

## 생물반응기를 이용한 *Lilium longiflorum* 'Geogia'의 대량번식

한봉희<sup>1\*</sup>, 서은정<sup>1</sup>, 예병우<sup>2</sup>, 유희주<sup>1</sup>

<sup>1</sup>원예연구소 원예생명공학과, <sup>2</sup>농촌진흥청 연구관리과

### Micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Geogia' by Using Bioreactor.

Bong Hee Han<sup>1\*</sup>, Eun Jung Suh<sup>1</sup>, Byeoung Woo Yae<sup>2</sup>, Hee Ju Yu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Horticulture Biotechnology Division, Horticulture Research Institute, 495 Imok-dong, Jangan, Suwon 440-310, Korea

<sup>2</sup>Research Coordination Division, Rural development Administration, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT** Shoot clusters were induced from bulb scales of *Lilium longiflorum* 'Geogia', and proliferated on medium containing 0.5 mg/L BA and 0.5 mg/L IAA. Thereafter, these shoot clusters were cultured in 5 L air-lift bioreactors to form and grow normal bulblets. Number of bulblets increased on medium with 30 g/L sucrose, but growth of bulblets was effective on medium with 60 g/L sucrose. The number of bulblets from shoot clusters had no differences, though bulblet growth was very effective on medium with between full and double strength of MS salts. The inoculation of 100 g shoot clusters as a cultural material was suitable for formation and growth of bulblets in 5 L bioreactors. Air-lift type was more effective for the formation and growth of bulblets than that in ebb and flood one, and 200~300 mL · min<sup>-1</sup> injection of air was suitable in growth of bulblets.

**Key words:** Bioreactor, bulblet growth, *Lilium*, MS salt, shoot cluster, sucrose

#### 서 론

나리의 조직배양에서 기내에서 형성된 소자구의 인편이 가장 좋은 재료로 사용되고 있다 (Stimart and Ascher 1978; Takayama and Misawa 1980, 1983; Niimi 1986; Gerrits and De Klerk 1992; Priyadarshi and Sen 1992; Wickremesinhe et al. 1994; Tanimoto and Matsubara 1995). Takayama와 Misawa (1982)는 *L. auratum*에서 인편을 고농도의 kinetin이 첨가된 배지에서 배양하면 작은 인편이 많이 착생된 세포덩어리가 발생한다고 보고하였다. Maesato 등 (1994)도 *L. japonicum*에서 고농도의 생장조절제가 첨가된 배지에서 4가지 형태의 비정상적인 자구가 형성되는 것을 관찰하였다. 이러한 비정상적인 자구 또는 세포덩어리는 높은 신초 재분화 능력을 가지고 있으며, 이들을 생장조절제가 없는 배지에 이식하면 정상적인 자구를 생산

하였다. 유사한 결과가 나리의 다른 부위를 사용하여 배양한 나리 종에서 보고되었다 (Novak and Petru 1981; Niimi 1984; Nhut 1998). 그러나 일반적으로는 여전히 인편배양으로 나리를 배양하고 있다. 최근 조직배양에 의한 나리의 증식은 인건비의 상승으로 자구 생산비가 증가하고 있다. 식물조직배양에서 중요한 생산비는 인건비이고, 나리배양에서 인건비는 기내생산된 자구에서 개개의 인편을 분리하는 과정에 집중된다. 최근 나리의 증식에 대량증식, 자동화 가능성, 인건비의 절감 등의 이유로 바이오리액터가 이용되고 있다 (Peak et al. 2001; Lian et al. 2002). Peak 등 (2001)은 나리의 인편 절편체를 ebb and flood 방법으로 바이오리액터에서 배양하여 절편체에서 소자구를 형성하고, 소자구가 형성시킨 다음, 바이오리액터의 배지를 자구비대배지로 교체하여 나리자구를 생산하는 2단계 생산 방법을 제시하였다. Lian 등 (2002)은 고체배지에 나리 인편을 배양하여 소자구를 만들고 소자구를 바이오리액터에 배양하여 현저하게 자구의 비대를 촉진하였다. 따라서 본 실험은 생장조절제가 첨가된 고체배지에서 신초를 대량증

\*Corresponding author Tel 031-290-6197 Fax 031-290-6219  
E-mail bhhan@rda.go.kr

식하고, 증식된 싌초를 바이오리액터에 배양하여 증식된 싌초에서 다량의 자구를 형성 및 비대 시키기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물체 재료

식물재료로는 기내에서 배양되고 있는 *Lilium longiflorum* 'Geogia'를 사용하였으며, MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 BA 0.5 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지에서 인편을 2개월간 배양하여 싌초 cluster를 형성한 다음, 형성된 싌초 cluster를 5 L air lift 생물반응기에서 배양하였다.

### 배지 및 생물반응기 배양

생물반응기는 5 L 실린더형을 이용하였으며, 5 L의 생물 배양기에 3 L의 배지를 첨가하였다. Sucrose 및 MS 배지의 염류농도가 싌초 cluster에서 자구형성 및 비대에 미치는 영향을 조사하기 위하여 sucrose는 30~150 g/L를, MS 염류는 1/2~2배 농도를 첨가하였다. 5 L 생물배양기에 적절한 재료 투입량을 결정하기 위하여 재료를 50~300 g까지 나누어 투입하였으며, 배양방법을 ebb and flood와 air lift 방법으로 나누어 배양방법이 자구형성 및 비대에 미치는 영향도 조사하였다. 또한 생물반응기에 주입되는 공기량을 100~400 mL · min<sup>-1</sup>까지 달리하여 공기 주입량이 자구형성 및 비대에 미치는 영향도 조사하였다. 배지는 pH를 5.8로 조절한 다음, 5 L 삼각플라스크에 3 L씩 넣고, 121 °C의 고압멸균기에서 40분 동안 멸균하여 사용하였다. 생물반응기는 5 L air lift 생물반응기(실린더형)를 이용하였으며 (Figure 1), 생물반응기에 싌초 재료를 50 g씩 투입한 다음, 배지를 3L씩 주입하여 배양하였다. 배양은 3 L의 액체배지가 첨가된 5 L의 air lift 생물반응기에 공기를 200 mL · min<sup>-1</sup> 주입하거나, 동일 생물반응기의 중간부위에 seive를 넣고 재료를 일시적으로 배지에 잠기게 하는 방법 (ebb and flood type)

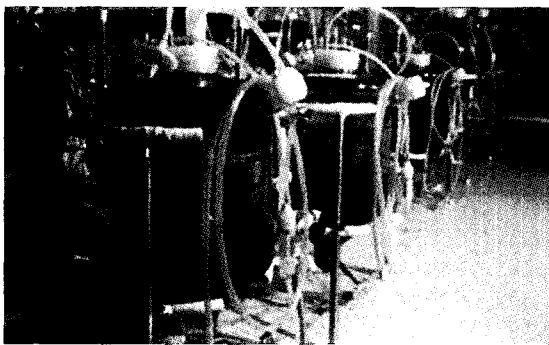


Figure 1. Air-lift bioreactors used for bulblet formation and growth from shoot clusters of *Lilium longiflorum* 'Geogia.'

을 이용하였으며 배지를 하루 4번, 10분씩 공급하였다. 처리당 생물반응기 1개씩 2반복하였으며 생물반응기에서 배양 8주 후에 자구수, 자구무게, 자구직경 등을 조사하였다.

### 배양방법

배양은 25±2 °C로 조절되는 배양실에서 배양하였으며, 인편에서 싌초 cluster의 유기 및 증식은 명배양 (약 40 μM/m<sup>2</sup>/s<sup>-1</sup>)에서, 싌초 cluster에서 자구의 형성 및 비대는 암배양에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 자구의 형성 및 비대에 미치는 sucrose 및 MS 염류농도

싌초 cluster에서 자구를 형성 및 비대시키기 위하여 *L. longiflorum* 'Geogia'의 싌초 cluster를 5 L air lift 생물반응기에서 배양한 결과, 자구수는 MS 배지에 sucrose 30 g/L가 첨가된 처리구에서 많았고 sucrose 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 자구직경, 자구무게, 형성된 총자구무게는 sucrose 60 g/L가 첨가된 배지에서 가장 높아 자구비대에 효과적이었다 (Table 1).

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 보고하였다. Niimi와 Onozawa (1977)는 *L. rubellum*의 엽배양에서 40 g/L의 sucrose가 자구형성에 가장 좋았으며, sucrose 80~120 g/L에서 자구무게는 증가하였으나 자구수는 감소하였다고 하여 sucrose의 농도가 높아지면 자구형성은 억제되고 자구비대는 촉진된다고 발표하였다. Han 등 (1999a)은 *L. oriental hybrid* 'Casa Blanca'의 배양에서 저반부가 이상 비대된 자구절편을 sucrose 70 g/L가 첨가된 배지에서 배양하면 자구비대가 촉진된다고 하였다. 본 싌험에서도 sucrose 농도가 증가할수록 자구수가 감소하여 위의 결과들과 유사한 경향을 나타냈다.

5 L air-lift 생물반응기에 MS 염류농도를 달리하여 배지의 MS 염류농도가 자구비대에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 2), MS 염류 농도간에 자구수는 차이가 없었으나 자구비대는 MS 염류를 1~2배 첨가한 배지에서 자구무게가 높아 효과적이었다 (Figure 2). Takayama와 Misawa (1979)는 *L. auratum*의 인편배양에서 MS 배지의 2배 염류농도까지 인편에서 분화된 자구의 무게는 MS 배지의 염류농도가 높아질수록 증가한다고 하였으며, Han 등 (1999b)은 *L. oriental hybrid* 'Casa Blanca'의 배양에서 1/2~2배 MS 염류농도 사이에서 자구수는 차이를 나타내지 않았으나 자구무게는 1~2배 MS 염류농도에서 증가하였다고 하여 본 싌험의 결과와 일치하였다.

**Table 1.** Effects of sucrose on the formation and growth of bulblets from shoot clusters of *Lilium longiflorum* 'Georgia' in 5 L air-lift bioreactors after 8 weeks of culture.

Sucrose (g/L)	Multiple times	No. of bulblets /explant	Total fresh wt. (g) /explant	Diameter (mm) /bulblet	Fresh wt. (mg) /bulblet
30	3.8	22.0 a <sup>z</sup>	2.90 ab	6.8 ab	132.4 b
60	4.6	19.0 ab	3.16 a	7.6 a	165.8 a
90	4.3	19.6 ab	2.48 abc	5.6 bc	125.8 b
120	4.1	16.7 bc	2.11 bc	5.2 bc	126.3 b
150	3.8	14.1 c	1.66 c	4.8 c	118.5 b

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )

**Table 2.** Effects of MS salts on the formation and growth of bulblets from shoot clusters of *Lilium longiflorum* 'Georgia' in 5 L air-lift bioreactors after 8 weeks of culture.

MS salt	Multiple times	No. of bulblets /explant	Total fresh wt. (g) /explant	Diameter (mm) /bulblet	Fresh wt. (mg) /bulblet
1/2x	4.0	19.8 a <sup>z</sup>	2.24 b	5.9 a	113.9 b
1x	4.5	21.7 a	2.76 a	6.7 a	140.8 a
2x	4.5	19.7 a	2.82 a	6.6 a	142.0 a

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )



**Figure 2.** Formed bulblets from shoot clusters of *Lilium longiflorum* 'Georgia' in 5 L air-lift bioreactors containing 3 L medium with 60 g/L sucrose, 2 g/L activated charcoal and full strength of MS salts.

생물반응기 배양방법 및 배양재료

5 L air-lift 생물반응기에 투입되는 신초 cluster의 재료량을 달리하여 배양하였다 (Table 3). 재료의 증식배수는 재료를 50~100 g 투입하는 것이 가장 높았다. 재료투입량에 따라 절편체당 자구수, 생체중은 차이를 나타내지 않았으나, 자구직경과 자구무게는 재료 투입량은 100 g 투입한 처리구에서 가장 높았다. 따라서 증식배수, 자구크기 등을 고려하면 5L 생물반응기에 신초 cluster 100 g을 투입하는 것이 자구형성 및 자구비대에 적절하였다.

Ebb and flood와 air-lift 방법으로 생물반응기의 배양방법을 달리하여 배양하였다 (Table 4). 절편체당 자구수, 생체중은 차이가 없었으나, ebb and flood 방법보다는 air-lift 방법에서 증식배수, 자구무게 등이 높아 신초 cluster에서 자구의 비대는 air-lift 방법에서 촉진되었다. 이와 같이 air-lift 방

**Table 3.** Bulblet formation and growth from shoot clusters of *Lilium longiflorum* 'Georgia' affected by the amount of inoculated materials in 5 L air-lift bioreactors after 8 weeks of culture.

FW (g) of inoculated materials	Multiple times	No. of bulblets /explant	Total FW (g) /explant	Diameter (mm) /bulblet	FW (mg) /bulblet
50	4.2	22.5 a <sup>z</sup>	3.21 a	6.8 ab	142.8 a
100	4.5	22.6 a	3.07 ab	7.2 a	136.4 a
200	2.9	23.9 a	2.62 ab	6.0 bc	110.3 b
300	2.0	24.3 a	2.47 b	5.2 c	100.7 b

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )

**Table 4.** Effects of bioreactor type on bulblet formation and growth from shoot clusters of *Lilium longiflorum* 'Georgia' in 5 L bioreactors after 8 weeks of culture.

Cultural method	Multiple times	No. of bulblets /explant	Total fresh wt. (g) /explant	Diameter (mm) /bulblet	Fresh wt. (mg) /bulblet
Ebb & flood	3.8	23.9 a <sup>z</sup>	2.85 a	5.8 a	126.1 b
Air-lift	4.2	22.5 a	3.30 a	6.8 a	145.7 a

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )

**Table 5.** Bulblet formation and growth from shoot clusters of *Lilium longiflorum* 'Georgia' affected by the amount of injected air in 5 L air-lift bioreactors after 8 weeks of culture.

Injected air (mL/min)	Multiple times	No. of bulblets /explant	Total fresh wt. (g) /explant	Diameter (mm) /bulblet	Fresh wt. (mg) /bulblet
100	2.7	23.3 b <sup>z</sup>	3.67 b	6.4 a	157.7 a
200	3.7	25.7 ab	4.17 a	6.2 a	162.2 a
300	2.9	27.3 a	4.24 a	6.5 a	155.5 a
400	2.6	24.8 ab	3.68 b	6.9 a	151.1 a

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ )

법에서 자구비대가 촉진되는 것은 식물체가 항시 액체배지에 잠겨있어 양분의 흡수가 원활하여 발생하는 것으로 생각되었다. 5L air-lift 생물반응기에서 자구비대에 미치는 공기 주입량을 조사한 결과 (Table 5), 신탄 cluster에서 자구의 비대는 200~300 mL · min<sup>-1</sup>의 공기를 주입하는 것이 효과적이었다.

**적 요**

자구를 형성 및 비대시키기 위하여 BA 0.5 mg/L와 IAA 0.5 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 *Lilium longiflorum* 'Georgia'의 신탄를 증식하였다. 증식된 신탄 cluster를 5 L air lift 생물반응기에 배양하였다. 자구비대는 sucrose 60 g/L 및 1~2배 사이의 MS 배지 염류농도에서 효과적이었다. 재료 투입량은 100 g을 투입하는 것이 자구형성 및 자구비대에 적절하였다. 배양방법은 air-lift 방법이 자구의 형성 및 비대를 촉진하였으며, 주입공기량은 200~300 mL · min<sup>-1</sup>을 주입하는 것이 자구비대에 효과적이었다.

**사 사**

이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-Doc. 연수지원에 의하여 수행되었으며, 연수지원에 감사의 뜻을 표합니다.

**인용문헌**

Gerrits MM, De Klerk GJ (1992) Dry-matter partitioning between

bulb and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated in vitro. *Acta Bot Neerl* 41: 461-468  
 Han BH, Yae BW, Goo DH, Ko JY (1999a) 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 (1999b) 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  
 Lian ML, Chakrabarty D, Paek KY (2002) growth of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. *Scientia Hort* 97: 41-48  
 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 bioassays 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  
 Niimi Y (1984) Bulblet productivity of explants from scales, leaves, stems and tepals of *Lilium rubellum* Barker. *Scientia Hort* 22: 391-394  
 Niimi Y (1986) Application of leaf segment culture to in vitro bulblets production of six *Lilium* species. *Acta Bot* 35: 189-194  
 Niimi Y, Onozawa T (1977) Vegetative propagation of *L. rubellum* Barker; Comparison of bulblet formation between scaling and scale segment cultured in vitro. *Abstracts Fall Meeting. Jap Soc Hort Sci* pp. 348-349  
 Novak FJ, Petru E (1981) Tissue culture propagation of *Lilium*

- hybrids. Scientia Hort 14: 191-199
- Paek KY, Hahn EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors for large scale micropropagation systems of plants. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 37:284-292
- Priyadarshi S, Sen S (1992) A revised scheme for mass propagation of Easter Lily. Plant Cell Tiss Organ Cult 30: 193-197
- Stimart DP, Ascher PD (1978) Tissue culture of bulb-scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. J Amer Soc Hort Sci 103: 182-184
- Takayama S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium* bulb-scales grown in vitro. Effect of various cultural conditions. Physiol Plant 46: 184-190
- Takayama S, Misawa M (1980) Differentiation in *Lilium* bulb-scales grown in vitro. Effect of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentrations on differentiation and scale leaf formation in vitro. Physiol Plant 48: 121-125
- Takayama S, Misawa M (1982) Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb-scales grown in vitro. Plant Cell Physiol 23: 67-74.
- Takayama S, Misawa M (1983) The mass propagation of *Lilium* in vitro by stimulation of multiple adventitious bulb-scale formation and by shake culture. Can J Bot 61: 224-228
- Tanimoto S, Matsubara Y (1995) Stimulating effect of spermine on bulblet formation in bulb-scale segments of *Lilium longiflorum*. Plant Cell Rep 15: 297-300
- Wickremesinhe ERM, Holcomb EJ, Artega RN (1994) A practical method for the production of flowering Easter lilies from callus cultures. Sci Hort 60: 143-152

(접수일자 2003년 12월 1일, 수리일자 2004년 7월 15일)