물

Table 3 Effects of sucrose concentrations on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis* after 12 weeks in culture

Sucrose (%)	Total fresh wt. (g)	No. of shoots (ea)	Shoot length (cm)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Prothallus wt. (mg)
0	0.01c ^z	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	13.01ab
1	0.03b	2.03b	0.52a	0.82c	0.70b	18.16ab
2	0.10a	6.02a	0.52a	1.64b	1.54a	21.44a
3	0.05b	3.01b	0.70a	0.41c	0.55b	8.38bc
4	0.03b	2.30b	0.42b	2.03a	0.9ab	0.00c

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

Table 4 Effects of NaH₂PO₄ concentrations on shoot regeneration and prothallus formation from chopped rhizome segments of *Osmunda cinnamomea* var. *forkiensis* after 12 weeks in culture

NaH ₂ PO ₄ (mg·L ⁻¹)	Total fresh wt. (g)	No. of shoots (ea)	Shoot length (cm)	No. of roots (ea)	Root length (cm)	Prothallus wt. (mg)
0	0.05ab ^z	3.02b	0.70a	0.39b	0.55a	8.21c
50	0.08a	6.04a	0.86a	2.42a	1.52a	23.42b
100	0.06ab	3.51ab	0.48a	1.57ab	1.37a	20.87b
200	0.06ab	4.03ab	0.66a	1.43ab	0.54a	0.00c
400	0.02b	1.49b	0.70a	0.34b	0.60a	92.26a

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

절편을 이용한 포자체 재생에서 NaH_2PO_4 의 적정 농도는 종에 따라 다르며, 본 연구의 꿩고비 근경 절편은 저농도의 NaH_2PO_4 처리구에서 기관형성 능력을 촉진하는 것으로 확인되었다.

적 요

본 연구는 꿩고비 포자체의 기내증식을 위한 배양재료 및 배지 구성물질을 구명하기 위해 수행되었다. 포자체의 유묘를 부위별로 나누어 활성탄 0.1%를 첨가한 1/2MS 배지에 다져서 배양한 결과, 근경에서 포자체 재생이 가장 우수하였다. 곱게 다진 근경을 농도를 달리한 MS 배지에 배양한 결과, 1/8MS 배지에서 포자체 형성이 가장 왕성하였으며, 2MS 배지에서는 배양한 절편이 모두 괴사하였다. 상기의 연구를 토대로 1/8MS 배지에 sucrose와 NaH_2PO_4 의 농도를 조절하여 배양한 결과 sucrose 2%, NaH_2PO_4 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서 포자체 재생이 가장 왕성하였다. 이상의 연구결과, 활성탄 0.1%를 포함한 변형 1/8MS 배지(sucrose 2%, NaH_2PO_4 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, agar 0.8%, pH 5.8)에서 포자체 재생이 가장 왕성하였다.

사 사

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

References

- Ambrozic-Dolinsek J, Camloh M, Bohanec B, Zel J (2002) Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platyserium bifurcatum*). Plant Cell Rpt 20:791-796
- 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
- Bharati SK, Manabendra DC, Behari MP (2013) *In vitro* propagation in Pteridophytes: a review. Int J Res Ayurveda Pharm 4:297-303
- Camloh M, Gogala N (1992) *In vitro* culture of *Platyserium birfurcatum* gametophytes. Sci Hortic 51:343-346
- Fernandez H, Revilla MA (2003) *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tiss Org Cult 73:1-13
- Garcia E, Furelli L (1987) Clonal mass propagation of the fern *Cyrtomium falcatum*. Acta Hortic (ISHS). 212:655-660
- Higuchi H, Amaki W (1989) Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation. Sci Hortic 37:351-359
- Higuchi H, Amaki W, Suzuki S (1987) *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Prsel. Sci. Hortic. 32:105-113
- Hirsh AM (1975) The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes. Plant Physiol 56:390-393
- Jeong JA, Lee CH (2006a) Effect of culture method and medium composition on shoot regeneration from sporophytes of *Cyrtomium caryotideum* var. *coreanum* Nakai. Kor J Plant Res 19:265-275
- Jeong JA, Lee CH (2006b) Effects of medium composition on plant regeneration in *Asplenium incisum* Thunb. Flower Res J 14:176-185
- Jeong JA, Lee CH (2006c) Factors affected on plant regeration of *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newm. *in vitro*. Korea J Plant Res 19:365-373
- Korean Fern Society (KFS) (2005) Fern and fern allies of Korea. Geobook, Seoul, Korea
- Kwa SH, Wee YC, Loh CS (1991) Production of aposporous gametophytes and calli from *Pteris vittata* L. pinnae stipes cultured *in vitro*. Plant Cell Rpt 10:392-393
- Lee CH (2004) Propagation and technique of masspropagation of Pteridophyta native to Korea. Korean Wild Res Assn 3:91-96
- Mikuła A, Mikuła A, Pożoga M, Grzyb M, Rybczyński JJ (2015) An unique system of somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb.: the importance of explant type, and physical and chemical factors. Plant Cell Tiss Org Cult 123: 467-478
- Moura IR, Costa MCS, Silva MJ, Duarte MC (2014) Recovery of ferns from herbarium collections : In J Tuft, eds, Ferns and Shrubs, 2015 Nova Science Publisher Inc, New York, USA. pp 77-92
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Padhya MA, Mehta AR (1982) Propagation of fern (*Nephrolepis*) through tissue culture. Plant Cell Rep 1:261-263
- Paek KY, Lee HC, Choi JK, Kwack BH (1984) Masspropagation *Nephrolepis exaltata* by runner tips *in vitro*. J Korean Soc Hortic Sci 25:313-321
- Raghavan V (1989) Apogamy-an alternate developmental program of the gametophyte. In: Raghavan V (ed) Developmental biology of fern gametophytes. Cambridge University Press, Cambridge, pp 261-295
- Salome M, Pais S, Casal M (1985) Propagation of the fern *Adiantum capillus-veneris* through tissue culture of the circinate part of young leaves. Acta Hortic (ISHE) 212:651-654
- Shin SL (2007) Several factors affecting *in vitro* masspropagation of eight fern species. MS thesis, Chungbuk Nat. Univ., Cheongju, Korea
- Shin SL, Lee CH (2009a) *In vitro* medium composition and culture method affecting masspropagation of *Osmunda japonica* Thunb. pothalli. Korean J Hortic Sci Technol 27:299-304
- Shin SL, Lee CH (2009b) Medium composition affecting *in vitro* plant regeneration and acclimation of *Pteris cretica* ‘Wilsonii’. Korean J Plant Res 22:394-402
- Shin SL, Lee CH (2011) Effect of medium components and culture

- methods on shoots regeneration from *Athyrium niponicum*. Korean J Plant Res 24:113-120
- Thakur RC, Hosoi Y, Ishii K (1998) Rapid *in vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro-an edible fern. Plant Cell Rep 18:203-208
- Won CH (2005) *Ex vitro* propagation of *Dryopteris tokyoensis* (Matsum. ex Makino) C. Chr. by spore. J Korean Ferns Soc 9:12-16
- Wu H, Liu XQ, Ji H, Chen LQ (2010) Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Adiantaceae). Sci Hortic 125:417-421