

## 조직배양을 이용한 가지고비고사리의 전엽체와 포자체 대량번식을 위한 배양조건

박경태 · 장보국 · 이철희

### Culture condition for gametophyte and sporophyte masspropagation of bamboo fern (*Coniogramme japonica*) using tissue culture

Kyungtae Park · Bo Kook Jang · Cheol Hee Lee

Received: 18 March 2019 / Revised: 22 May 2019 / Accepted: 22 May 2019  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** This study was conducted to investigate the optimal culture method for gametophyte and sporophyte propagation in *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels, which can be used in various fields. The propagation of prothallus were cultured in 1/4 - 1 Murashige and Skoog medium and Knop medium for 10 weeks. The results indicated that the fresh weight of prothallus was the highest (14.5 g) in 1MS medium. Subsequently, various concentrations of sucrose, activated charcoal and nitrogen source were also added to 1MS medium and cultured for 8 weeks. The results provided that the sucrose concentration was 3% and the fresh weight of prothallus was the highest 10.8 g. According to the concentration in the range of 8.8 ~ 10.8 g, in the case of activated charcoal, the four treatments showed no significant difference. The nitrogen source was added at a concentration of 30, 60 and 120 mM with the ratio of  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$  being 1 : 2. As a result, the fresh weight of all treatments increased to similar level but there was no significant difference. We investigated sporophyte formation according to soil type and the highest number of sporophytes at 228.0 was formed in soils mixed with horticultural substrate and decomposed granite at 2 : 1 (v : v). On the other hand, sporophyte was not

formed in soils containing peatmoss except for the one with peatmoss and decomposed granite at 2 : 1 (v : v).

**Keywords** Activated Charcoal, *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels, Culture Media, Fern, Pteridaceae, Sucrose

#### 서 언

양치식물은 종자로 번식하는 일반적인 식물과는 다른 생활환을 가진다. 다세포로 구성된 종자 대신 단세포의 포자를 형성하며, 포자는 발아 후 점차 생식기관을 갖춘 전엽체로 성장하게 된다. 이후 성숙한 전엽체에서는 다양한 조건에 의해 수정이 이루어지며, 그 결과로 포자를 생산할 수 있는 포자체가 형성되는 복잡한 생활환을 가진다(Cho et al. 2017). 이러한 복잡한 생활환을 가진 양치식물에 조직배양 기술을 적용하여 증식하는 것은 단계별 발달 생리기작을 연구하고 해석하는데 매우 유용하다(Shin and Lee 2009). 또한 기존의 번식방법인 분주 또는 삽목은 시간이 오래걸리고 증식률이 높지 않다는 단점이 있다. 하지만 조직배양을 이용하면 상대적으로 증식에 걸리는 시간이 단축되며, 제어된 환경조건에서 쉽고 빠르게 성장시킬 수 있다(Fernández and Revilla 2003). 이러한 조직배양 방법을 양치식물에 적용하여 다양한 용도로 활용하는 연구들이 여러 방면에서 수행되고 있다(Fernández and Revilla 2003; Grzyb et al. 2017; Makowski et al. 2016; Mikula et al. 2015).

조직배양시 적정 배지의 선정은 식물의 생육을 촉진시켜 대량증식에 효과적이다. 양치식물의 전엽체는 적절한 배지에서 활발히 성장하며 형태적으로 잘 발달한다고 알려져 있다(Jang et al. 2019b). 배지에 함유된 sucrose는 전엽체의 성장에 영양분으로 이용되지만 높은 농도에서는 조직의 노화를

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

K. Park<sup>†</sup> · B. K. Jang<sup>†</sup> · C. H. Lee (✉)  
충북대학교 축산·원예·식품공학부  
(Division of Animal, Horticultural and Food Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea)  
e-mail: leech@chungbuk.ac.kr

K. Park<sup>†</sup> · B. K. Jang<sup>†</sup> · C. H. Lee (✉)  
충북대학교 BK21플러스 생물건강소재산업화사업단  
(Brain Korea 21 Center for Bio-Resource Development, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea)

일으킨다고 알려져 있다(Hirsch 1975). 활성탄은 배지내에서 억제물질 흡착하여 식물의 성장과 발달에 영향을 미친다. *Platycerium bifurcatum*의 경우 비정상적인 형태형성을 억제하며 정상적인 발달을 유도한다는 결과가 있다(Teng 1997). 하지만 종에 따라 그 요구도가 달라 특성에 맞는 배지와 구성성분의 농도를 구명하는 것은 기내 양치식물의 연구와 대량생산에 필수 요인으로 여겨진다(Fernández et al. 1999; Cho and Lee 2017; Jang et al. 2019b).

가지고비고사리(*Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels)는 고비고사리속(*Coniogramme*) 상록성 다년생 양치식물이다. 서식지는 중국과 대만, 일본 등 주로 아시아에서 발견되며, 국내에서는 제주도와 남부지역에서 자생하고 있다. 형태적 특징으로는 근경은 옆으로 뻗으며 연한 색의 인편이 있고, 엽병은 20~50 cm이고 열은 녹색으로 뒷면은 흑갈색이다. 엽신의 길이는 35~50 cm이며 고비고사리와 닮았으나 짙은 녹색으로 광택이 있고 엽육이 두텁다. 포자낭군은 잎의 측맥을 따라 달리고 가장자리에 가깝게 닿는 것도 있다(KFS 2005). 고비고사리와 형태적으로 매우 유사하지만, 대부분 크기가 작고 중륜 가까이 그물맥이 있다는 점에서 구별이 된다(Lee and Lee 2018).

가지고비고사리는 초장이 길고 잎의 형태가 아름다워 실내 조경과 관상용으로 많이 이용되고 있으며, 중국에서는 새순을 나물로 식용하기도 한다(Liu et al. 2012). 또한, 한방에서는 전초를 산혈련(散血蓮)이라 하여, 밖으로부터 들어온 풍사를 없애고, 몸이 저리고 붓는 습사를 치료하며, 해열과 해독의 효과가 있다. 더불어 혈액순환을 활발히하여 통증을 없애주는데 사용된다고 알려져 있다(KBIS 2019). 가지고비고사리는 식용, 약용 및 관상소재로 활용 가치가 높으나 증식에 대한 연구가 미비하여 관련 연구가 반드시 필요하다 생각된다.

따라서, 본 연구는 다양한 방법에서 활용되고 있는 가지고비고사리를 기내 조직배양을 통해 대량생산 하기 위하여 수행되었다. 전엽체의 배양에 적합한 배지를 선정하고자 실험하였으며, 배지 내 sucrose 및 질소의 농도와 활성탄의 효과를 확인하여 대량증식에 알맞은 배지조건을 확인하고자 하였다. 또한, 기외에서 포자체 형성에 적합한 배양토를 구명하여, 가지고비고사리의 안정적인 효과적 대량증식방법을 확립하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

가지고비고사리의 포자는 2015년 충북대학교 부속농장의 무가온 하우스에 재배중인 식물체의 성숙한 포자엽에서 채집하였으며, 채집 후 4±1°C의 저장고에 건조상태로 보관하

여 연구의 재료로 사용하였다.

### 기내 전엽체 증식실험

포자를 기내 발아시켜 전엽체를 획득한 후 sucrose 3% (w/v), agar 0.8% (w/v), pH를 5.8로 조절한 MS 배지(Murashige and Skoog 1962)에 계대배양하여 실험의 재료로 사용하였다. 전엽체 증식에 적합한 배지를 찾기 위하여, MS stock의 총 농도를 1/4, 1/2, 1배로 조절한 배지와 Knop 배지를 조성하였으며, 200 ml 멸균배양병에 30 ml씩 분주하였다. 이후 전엽체 300 mg을 멸균수 1 ml와 함께 메스로 곱게 다졌으며, 배지 표면에 전엽체 조각이 골고루 퍼지도록 멸균수 1 ml를 추가로 첨가하여 접종하였다. 이후 배지 내 구성물질이 전엽체 증식에 미치는 영향을 확인하고자, 선행연구에서 선발된 배지를 기본으로 sucrose(0, 1, 2, 3, 및 4%)와 활성탄(0, 0.2, 0.4 및 0.8%)의 농도를 달리하였으며, 질소급원  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (1:2)의 농도를 30, 60, 120 mM로 조절하여 실험을 수행하였다. 모든 실험은 4반복 수행하였다.

### 기외 포자체 형성실험

실험재료는 상기 실험과 동일한 전엽체를 사용하였으며, Jang et al. (2019a)의 방법을 참고하여 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 포자체 형성에 적합한 토양조건을 구명하고자, 시판중인 원예상토(Hanareum no. 2, Shinsung Mineral Co., Ltd., Korea), 피트모스(SunShine, Sun Gro Horticulture, Canada), 펄라이트(Newpershine no. 2, GFC. Co., Ltd., Korea) 및 마사토(2 mm, Samgye Masato, Korea)를 단용 또는 혼용하여 8종류의 배양토를 조성하였다. 모든 배양토는 사각분(75×75×75 mm, Cosmo Corporation, USA)에 충전하였다. 이후 전엽체 1.0 g을 증류수 25 ml와 함께 10초간 핸드블렌더(V-8000, Boowon, Korea)로 분쇄한 다음, 토양이 충전된 사각분에 균일하게 분주하였으며, 플라스틱 상자[503×335×195 mm, SPC532(DP-D), SH Plastic, Korea]에 배치하였다. 실험기간 동안 플라스틱 상자 내부에 1 cm 높이로 저면관수 하였으며, 상자의 상부에 유리판을 덮어 자체습도(84±1.4%)를 유지하였다. 이후 전엽체가 형성되는 3주부터 1일 1회 두상관수를 실시하여 포자체 형성을 유도하였다.

### 배양환경 및 조사방법

기내 전엽체 증식실험은 온도 25±1.0°C, 광도 30±2.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 광주기를 16/8 h로 조절하였다. 8~10주간 배양 후 배양병 당 증식된 전엽체의 생체중을 측정하였으며, 형태형성과 발달을 실험현미경(SZ51, Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 기외 포자체 형성실험은 온도 25±1.0°C, 광도 43±1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 광주기가 16/8 h로 조절된 배양실 내에 완전임

의 배치하여 12주간 재배하였다. 조사항목은 형성된 포자체의 수를 조사하였으며, 균일한 10개의 포자체를 선발하여 엽장, 엽폭, 엽수, 근수, 근장 및 생체중을 조사하였다.

통계처리

실험에서 조사된 모든 측정값들에 대해 SAS 프로그램 (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 평균과 표준오차를 구하였으며, 던킨다중검정법을 통해 유의성을 검정하였다( $p < 0.05$ ).

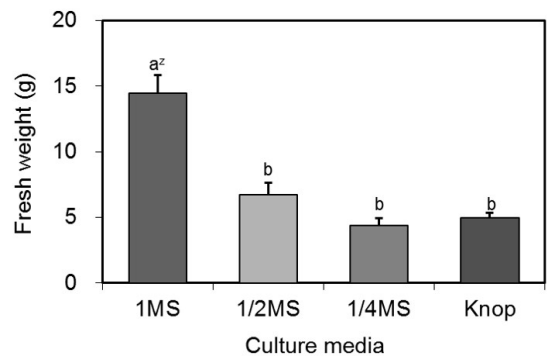
결과 및 고찰

기내 전엽체 증식 실험

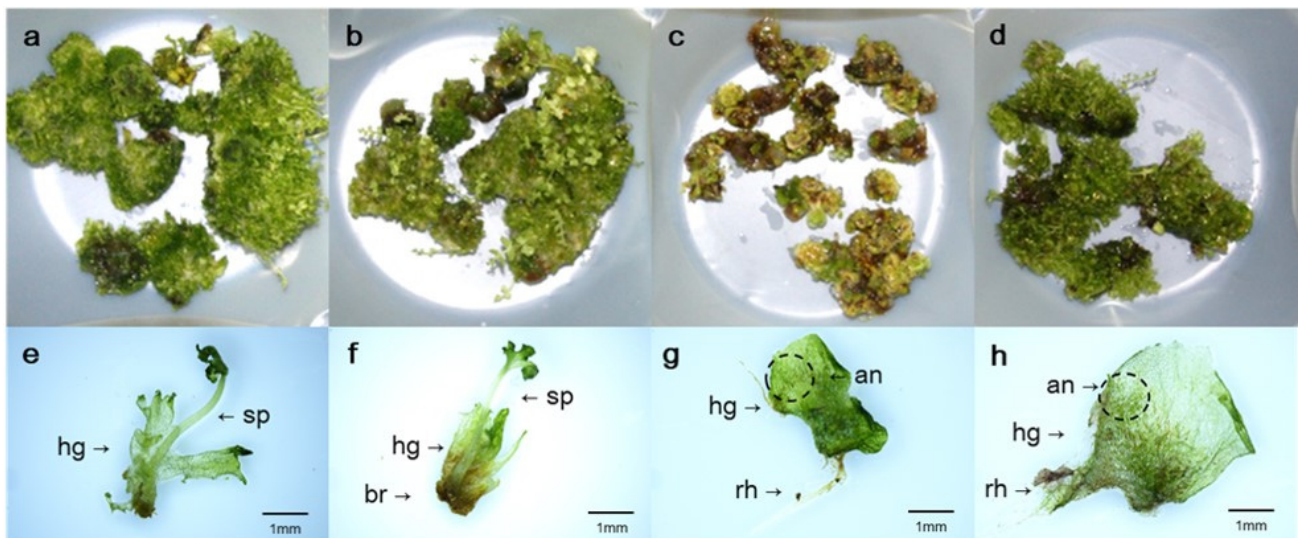
전엽체 증식에 적합한 배지를 구명하기 위하여, 무기물 및 비타민의 농도를 달리 첨가한 배지에 전엽체를 다져 접종한 후 10주간 배양하였다. 그 결과, 배지의 무기물 및 비타민의 함량이 비교적 높은 1MS 배지에서 14.5 g으로 48.3배 증가하여 전엽체의 증식이 가장 우수하였다(Fig. 1). 반면 1/2MS, 1/4MS 배지에서는 생체중이 6.7, 4.4 g으로 두 처리구간 유의적인 차이는 없었으며, Knop 배지의 경우 5.0 g으로 앞선 두 배지와 마찬가지로 낮은 증가율을 보였다. 4개 처리구를 비교해 보았을 때 MS 계열의 배지에서 무기물과 비타민의 함량이 증가할수록 생체중이 증가하는 경향을 보였다. 전엽체의 형태형성을 현미경으로 관찰한 결과 1MS 배지에서 성장한 전엽체는 정상적으로 발달하였으며, 일부 전엽체는 수정이 이루어져 포자체의 형성이 관찰되었다. 1/2MS 배지의 경

우도 마찬가지로 포자체를 형성하였지만 일부 전엽체에서 갈변화가 관찰되었다(Fig. 2). 반면 1/4MS와 Knop 배지에서는 대부분의 전엽체가 발달과정 중에 있었으며, 형태적으로는 정상적인 발달양상을 보였지만 1MS 배지보다 기관의 구조적인 발달이 느리다는 것을 확인할 수 있었다.

포자체의 형성은 생식기관의 형태형성이 정상적으로 진행되었다고 볼 수 있는데, 육안으로 관찰한 결과, 전엽체 증식이 가장 우수하였던 1MS 배지에서 가장 많은 포자체가 형성되어 배지내 무기물 및 비타민의 농도가 증가할수록 생식기관의 형태형성 또한 왕성하게 이루어 진다는 것을 확인할 수 있었다. 포자체가 형성될 경우 전엽체의 노화가 시작된다. 때문에 전엽체를 증식시켜야 하는 실험의 목적에 따라 포자체가 형성되지 않게 하기 위해 이후 실험에서는 배양기간을 10주에서 8주로 실험하는 것이 좋다고 생각된다.



**Fig. 1** Effect of culture media on prothallus growth of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured for 10 weeks. Bars represent standard error (n=4). <sup>a</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test ( $p < 0.05$ )



**Fig. 2** Cultural response and sexual organ formation from prothallus of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured in different media. (a)-(d), prothallus after 10 weeks of culture; (e)-(g), 1 ×, 1/2 ×, and 1/4 × Murashige and Skoog (MS) media, respectively; (h), Knop medium; an, antheridium; br, browning; hg, heartshaped gametophyte; rh, rhizoid; sp, sporophyte

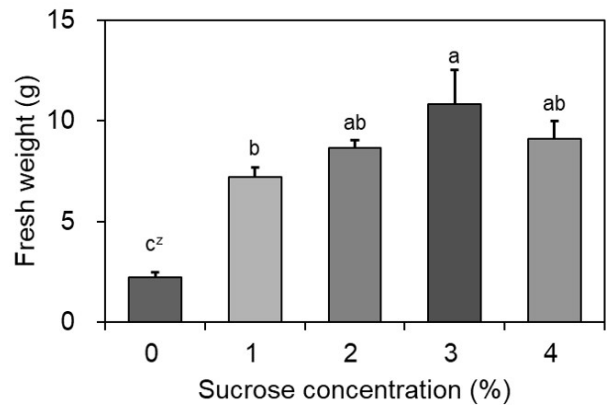
결과적으로, 가지고비고사리의 전엽체 증식은 배지에 함유된 무기물 및 비타민의 농도가 적으면 증식률이 낮을 뿐만 아니라 기관의 구조적 발달도 느린 것을 알 수 있으며, 포자체 형성시에도 전엽체의 일부가 갈변화 되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 가지고비고사리의 전엽체 증식을 위해서 배지의 무기물 및 비타민의 함량이 높은 IMS 배지를 배양에 이용하는 것이 대량증식에 가장 효과적이며 전엽체의 형태형성에도 우수하다고 판단되었다.

양치식물의 전엽체 배양 시 배지에 함유된 무기물과 비타민의 농도에 따라 생육이 다르게 나타나는 것은 이미 많은 연구를 통해 밝혀져 있다. 같은 방법으로 실험되었던, 관중과의 가는쇠고사리는 IMS 배지에서 생육이 가장 좋았으며 (Cho et al. 2017), 잔고사리과 돌토끼고사리는 2MS 배지에서 생육이 가장 왕성하였다(Cho and Lee 2017). 반면 고비과 고비는 배지내 무기물과 비타민의 농도가 비교적 낮은 Knop 배지에서 생육이 가장 좋았다(Shin and Lee 2009). 이러한 연구의 결과들로 알 수 있듯이 양치식물은 각각 요구하는 영양물질의 차이가 있어서 종 별로 알맞은 배양배지의 농도를 구명하는 것이 매우 중요하다고 생각된다.

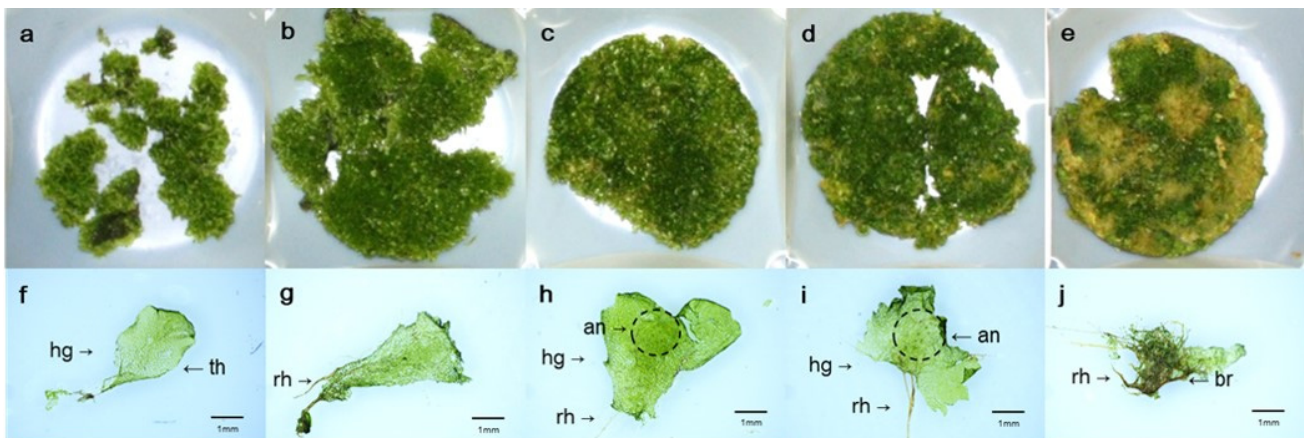
상기실험에서 가장 우수한 증식률을 보인 IMS 배지에 sucrose의 농도를 1~4%로 달리 첨가하여 실험하였으며, 실험기간은 포자체가 형성되기 전까지인 8주간 배양하였다. 실험의 결과 농도에 따라 생체중의 차이를 확인할 수 있었다. Sucrose 3%를 첨가한 처리구에서 10.8 g으로 생체중이 36 배 증가되었다(Fig. 3). 반면, 무처리구는 2.2 g으로 가장 낮은 증가율을 보이며 배지 내 sucrose의 농도가 증가할수록 전엽체의 생체중이 증가하다가 4% 처리구부터는 감소하는 경향을 보였다. 전엽체의 발달을 현미경으로 관찰한 결과, 형태 및 기관의 형성에서도 차이가 있었다(Fig. 4). 무처리구는 엽육의 두께가 얇고 기관발달이 미숙한 것을 볼 수 있었으며, 1% 처리구도 비슷한 양상을 보였다. 2% 및 3% 처리구는 전

엽체에 장정기가 관찰되어 포자체 형성에 유리할 것으로 판단되며 형태도 심장형으로 발달되었다. 특히 3% 처리구는 가근이 다른 처리구에 비해 잘 발달된 것으로 보아 3%의 sucrose 처리가 전엽체의 형태형성 및 기관이 발달에 가장 적당한 농도라고 보여진다. 반면 4% 처리구는 비정상적인 형태로 발달하였으며 일부 갈변하여 생육이 좋지 못한 것으로 관찰되었다.

배지에 첨가된 sucrose는 식물이 성장할 때 탄소원으로 이용되며 양치식물의 전엽체 성장을 촉진시킨다고 알려져 있다(Dyer 1979). 저농도 sucrose 처리구에서 전체적인 발달과 전엽체의 증식률이 저조한 것으로 보아 배지 내 탄소원의 첨가가 필수적이라고 판단되었다. 하지만 배지 내 고농도의 sucrose는 삼투압에 의해 생육을 저해할 수 있고, 식물조직의 노화를 촉진한다는 보고가 있다(Hirsch 1975). 따라서 가지고비고사리의 전엽체 증식을 위해 배지내 sucrose의 농도는 전



**Fig. 3** Effect of sucrose concentrations on prothallus growth of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured for 8 weeks. Bars represent standard error (n=4). <sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )



**Fig. 4** Cultural response and sexual organ formation from prothallus of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured in different media. (a)-(e), prothallus after 8 weeks of culture; (f)-(j), 0, 1, 2, 3, 4% sucrose concentration; an, antheridium; br, browning; hg, heartshaped gametophyte; rh, rhizoid; th, thin thallus



엽체의 증가량과 형태형성 및 기관형성에서 가장 좋은 결과를 보인 3%가 알맞다고 판단된다.

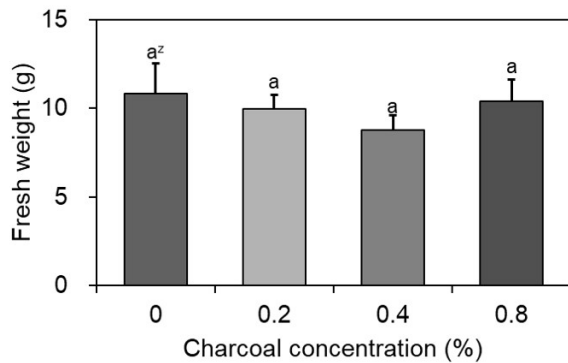
가지고비고사리의 배지내 활성탄의 농도가 전엽체 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 1MS 배지를 기준으로 활성탄의 농도를 0~0.8%로 다르게 첨가하여 8주간 배양한 결과, 생체중의 범위가 8.8~10.8 g으로 농도에 관계없이 모든 처리구에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5). 처리구별 전엽체의 형태형성을 현미경으로 관찰한 결과 4개 처리구 모두 전엽체가 정상적으로 발달하였으며 장정기의 형태도 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

활성탄은 세포의 성장과 발달을 향상시키기 위해 조직배양에 널리 사용되며(Thomas 2008), 다공성 구조의 형태로 미세한 구멍이 많아 배지내에서 독성물질과 폐놀성화합물 등을 흡착하여 식물생장에 도움을 주는 역할을 한다고 알려져 있다. 하지만 가지고비고사리의 전엽체 배양에서 활성탄 첨

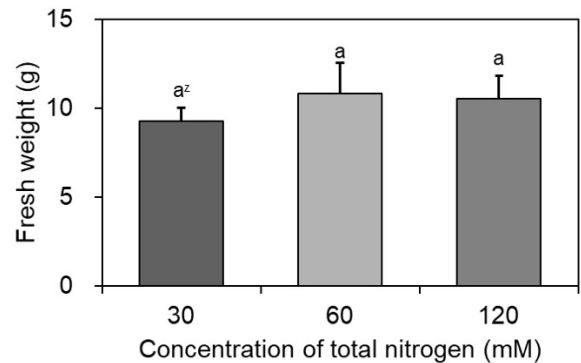
가배지의 효과는 유의한 차이가 없었다. 하지만 전엽체의 생육을 육안으로 관찰하였을때, 무처리구의 전엽체가 전체적으로 짙은 녹색을 띄고있어 다른 처리구에 비해 생육이 좋다고 판단된다. 따라서 가지고비고사리의 전엽체 증식을 위한 배지내 활성탄의 농도는 전엽체의 생육과 경제성을 고려하여 첨가하지 않는 것이 좋을 것이라고 판단된다.

배지내 질소급원의 농도가 전엽체 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 1MS 배지에  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_3^-$ 의 비를 1:2로 하여 30, 60, 120 mM로 다르게 첨가한 후 8주간 배양하였다. 그 결과 60mM에서 10.8g으로 가장 높은 생체중을 나타내었지만, 30 mM과 120 mM에서 9.3, 10.5 g으로 측정되어 세 처리구의 질소농도가 전엽체 증가량에 유의적인 효과를 나타내지 않았다(Fig. 7).

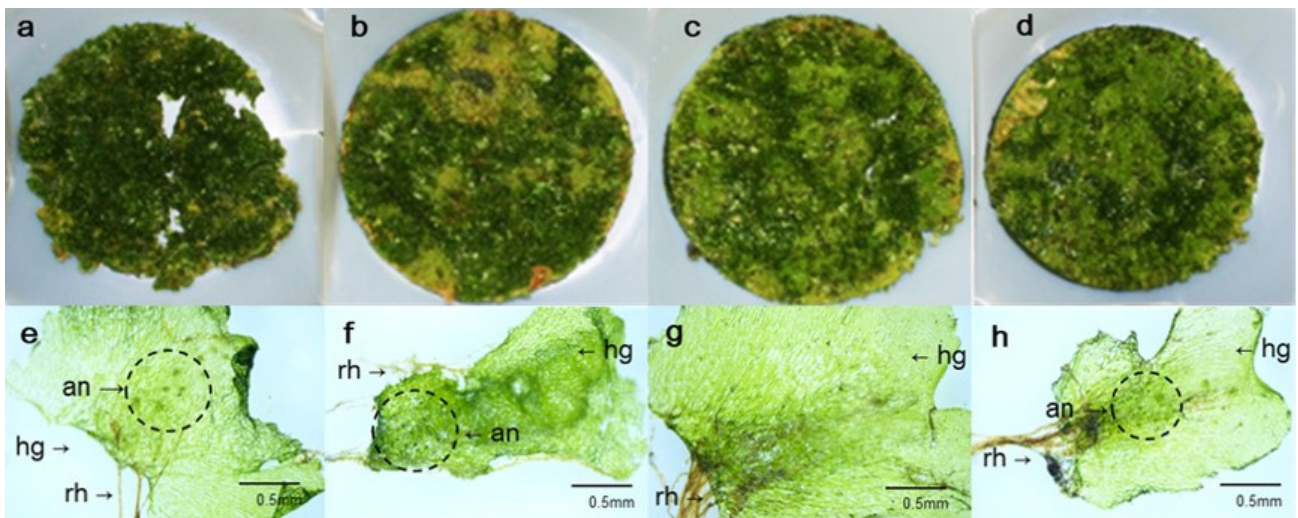
고비(Shin and Lee 2009), 가는쇠고사리(Cho et al. 2017)는 질소급원 또는 배지 성분의 증가가 생육을 저해한다고 알려



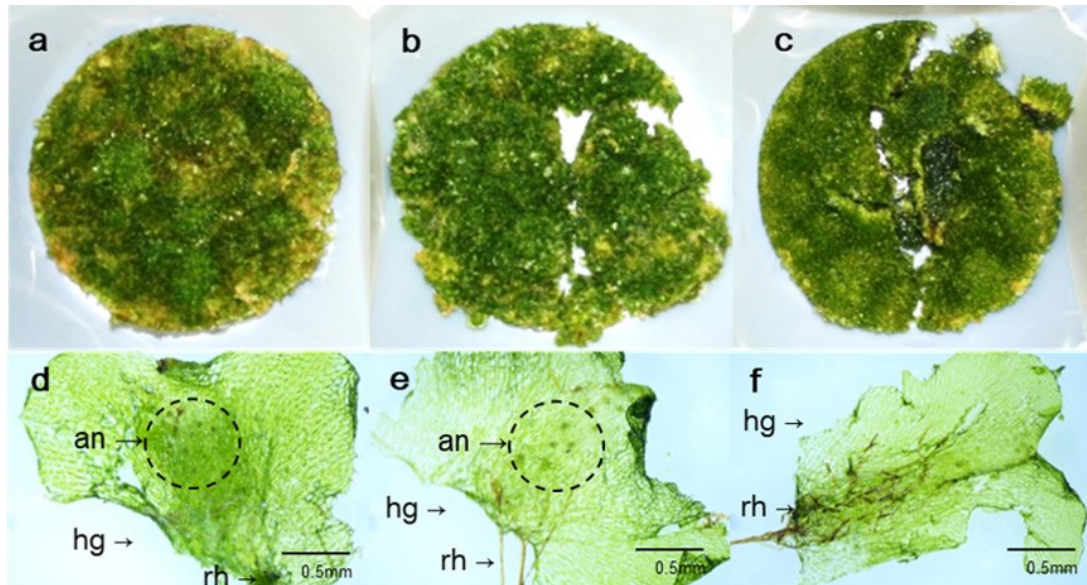
**Fig. 5** Effect of charcoal concentrations on prothallus growth of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured for 8 weeks. Bars represent standard error (n=4). <sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test (p < 0.05)



**Fig. 7** Effect of total nitrogen concentration on prothallus growth of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured for 8 weeks. Bars represent standard error (n=4). <sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test (p < 0.05)



**Fig. 6** Cultural response and sexual organ formation from prothallus of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured in different media. (a)-(d), prothallus after 8 weeks of culture; (e)-(h), 0, 0.2, 0.4, 0.8% charcoal concentration; an, antheridium; hg, heartshaped gametophyte; rh, rhizoid



**Fig. 8** Cultural response and sexual organ formation from prothallus of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels cultured in different media. (a)-(c), prothallus after 8 weeks of culture; (d)-(f), 30, 60, 120 mM total nitrogen concentration; an, antheridium; hg, heartshaped gametophyte; rh, rhizoid

**Table 1** Effect of soil types on sporophyte formation and growth of *Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels in vivo

Substrate <sup>z</sup>	No. of sporophytes /pot <sup>y</sup> (ea)	No. of leaves /plant (ea)	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)	
				Aerial part	Underground part
Hs1	0.0 ± 0.00 c <sup>x</sup>	0.0 ± 0.00 c	- <sup>w</sup>	-	-
Pt1	0.0 ± 0.00 c	0.0 ± 0.00 c	-	-	-
Hs2-Pr1	153.8 ± 42.27 b	2.2 ± 0.13 a	49.0 ± 4.88 c	13.9 ± 0.51 a	-
Hs2-D1	228.0 ± 20.67 a	2.0 ± 0.00 b	66.7 ± 4.81 a	10.0 ± 0.69 b	-
Pt2-Pr1	0.0 ± 0.00 c	0.0 ± 0.00 c	-	-	-
Pt2-D1	37.8 ± 20.98 c	2.0 ± 0.00 b	58.4 ± 3.33 b	13.5 ± 0.78 a	-
Hs1-Pt1-Pr1	0.0 ± 0.00 c	0.0 ± 0.00 c	-	-	-
Hs1-Pt1-D1	0.0 ± 0.00 c	0.0 ± 0.00 c	-	-	-
Substrate	No. of roots /plant (ea)	Root length (mm)	Fresh weight (mg/sporophyte)		
			Aerial part	Underground part	
Hs1	0.0 ± 0.00 c	-	-	-	
Pt1	0.0 ± 0.00 c	-	-	-	
Hs2-Pr1	1.7 ± 0.30 c	21.7 ± 4.44 c	19.5 ± 2.86 a	2.4 ± 0.29 b	
Hs2-D1	1.1 ± 0.38 a	34.3 ± 2.92 a	14.5 ± 0.81 b	3.4 ± 0.58 a	
Pt2-Pr1	0.0 ± 0.00 c	-	-	-	
Pt2-D1	1.3 ± 0.00 b	30.8 ± 2.31 b	15.3 ± 1.41 b	1.8 ± 0.35 b	
Hs1-Pt1-Pr1	0.0 ± 0.00 c	-	-	-	
Hs1-Pt1-D1	0.0 ± 0.00 c	-	-	-	

<sup>z</sup>Hs, horticultural substrate; Pt, peatmoss; Pr, perlite; D, decomposed granite.

<sup>y</sup>Pot (75×75×75 mm) containing 0.3L cultural medium was used for this experiment.

<sup>x</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

<sup>w</sup>Non-formation of sporophyte.

저 있지만, 가지고비고사리는 질소급원 농도에 관계없이 전엽체의 생육이 양호하였다. 현미경을 이용하여 전엽체의 형태를 관찰한 결과, 모든 처리구에서 심장형의 전엽체를 형성하였으며, 30 mM과 60 mM의 처리구에서는 장정기가 관찰되었다(Fig. 8). 가지고비고사리는 무기물 및 비타민의 농

도가 높은 배지에서 전엽체의 생체중이 증가한 것으로 보아 질소급원에 따라서도 차이가 있을 것으로 예상하였으나, 질소의 첨가량에 따른 유의적인 차이는 없었다. 따라서 전엽체의 생체중을 고려하여 배지내 질소는 60 mM의 농도로 첨가하는 것이 좋다고 판단된다.

## 기외 포자체 형성실험

8가지의 배양토에 분주한 전엽체를 12주 동안 재배한 결과, 원예상토:마사토를 2:1(v:v)로 혼용한 토양에서 228.0개로 가장 많은 포자체가 형성되었으며, 포자체의 평균 엽장과 근장에서도 가장 우수한 생육을 나타내었다. 다음으로 원예상토:펠라이트 2:1(v:v) 혼용토양, 피트모스:마사토를 2:1(v:v)로 혼용한 토양에서 각 153.8, 37.8개의 포자체가 형성되었다. 반면, 원예상토:피트모스:펠라이트 1:1:1(v:v:v) 혼합토양에서는 전엽체가 형성되기는 하였지만, 포자체가 형성되지는 않았으며, 원예상토 단용, 피트모스 단용 토양과 피트모스:펠라이트 2:1(v:v), 원예상토:피트모스:마사토 1:1:1(v:v:v)로 혼용한 토양에서는 포자체가 형성되지 않았다(Table 1).

여러 종류의 토양을 혼합하여 배양토를 조성할 때, 토양의 통기성, 보수력 및 공극률과 같은 물리적인 성질을 감안하여 적절하게 조합 후 작물의 생육특성에 맞는 배양토를 조성하는 것이 중요하다. 그러나 실험에 사용된 피트모스는 입자의 크기가 작고 보수력이 높은 토양으로 재배기간 동안 저면관수로 토양 내 수분이 과다하여 통기성과 공극률에 악영향을 미쳐 전엽체의 재분화가 이루어지지 않아 포자체 또한 형성되지 않은 것으로 생각된다. 원예상토 또한 전체 성분에서 코코피트가 차지하는 비율이 높은 토양으로 보수력이 높은 토양이다.

Jang et al. (2019a)의 연구에서 본 실험에 사용된 동일한 토양의 물리성을 분석한 결과, 원예상토 또는 피트모스를 단용한 토양은 전체 토양에서 액상이 차지하는 비율이 80% 이상으로 수분함량이 매우 높은 토양으로 보여진다. 한편 가지고비고사리의 포자체가 형성된 세가지 혼합토양은 액상의 비율이 50~80% 사이에 분포하고 있다. 이 세가지 혼합토양은 원예상토 또는 피트모스에 마사토 또는 펠라이트가 혼합되어 있는 토양으로 가지고비고사리가 성장하는데 적당한 보수력과 통기성을 유지한 것으로 판단된다. 입자가 비교적 큰 마사토와 펠라이트의 경우 적절한 배합을 통해 토양의 통기성을 개선하며, 공극률을 높일 수 있다. 이러한 토양은 전엽체가 성장하고 수정되는데 필요한 수분을 적당히 보유하고 있으며, 적절한 통기성을 가지고 있어 포자체의 형성과 발달을 유도한 것으로 생각된다. Cho et al. (2017)의 연구에 따르면 가는쇠고사리의 경우에도 피트모스를 단용한 토양에서 포자체가 발생하지 않았다. 좀나도히초미의 경우 원예상토에 마사토를 혼합하여 재배하였을 때 포자체가 가장 많이 형성되었다(Kwon et al. 2017). 하지만 토양의 높은 보수력이 포자체 형성 및 생육저하에 절대적인 요인은 아니며 종의 특성과 자생지의 환경에 따라 생육에 알맞은 배양토의 종류가 각기 다르다(Shin et al. 2010).

위의 결과를 종합해보면, 원예상토 또는 피트모스를 단용한 용토는 토양의 통기성과 공극률이 적어 가지고비고사리의 포자체 형성에 적합하지 않았다. 토양 내 물리성 개선을

위해 보수력이 높고 입자가 작은 토양끼리의 혼합은 지양해야 될 것으로 보이며, 마사토와 같이 입자가 큰 인공토양을 혼합하여 재배환경을 개선하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 따라서 가지고비고사리의 포자체를 대량으로 형성하기 위해서는 비교적 적당한 보수성을 가지며, 통기성이 좋은 원예상토:마사토를 2:1(v:v)로 혼합한 토양이 적합하다고 판단된다.

## 적 요

본 연구는 다양한 분야에서 활용이 가능한 봉의꼬리과 가지고비고사리[*Coniogramme japonica* (Thunb.) Diels]의 전엽체와 포자체의 대량번식을 위한 적정 배양방법을 구명하고자 수행되었다. 전엽체 증식을 위해 기내에서 발아하여 계대배양한 전엽체를 재료로 사용하여 1/4-1배로 조절된 MS 배지와 Knop 배지에 10주간 배양한 결과, IMS 배지에서 전엽체의 생체중이 14.5 g으로 가장 많이 증가하였다. 이후 IMS 배지에 sucrose와 활성탄, 질소급원의 농도를 다르게 조절하여 8주간 배양한 결과, 3%의 sucrose 농도에서 전엽체의 생체중이 10.8 g으로 증식률이 가장 좋았다. 활성탄의 경우 네 처리구가 8.8~10.8 g 범위로 농도에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. 질소급원은  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 의 비를 1:2로 하여 30, 60, 120 mM의 농도로 첨가한 결과, 세 처리구 모두 생체중에 유의한 차이가 없었으며 비슷한 수준으로 증가하였다. 토양종류에 따른 포자체의 형성을 실험한 결과, 원예상토와 마사토를 2:1(v:v)로 혼합한 토양에서 228.0개로 가장 많은 포자체가 형성되었다. 반면에 피트모스와 마사토를 2:1(v:v)로 혼합한 토양을 제외하고 피트모스가 첨가된 토양에서는 포자체가 형성되지 않았다.

## 사 사

본 연구는 국립수목원 유용식물증식센터“산림식물 활용기반 구축을 위한 대량증식법 개발, KNA1-2-25, 16-3”의 사업비 지원에 의해 수행되었음.

## References

- Cho JS, Han JH, Lee CH (2017) Effects of medium components and composition on mass propagation of *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale. Korean J Horticult Sci 35:131-141
- Cho JS, Lee CH (2017) Several factors affecting mass production of *Microlepia strigosa* (Thunb.) C. Presl sporophytes. Korean J Horticult Sci 35:46-58
- Dyer AF (1979) The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London

- Fernández H, Bertrand AM, Sánchez-Tamés R (1999) Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell Tiss Org* 56: 211-214
- Fernández H, Revilla MA (2003) In vitro culture of ornamental ferns. *Plant Cell Tiss Org* 73:1-13
- Grzyb M, Kalandyk A, Waligórski P, Mikuła A (2017) The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell Tiss Org* 129:387-397
- Hirsch AM (1975) The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes. *Plant Physiol* 56:390-393
- Jang BK, Cho JS, Kwon HJ, Lee CH (2019a) Optimal conditions for spore germination and gametophyte and sporophyte production in the autumn fern *Dryopteris erythrosora*. *Hortic Environ Biote* 60:115-123
- Jang BK, Cho JS, Lee CH (2019b) Propagation methods for gametophyte proliferation and sporophyte formation in silver cloak fern (*Cheilanthes argentea*). *Hortic Environ Biote* 60: 435-442
- Korea Biodiversity Information System (KBIS) (2019) Korea National Arboretum. Pocheon, Korea. Available via <http://www.nature.go.kr/kbi/plant/pilbk/selectPlantPilbkDtl.do?plantPilbkNo=35172> (accessed data: 20 Feb. 2019)
- Korea Fern Society (KFS) (2005) Illustration Fern Native of Korea. Geobook, Seoul, Korea
- Kwon HJ, Han JH, Lee CH, Kim SY (2017) Conditions of in vitro spore germination and prothallium culture for sporophyte propagation of *Polystichum braunii* (Spenn.) Fee. *J Plant Biol* 44:454-461
- Lee CS, Lee KH (2018) Pteridophytes of Korea: Lycophytes & Ferns. Geobook, Seoul, Korea
- Liu Y, Wujisguleng W, Long C (2012) Food uses of ferns in China: A review. *Acta Soc Bot Pol* 81:263-270
- Makowski D, Tomiczak K, Rybczyński JJ, Mikuła A (2016) Integration of tissue culture and cryopreservation methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. *Acta Physiol Plant* 38:19
- Mikuła A, Pożoga M, Tomiczak K, Rybczyński JJ (2015) Somatic embryogenesis in ferns: A new experimental system. *Plant Cell Rep* 34:783-794
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497
- Shin SL, Lee MY, Choi JS, Lee CH (2010) Effect of plant growth regulators on sporophyte formation from in vitro cultured prothallus of bracken fern. *Korean J Hortic Sci* 28:301-306
- Shin SL, Lee CH (2009) In vitro medium composition and culture method affecting masspropagation of *Osmunda japonica* Thunb. prothalli. *Korean J Hortic Sci* 27:299-304
- Teng WL (1997) Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platyserium bifurcatum*. *Plant Cell Rep* 17:77-83
- Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26:618-631