

신초 cluster 형성에 의한 *Lilium Asiatic Hybrid* 'Hae Hwa' 의 기내번식

한봉희* · 유희주 · 예병우 · 구대회
원예연구소

In Vitro Propagation of *Lilium Asiatic Hybrid* 'Hae Hwa' via the Formation of Shoot Clusters

HAN, Bong Hee* · YU, Hee Ju · YAE, Byeoung Woo · GOO, Dae Hoe
National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon, 440-706

ABSTRACT This experiment was conducted to micropropagate bulblets via shoot cluster formation and massproduce normal bulblets from the sections of proliferated shoot clusters in *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa'. The induction of shoot clusters from the culture of bulblet sections was more effective than that of bulb scales on MS medium with 1.0 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA. Proliferation of shoot clusters from the formed shoot cluster sections was the most favorable on medium containing 5.0 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA. The formation and the growth of bulblets from shoot cluster sections were achieved effectively on medium with 60~90 g/L sucrose. The leaves derived from shoot clusters grew vigorously but the bulblets from shoot clusters grew very poor in 5L air-lift bioreactor culture. By the addition of 30 mL fresh liquid medium containing double strength MS salts, 250 g/L sucrose and 5 g/L activated charcoal after 8 weeks in the shoot cluster culture on MS medium with 5.0 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA, the number of bulblets was increased in light condition, but the growth of bulblets was not affected by light. Bulblet production was possible with the bulblet product at 53 to 68 mg in fresh weight by liquid medium addition after the proliferation of shoot cluster.

Key Words: BA, bioreactor, liquid medium addition, sucrose

서 론

나리의 조직배양은 인편에서 부정아를 직접 유지시키는 인편배양이 가장 집중적으로 연구되어 왔으며, 인편에서 많은 자구를 생산하고 형성된 자구를 빠르게 비대시키는 데 목적을 두었다 (Takayama and Misawa 1979; Van Aartrijk and Blom-Barnhoorn 1981; Stimart and Ascher 1981; Leshem et al. 1982). 그러나, 기내 인편배양에 의한 나리의 증식은 절편체당 증식되는 자구수가 적고, 생성된 자구가 작으며, 자구가 충분히 성숙하기까지는 3~4개월의 긴 기간이 소요된다 (Takayama and Misawa 1979; Niimi 1984). 또한 고농도의 생장조절제 (cytokinin)가 첨가된 배지에서 나리 인편을 배양

하면 자구의 기부가 발달한 비정상적인 자구가 형성되고 이러한 자구에서 잎을 가진 소인편이 많이 분화된다고 하였으며 (Takayama and Misawa 1979; Maesato et al. 1994; Novak and Petru 1981; Niimi 1985), 이러한 비정상적인 자구를 절단하여 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 배양하면 정상적인 자구가 형성된다고 하였다 (Han et al. 1999a,b). 이러한 비정상적인 자구절편을 생물반응기에서 배양하면 정상적인 자구의 비대가 매우 촉진되며, 배지첨가 방법을 이용하면 소자구의 생산효율이 현저하게 증가한다고 하였다 (Han 2001). Nhut (1998)도 *L. longiflorum*의 경정배양에서 유사한 연구 결과를 발표하였으며 이러한 비정상적인 자구를 발근하여 온실에 재식하면 정상적으로 개화하였다고 하였다. 이러한 보고들은 생장조절제가 첨가된 배지에 나리 인편, 줄기 등을 배양하면 비정상적인 자구가 형성되며 이러한 비정상적인 자구를 절단하여 배양하면 정상적인 자구를 대량증식할 수 있

*Corresponding author. Tel 031-240-3419 Fax 031-240-3683
E-mail bhhan581002@hanmail.net

을 뿐만 아니라 (Han et al. 1999a,b; Nhut 1998), 생물반응기 배양 및 배지첨가 방법을 이용하여 비정상적인 자구에서 정상적인 소자구 생산 효율과 자구비대를 촉진할 수 있다는 것 (Han 2001)을 나타내고 있다. 그러나 이러한 연구는 *L. orientalis* hybrids와 *L. longiflorum* 계통의 품종에서 진행되었으나 *L. asiatic hybrids*에서는 인편에서 정상적인 자구를 형성, 비대시키는 고전적인 증식방법이 사용되고 있다. 본 시험은 원예연구소에서 육성된 *L. asiatic hybrid* 'Hae Hwa'를 유사자구 또는 비정상적인 자구형성을 통하여 대량증식하고, 생물반응기 및 배지첨가 방법을 이용하여 형성된 신초 cluster에서 정상적인 자구를 대량생산하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 배지

실험재료는 원예연구소에서 육성된 *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa'를 사용하였으며, 신초 cluster를 유도하기 위하여 sucrose 90 g/L가 첨가된 MS (Murashige & Skoog 1962) 기본배지에서 형성된 소자구를 뿌리와 잎을 제거한 다음, 소자구의 인편과 소자구를 4개로 종단한 자구절편을 사용하였다. 신초 cluster를 증식하기 위하여 신초 cluster를 7~10 mm 정도로 종으로 절단하여 배양하였다. 배지는 MS 기본배지를 사용하였으며 인편 및 자구 절편체에서 신초 cluster를 유도하기 위하여 BA 1.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 고체배지를 사용하였고 신초 cluster를 증식하기 위하여는 BA 0.5~5.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 고체배지를 사용하였다. 증식된 신초 cluster에서 정상적인 자구를 형성 및 비대시키기 위하여 증식과 동일한 방법으로 신초 cluster를 종으로 절단하여 배양하였으며, 생물반응기를 이용한 자구비대 실험에서도 동일한 방법으로 신초 cluster를 종으로 절단하여 배양하였다. 배지는 MS 기본배지에 sucrose를 30~90 g/L 첨가하여 고체배지 및 생물반응기에서 sucrose가 정상적인 자구의 형성 및 비대에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 소자구의 생산효율을 증가시키기 위하여 신초 cluster를 증식한 다음, 동일용기에 일정량의 액체배지를 첨가하여 정상적인 자구를 형성 및 비대시키는 배지첨가 방법을 실시하였다. 배지첨가는 2배 MS 염류와 sucrose 250 g/L, 활성탄 5 g/L가 첨가된 액체배지 30 mL를 신초 cluster 증식 8주 후에 동일용기에 첨가하였으며, 명, 암배양으로 나누어 배양하였다. 배지는 pH를 5.8로 조절한 다음, 고압멸균기 121°C에서 15분간 고압멸균하였으며, 배양병 (450 mL, 삼광병유리)에 80 mL의 배지를 분주하였다. 생물배양기의 배지는 5L 삼각플라스크에 3L의 배지를 넣고 고압멸균기 121°C에서 40분간 고압멸균하여 주입하였다. 배지첨가는 시험관 (ϕ 30 mm × 20 cm)에 30 mL 액체배지를 준비하여 첨가하였다.

배양체의 성장조사

신초 cluster의 유도 및 증식은 배양 6주 후에, 신초 cluster 절편체에서 자구의 비대 및 생물반응기에서 자구의 비대는 배양 12주 후에, 배지첨가는 액체배지를 첨가한 후 8주 후에 자구수, 생체중, 자구무게, 자구직경 등을 조사하였다. 반복은 신초 cluster 유도, 증식 및 신초 cluster에서 자구비대 실험에서는 배양병 (450 mL, 삼광병유리)에 절편체를 13개씩 배양하여 처리당 4개로 4반복하였다. 생물반응기는 5L air lift 생물반응기를 사용하였고 처리당 2대로 2반복하였다. 생물반응기에 공기는 200 L/min.을 주입하였으며 배양온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조절되는 배양실에서 명배양 ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$, 16시간/일 조명) 또는 암배양하였다.

결과 및 고찰

신초 cluster를 유도하기 위하여 나리의 인편과 자구절편을 MS 기본배지에 BA 1.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지에서 배양하였다 (Table 1, Figure 1). 배양 6주 후, 인편 및 자구절편에서 작은 자구가 형성되고 인편엽이 생육하여 신초 cluster를 형성하였다. 인편과 자구절편체에서 2~2.6개의 신초가 형성되어 신초수는 차이를 나타내지 않았다. 그러나 인편보다는 자구절편을 배양하는 것이 신초길이, 생체중, 자구무

Table 1. The growth responses of bulb scales and bulblet sections in *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa' on MS medium containing 1.0 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA after 6 weeks in culture.

Explant	No. of shoots / explant	Shoot length (mm)	Fresh wt. /explant (mg)	Bulblet fresh wt./explant (mg)	Diameter of bulblet (mm)
Bulb scale	2.6 a ^a	11 b	105 b	69 b	2.7 a
Bulblet section	2.0 a	24 a	203 a	103 a	3.5 a

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

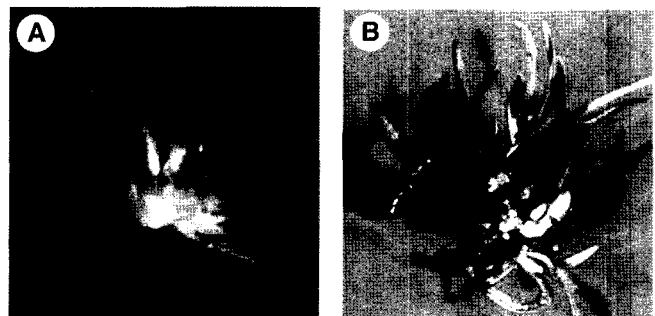


Figure 1. Formed shoot clusters of *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa' on the medium containing BA; (A, Shoot cluster induced from bulblet sections; B, Proliferated shoot clusters)

계, 자구직경에서 높아 인편배양에서 보다 더 큰 자구가 형성되었다. 따라서 이하에서는 자구절편 유래의 것을 사용하였다. Han 등 (1999a)은 *L. oriental hybrid* 'Casa Blanca' 배양에서 나리 인편을 cytokinin이 첨가된 배지에서 배양하면 저반부가 이상 비대된 비정상적인 자구가 형성되고 이것이 자구 cluster로 발육한다고 보고하였다. Nhut (1998)는 *L. longiflorum*의 배양에서 2~3마디를 가진 줄기를 BA가 첨가된 배지에서 배양하면 비정상적인 자구가 형성되고 이것은 신초로 발육한다고 하였다. 본 실험에서도 인편과 자구 절편체에서 신초가 발생하여 생육하였다.

인편에서 형성된 신초 cluster 절편을 MS배지에 IAA 0.5 mg/L와 BA 0.5~5.0 mg/L가 첨가된 배지에서 6주간 배양한 결과 (Table 2), 절편체로부터 3.5~5.6개의 신초가 증식되었다. 대조구 및 BA 1.0 mg/L 이하의 농도에서는 형성된 신초가 정상적인 자구와 매우 유사하였으나 BA 고농도에서는 비정상적인 자구가 발생하여 로제트 형태의 신초 cluster로 생육하였다. 특히 MS 배지에 IAA 0.5 mg/L와 BA 5.0 mg/L 첨가배지에서 신초수 및 형성된 신초무게가 양호하여 신초 cluster의 증식에 적합하였다 (Table 2, Figure 1). Han 등 (1999a)은 *L. oriental hybrid* 'Casa Blanca' 배양에서 비정상적인 자구절편체에서 자구 cluster의 증식은 MS 배지에 BA 2.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지가 가장 효과적이

라고 하였다. Nhut (1998)도 *L. longiflorum*의 배양에서 유사 자구를 절단하여 배양하면 유사자구 절편체에서 로제트 형태의 다수의 신초가 발육하며 신초수는 BA 농도에 따라 달라지고 0.5 mg/L 농도에서 가장 많았다고 하였다. 그러나 *L. asiatic hybrid* 'Hae Hwa'에서는 BA 5.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지에서 양호하였다. 이러한 결과는 사용되는 나리의 종이 다르기 때문에 나타나는 것으로 생각되었다.

증식된 신초 cluster 절편체에서 정상적인 자구를 형성 및 비대시키기 위하여 MS배지에 sucrose가 첨가된 배지에서 12주간 배양하였다. 자구수, 신초길이, 생체중은 sucrose 농도에 관계없이 비슷하였으나 형성된 자구무게 및 직경은 sucrose 60~90 g/L가 첨가된 배지에서 높아 자구비대가 양호하였다 (Table 3). 나리의 기내배양에서 sucrose는 자구비대에 필수적인 것으로 인식되고 있다 (Takayama and Misawa 1979; Han et al. 1999c; Nhut et al. 2001). Takayama와 Misawa (1979)는 *L. auratum*과 *L. speciosum*의 배양에서 MS배지에서 sucrose 농도가 증가할수록 자구무게도 비례하여 증가하였으며 90 g/L 또는 120 g/L의 sucrose가 첨가된 배지에서 최대의 생육을 얻을 수 있었지만 자구수는 차이를 나타내지 않았다고 보고하여 본 실험의 결과와 매우 유사하였다.

로제트 형태로 형성된 신초 cluster 절편을 sucrose가 30~90 g/L가 첨가된 5L air lift 생물반응기에서 배양한 결과 (Table 4), 인편엽만 무성하게 자라고 자구비대는 불량하였다

Table 2. Effect of BA on shoot multiplication from sections of shoot cluster in *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa' after 6 weeks in culture^a.

Treatment (mg/L)	No. of shoots /explant	Shoot length (mm)	Fresh wt. /explant (mg)	Bulblet fresh wt./explant (mg)	Diameter of bulblet (mm)
Control	3.5 bc ^b	122 a	1,241 a	293 bc	4.6 ab
BA 0.5	4.1 abc	49 c	876 b	436 ab	4.7 ab
1.0	4.1 abc	43 c	688 bcd	338 bc	4.8 a
2.0	2.3 c	37 c	410 d	223 c	4.6 ab
3.0	5.6 a	85 b	498 cd	198 c	3.6 b
5.0	4.5 ab	37 c	781 bc	570 a	5.4 a

^aMS medium containing 0.5 mg/L IAA was used.

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

Table 3. Effects of sucrose concentrations on bulblet growth from the sections of shoot clusters in *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa' after 12 weeks in culture^a.

Sucrose (g/L)	No. of bulblets /explant	Plant height (mm)	Fresh wt. /explant (mg)	Fresh wt. /bulblet (mg)	Diameter of bulblet (mm)
30	4.3 a ^b	173 a	1.59 a	86 b	6.4 b
60	3.4 a	162 a	1.78 a	114 a	8.4 a
90	3.7 a	141 a	1.78 a	129 a	8.8 a

^aMS medium was used.

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

Table 4. Effects of sucrose concentrations on bulblet growth from the sections of shoot clusters in *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa' by using 5 L airlift bioreactors after 12 weeks in culture^a.

Sucrose (g/L)	Multiple times in fresh wt.	No. of bulblets /explant	Plant height (mm)	No. of roots /explant	Fresh wt. /bulblet (mg)	Diameter of bulblet (mm)
30	10.2 b ^b	2.5 a	206 a	4.4 b	126 b	2.1 a
60	25.6 a	1.5 b	226 a	6.8 a	198 a	2.7 a
90	27.1 a	1.3 b	175 a	2.8 b	234 a	2.3 a

^aMS medium was used.

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

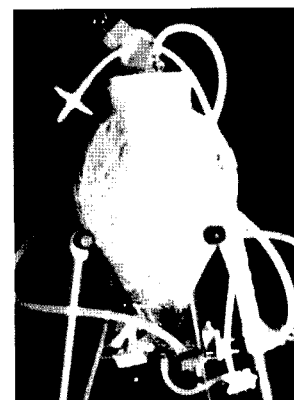


Figure 2. Shoot clusters of *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa' growing in 5 L airlift bioreactor.

(Figure 2). Han 등 (2001)은 *L. oriental hybrid* 'Casa Blanca' 배양에서 비정상적으로 형성된 자구절편을 생물반응기에서 배양하면 자구비대가 촉진되며 효과적으로 정상적인 자구를 생산할 수 있었다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 신초 cluster 절편체에서 자구가 비대되지 않고 인편엽만 무성하게 자랐는데 이는 생물반응기에서 나리의 비대는 종 및 품종 간에 많은 차이가 있어 나타나는 것으로 생각된다.

신초 cluster를 8주간 배양한 후에 2배 MS 염류와 sucrose 250 g/L, 활성탄 5 g/L가 첨가된 액체배지 30 mL를 동일용기에 배지첨가하여 명, 암배양으로 나누어 배양하였다 (Table 5). 자구수는 명배양에서 3.4개로 암배양 2.5개보다 많아 자구형성은 명배양에서 증가하였으나 자구무게는 명, 암배양에서 차이를 나타내지 않았다. 또한 명배양에서는 인편엽이 생육하였다 (Figure 3). 자구의 형성 및 비대에 미치는 광의 영향에 관하여는 많은 이견이 있다. Takyama와 Misawa (1979)는 기관형성에 관한 광의 효과는 확실하지 않지만 명배양에 의하여 인편엽의 발생이 촉진되었다고 하였고, Leshem 등 (1982)은 *L. longifolium* 배양에서 암배양은 부정아 형성을 감소시킨다고 보고하였다. Han 등 (1999a, b)은 *L. oriental hybrid*의 배양에서 명배양은 자구형성을 촉진하고

암배양은 자구비대를 촉진시킨다고 하였다. 많은 연구에서 명배양은 자구형성을 촉진시킨다는 것은 받아들여지고 있으나 자구비대에 관한 광의 영향은 종 및 품종 간에 많은 차이를 보이고 있다 (Han et al. 1999c). 또한 본 실험에서 액체배지만 첨가하여도 53~68 mg의 소자구가 형성되어 배지첨가에 의하여도 소자구의 비대가 가능하며, 신초 cluster를 증식한 후에 동일용기에 액체배지를 첨가하여 자구를 비대시키는 방법은 나리 조직배양 과정을 단순화하여 생산비를 감소시키는 데 매우 효과적일 것이라 생각되었다.

초 록

Lilium asiatic hybrid 'Hae Hwa'의 인편 및 자구절편 배양으로 신초 cluster를 유도하여 자구를 대량증식하고, 형성된 신초 cluster에서 정상적인 자구를 대량생산하고자 일련의 실험을 실시하였다. MS배지에 BA 1.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지에서 신초 cluster의 유도는 인편보다 자구절편을 배양하는 것이 효과적이었다. MS 배지에 BA 5.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L 첨가배지에서 신초수 및 신초무게가 양호하여 형성된 신초 cluster 절편에서 신초 cluster의 증식에 적합하였다. 또한 자구의 비대는 MS 배지에 sucrose 60~90 g/L가 첨가된 배지에서 양호하였다. MS 배지에 sucrose 30~90 g/L를 주입한 5L airlift 생물반응기에 신초 cluster 절편체를 배양한 결과, 신초만 무성하게 자랐고 자구비대는 불량하였다. 신초 cluster를 8주간 배양한 후에 2배 MS 염류와 sucrose 250 g/L, 활성탄 5 g/L를 포함한 액체배지를 동일용기에 첨가하여 배양한 결과, 명배양에서 형성된 자구수는 증가하였으나 소자구의 생장은 명, 암 모두 비슷하였다. 이로써 형성된 소자구의 무게가 53~68 mg이며, BA 5.0 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 신초 cluster를 증식한 후, 액체배지 첨가방법에 의하여 효율적인 소자구의 생산이 이루어졌다.

사사 - 본 논문은 과학기술부 특정연구개발 사업의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

Table 5. The growth responses of shoot cluster sections on the bulblet formation and growth according to cultural conditions in *Lilium asiatic hybrid* 'Hye Hwa' after 8 weeks in liquid medium addition^a.

Cultural condition	No. of bulblets /explant	Fresh wt. /explant (g)	Diameter of bulblet (mm)	Fresh wt. /bulblet (mg)
Dark	2.5 b ^b	1.72 a	4.0 a	68 a
Light ^c	3.4 a	2.02 a	3.5 a	53 a

^a30 mL of the medium containing twice strength MS salts, 250 g/L sucrose and 5 g/L activated charcoal was used.

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

^cAbout 40 μmol · m⁻² · sec⁻¹ of fluorescent light under 16 hour photoperiod.



Figure 3. Bulblets formed from shoot clusters of *Lilium asiatic hybrid* 'Hae Hwa' by liquid medium addition.

인용문헌

Han BH (2001) Establishment of suitable media in bioreactors for micropropagation of *Lilium* spp. In: Micropropagation of lily bulblets in bioreactor by using bulblets with swollen basal plates and industrialization of lily bulb production for exporting. (The third years' report in G7 project) pp 29-108
 Han BH, Yae BH, Goo DH, Ko JY (1999a) Effects of growth

- regulators and light on the formation and proliferation of bulblets with swollen basal plate from in vitro culture of bulb scales in *Lilium* oriental hybrid 'Casa Blanca'. J. Kor. Soc. Hort. Sci. **40**: 463-466
- Han BH, Yae BW, Goo DH, Ko JY** (1999b) The formation and growth of bulblets from bulblet sections with swollen basal plate in *Lilium* Oriental Hybrid 'Casa Blanca'. J. Kor. Soc. Hort. Sci. **40**: 747-750
- Han BH, Yae BW, Goo DH, Ko JY** (1999c) Effect of inorganic salts in MS medium, sucrose, and activated charcoal on bulblet formation from in vitro bulb scales in *Lilium* Oriental Hybrid 'Casa Blanca'. Kor J Plant Tiss Cult **26**:103-107
- Han BH, Yae BW, Goo DH** (2001) Micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casa Blanca' using bulblet sections with swollen basal plate in bioreactor. Kor. J. of Plant Tissue Cult **28**:135-140
- Leshem B, Lilien-Kipnis H, Steinitz B** (1982) The effect of light and of explant orientation on the regeneration and subsequent growth of bulblets on *Lilium longiflorum* Thunb. bulb-scale sections cultured in vitro. Sci Hort **17**:129-136
- Maesato K, Sharada K, Fukui H, Hara T, Sarma KS** (1994) In vitro bulblet regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thunb. Effect of plant growth regulators and culture environment. J. Hort. Sci. **69**:289-297
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. Physiol Plant **15**:473-497
- Nhut DT** (1998) Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Rep **17**: 913-916
- Nhut DT, Le BV, Fukai S, Tanaka M, Van Thanh KT** (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regulation **33**: 59-65
- Niimi Y** (1984) Effect of α -naphthalenacetic acid and 6-benzylaminopurine on the development of excised-bulbs (*Lilium rubellum* Baker) cultured in vitro both in diffused light and in continuous darkness, and the leaf emergence from the bulbs in vivo. J Jap Soc Hort Sci **53**:59-65
- Niimi Y** (1985) Factors affecting the regeneration of growth of bulblets in bulb scale cultures on *Lilium rubrlum* Barker. J Jap Soc Hort Sci **4**:82-86
- Novak FJ, Petru E** (1981) Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. Scientia Hort **14**:191-199
- Stimart DP, Ascher PD** (1981) Developmental responses of *Lilium longiflorum* bulblets to constant or alternating temperatures in vitro. J Amer Soc Hort Sci **106**:450-454
- Takayama S, Misawa M** (1979) Differentiation in *Lilium* bulb scales grown in vitro. Effect of various cultural conditions. Physiol Plant **46**:184-190
- Van Aartrijk J, Blom-Barnhoon GJ** (1981) Growth regulator requirements for adventitious regeneration from *Lilium* bulb-scale tissue in vitro, in relation to duration of bulb storage and cultivar. Scientia Hort **14**:261-268

(접수일자 2001년 12월 14일)