

액체 진탕배양에 의한 나팔나리(*Lilium longiflorum*)

소인경구의 대량증식

황혜연 · 이은경 · 이영복 *

충남대학교 원예학과

Micropropagation of Bulbs of *Lilium longiflorum* by Liquid Shaking Culture

HWANG, Hye Yeon · LEE, Eun Kyung · LEE, Young Bok *

Department of Horticulture, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea

ABSTRACT Liquid shaking culture was conducted to investigate the proper culture conditions for the micropropagation of high quality lily using bulblets (3 mm in diameter) obtained from small scale culture. The combinations of 9% sucrose and 10 mM nitrogen or 6% sucrose and 20 mM NH_4NO_3 were effective on the growth and weight of micro-bulbs. However, the number of new bulbs was the highest when 20 to 40 mM NH_4NO_3 and 3% sucrose were added to the MS medium. The total fresh weight was increased effectively in MS medium supplemented with BA 0.2 mg/L alone under $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ intensity. Also bulblet weight was increased at $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ intensity, regardless of BA concentrations (0.2 and 2 mg/L) in the medium. The proper culture period of bulblet was about 2 month in liquid shaking culture.

Key words: Bulblet, NH_4NO_3 , sucrose, intensity, *in vitro*

서 론

식물의 조직배양 기법의 도입은 지난 30년 동안 급속하게 발전하면서 농업적 이용에도 많은 기여를 해왔다. 조직배양에 의한 증식방법 도입의 특징은 무병주를 유지하면서 기내에서 대량으로 증식시킬 수 있으므로 경제성 있는 우량종묘를 확보하는 효율을 높일 수 있다는데 의의가 있다. 백합류의 조직배양에 관한 연구는 Robb (1957)가 처음으로 *Lilium speciosum*의 인편조직의 배양에 관한 논문을 발표한 이래 많은 연구 (Aartrijk 1981; Bennidi 1979; Seabrook와 Cumming 1982; Simmonds와 Cumming 1976; Stimart와 Ascher 1978)가 수행되었고, Takayama와 Missawa (1979;

1982; 1983)가 백합의 기내 대량증식의 가능성을 시사하였다. 또한 Han 등은 (1999)은 나리 (Casa Blanca)의 자구수가 암배양보다 명배양에서 많았으며, 절편체당 자구 무게도 명배양에서 높았다고 보고한 바 있으며, Niimi (1984)도 *L. rubellum*의 배양에서 유사한 결과를 보고하였다. Maesato 등 (1994)도 *L. japonicum*의 인편배양에서 자구의 형성은 특히 명배양에서 좋았으며, 암배양에서 재생된 자구는 전혀 없을 가지고 있지 않았다고 보고하였다. 국내에서도 히야신스 (정 등 1983; 1984)등 일부 구근류의 조직배양에 관한 연구가 발표되었으며, 백합의 조직배양에 관한 연구는 이 등 (1995a; 1995b)을 비롯하여 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 이 등 (1995a; 1995b)에 의한 백합의 인편배양으로부터의 구형성에 관한 기본 연구결과를 바탕으로 대량증식배양에 있어서 생산성이나 경제성을 향상시킬 수 있는 액체진탕 배양에 관한 연구를 수행하고자 실시하였다

재료 및 방법

실험재료

무병상태의 건전 우량주의 확보를 위해 백합의 정단배양을 수행하였고 여기에서 얻어진 기내자구 (Figure. 1)로부터 일정한 범위에 들어가는 크기의 소인편을 채취하여 소인경구를 분화시키기 위한 인편배양의 재료로 사용하였다. 또한 액체배양을 수행하기 위해서는 소인편을 배양하여 얻어진 직경 3 mm 정도의 균일한 크기의 소인경구를 사용하였다.

인편의 인경구 형성에 미치는 sucrose와 질소 농도의 영향

기내자구 유래 소인편을 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에 sucrose와 질소원을 달리하여 배양하였다. 1차 실험에서는 sucrose 농도를 3%, 6% 및 9%로 설정하였으며, 질소원의 농도는 MS배지의 NH_4NO_3 양에 대한 1배구 (20 mM), 1/2배구 (10 mM), 2배구 (40 mM) 및 무 첨가구를 설정하였다. 백합 소인편은 각 처리 당 10개구를 공시하여 25°C에서 16시간 일장과 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ 의 광 조건하에서 1996년 10월 8일부터 1996년 11월 22일 까지 45일간 배양하였으며, 소인편에서 형성된 인경구의 직경, 초장, 인경구 수 및 인경구의 무게를 조사하였다.

인경구의 형성에 미치는 ABA의 영향

기내자구 유래 소인편 배양에서 생장에 미치는 ABA의 영향을 조사하기 위하여 MS 액체배지에 sucrose 농도를 3%로 첨가하고 ABA 농도는 0, 0.02, 0.2 및 2 mg/L로 설정하였다. 실험에 사용한 공시재료와 배양방법은 전 실험 방법과 동일하게 하였으며 각 처리 당 70개의 인경구를 공시하여 45일간 배양하였고, 인경구의 직경, 초장, 새로 분화된 인경구의 무게를 조사하였다.



Figure 1. Explant materials differentiated at the leaf scale segments of *Lilium longiflorum* in vitro culture.

인경구의 생장에 미치는 BA, ABA 및 광도의 영향

기내자구 유래 소인편 배양에서 형성된 인경구의 기내 생장에 미치는 BA, ABA 및 광도의 복합적인 영향을 조사하기 위하여 NH_4NO_3 가 10 mM 농도로 처리된 MS 액체배지에 sucrose 농도를 9%로 첨가하고 BA의 농도는 0.2 및 2 mg/L, ABA 농도는 0 및 0.2 mg/L로 설정하였으며 조도를 1과 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ 로 복합처리하고 30 rpm으로 진탕하였다. 실험에 사용한 공시재료와 배양방법은 실험1과 동일하게 하였으며, 각 처리 당 20개의 인경구를 공시하여 50일간 배양하였고, 식물체의 생체중, 초장, 지하부 생체중, 인경구의 무게를 조사하였다.

소인경구의 액체 배양시기 결정

기내에서 성장하고 있는 인경구의 인편을 배양하여 소인경구를 분화시킨 후 인편배양 개시시기로부터 1, 2, 3개월된 소인경구를 재료로 공시하여 어느 시기에 액체 배양하는 것이 효과적인가를 검토하였다.

결과 및 고찰

인편의 인경구 형성에 미치는 sucrose와 질소 농도의 영향

기내자구 유래 소인편 배양시 인경구의 형성에 미치는 sucrose 농도와 질소 급원인 NH_4NO_3 의 영향을 구명하고자 시험한 결과 (Table 1), 인편에서 형성된 직경은 NH_4NO_3 의 공급에 따라 어느 정도의 영향을 받지만 질소의 양보다는 오히려 당의 공급량에 의한 영향이 더욱 크게 나타났다. 소인경구의 배양에 있어 구의 생장에는 MS 배지를 기준으로 하여 NH_4NO_3 의 양을 10 mM로 줄이고 sucrose의 양을 9%로 한 배지에서나 또는 NH_4NO_3 20 mM에 sucrose 6%를 첨가한 처리구에서 구의 생장에 가장 효과가 좋았다. 그러나 NH_4NO_3 가 첨가되지 않았을 경우에는 sucrose의 첨가 양에 관계없이 구의 비대가 매우 저조하였다. 이는 sucrose 효과에 있어서 고농도 처리에 의해 자구 형성 및 비대가 촉진되었다는 보고 (Nismiuchi 1980; Rice et al 1983; Takayama and Misawa 1980; Ziv 1979)와 유사한 것으로 구의 비대에 당의 효과가 질소원의 공급자체가 불필요한 것은 아니고 이도 역시 구의 생장에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되었다. Shoot의 신장에 있어서는 구의 직경과 다른 경향을 보여 전체적으로 sucrose의 농도가 3%일 때 신장률이 좋았고 새로운 소인경구의 분구는 NH_4NO_3 의 20 mM 또는 40 mM에 sucrose의 농도가 3%인 처리구에서 효과가 있었다.

종구의 비대 성장에서 가장 중요한 척도가 되는 구의 무게를 볼 때 구의 직경에서 효과가 양호하였던 NH_4NO_3 10 mM

Table 1. Effects of nitrogen and sucrose concentrations on proliferation and growth of micro-bulbs in *Lilium. longiflorum* bulb scale culture *in vitro*.

Treatments		bulb	Shoot	No. of new	Bulb fresh
NH ₄ NO ₃	Sucrose (%)	diameter (mm)	length (mm)	bulblets	weight (mg)
0	3	8.1cd ¹	34.0abcd	0.6cde	147.7d
	6	9.6bcd	25.0bcd	0.4cde	268.4d
	9	7.6d	15.8d	0.2de	180.4d
10 mM	3	10.3abcd	43.8ab	1.0bcd	220.8d
	6	12.9ab	21.7cd	0.4cde	255.3d
	9	14.3a	40.5abc	1.2bc	930.5a
20 mM	3	11.0abcd	49.0a	1.7ab	388.3cd
	6	14.4a	43.9ab	1.2bc	753.9ab
	9	12.4abc	13.5d	0.0e	599.8bc
40 mM	3	11.1abcd	47.2a	2.3a	458.4bcd
	6	11.3abcd	18.5d	0.0e	603.7bc
	9	12.3abc	19.6d	0.0e	680.4abc

¹Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

에 sucrose 9% 처리구에서 1구의 생체중이 930.5 mg으로 가장 효과가 양호하여 NH₄NO₃이 첨가되지 않고 sucrose 3%가 첨가된 처리구에 비해 6.3배의 증가율을 보였으며, 다음은 NH₄NO₃의 농도가 20 mM이고 sucrose의 농도가 6% 일 때 효과가 양호하여 이 두 처리구가 종구의 생장에 바람직한 처리구임을 보이고 있다. 특히 sucrose의 농도가 3%로 저농도 일 경우에는 NH₄NO₃의 농도가 40 mM까지 상승함에 따라 구중이 증가하는 경향을 보여 NH₄NO₃의 농도와 sucrose의 농도와는 어떠한 상관관계가 있는 것으로 추측되었다.

인경구의 형성에 미치는 ABA의 영향

백합의 인경구의 생장 및 비대는 휴면과 관계가 있고 또한 휴면은 내생 생장조절물질인 ABA의 작용에 의해 유도되는 것으로 소인경구의 기내배양에서 구의 생장과 비대에 미치는

Table 2. Effect of ABA on proliferation and growth of micro-bulbs in *Lilium. longiflorum* bulb scale culture¹ *in vitro*.

ABA (mg/L)	Bulb diameter (mm)	Shoot length (mm)	No. of new bulblets	Bulb fresh weight (mg)
0	10.1a ²	56.0a	0.8a	393.4a
0.02	5.6b	14.8b	0.2b	113.2b
0.2	5.3b	11.3b	0.2b	95.3bc
2	2.5c	2.0c	0.2b	63.6c

¹MS medium supplemented with 3% sucrose was used.

²Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

ABA의 영향을 조사하기 위하여 ABA 농도별로 처리하여 45일간 배양한 결과는 table 2와 같다.

소인경구의 배양에서 ABA의 농도가 증가함에 따라 구의 직경 및 생체중 모두 급격히 감소하여 ABA 2 mg/L 처리구의 생체중은 63.6 mg으로 무처리구의 393.4 mg에 비해 1/6 수준에 불과할 정도로 구의 비대 생장이 극히 불량하여 배양 개시기의 크기에서 비대에 별다른 진전을 보이지 않았으며, shoot의 신장이나 분구도 매우 저조한 현상을 보였다.

인경구의 생장에 미치는 BA, ABA 및 광도의 영향

앞의 실험 결과 백합 소인경구의 배양에서 ABA의 처리가 구의 비대 생장에 억제적인 효과를 보임으로써 본 실험에서는 기내자구의 배양에서 BA와 ABA를 혼용처리하고 아울러 광도의 복합적인 영향을 조사하기 위하여 BA의 농도는 0.2 및 2 mg/L, ABA의 농도는 0 및 0.2 mg/L로 설정하였으며 조도를 1과 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ 로 하여 복합처리 하였다. 본 실험에서의 배지는 전 실험 결과에서 구의 비대에 가장 효과적이었던 10 mM NH₄NO₃의 액체배지에 sucrose 농도를 9%로 첨가하고 30 rpm으로 50일간 진탕 배양한 결과는 table 3과 figure 2와 같았다. 전체 생체중에 있어서는 BA 0.2 mg/L 단독처리에 조도가 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ 일 때 가장 양호한 것으로 보였으며, 조도가 약할 경우 전반적으로 생육이 저조하였다. 이는 나라 (Casa Blanca)의 자구수가 암배양보다 명배양에서 많았으며, 절편체당 자구 무게도 명배양에서 높았다는 (Han et al. 1999)의 결과와도 일치하는 것으로 나타났다. Niimi (1984)도 *L. rubellum*의 배양에서 유사한 결과를 보고하였다. Maesato 등 (1994)도 *L. japonicum*의 인

Table 3. Effects of BA, ABA and light on the growth of *in vitro* micro-bulb of *Lilium longiflorum* culture¹.

BA (mg/L)	ABA (mg/L)	Light ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$)	Total fresh weight (g)	Shoot length(mm)	Bulb weight (g)
0.2	0	1	1.26c ²	52.7a	0.79b
		60	1.82a	61.6a	1.15a
	0.2	1	1.16c	28.3b	0.91ab
		60	1.19c	31.2b	0.89ab
	0	1	1.31c	31.0b	1.04ab
		60	1.77ab	33.0b	1.13a
2	0.2	1	1.37bc	29.7b	0.87ab
		60	1.42abc	23.2b	1.05ab

¹ MS medium supplemented with 10 mM NH_4NO_3 and 9% sucrose was used.

² Mean separation within columns by Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

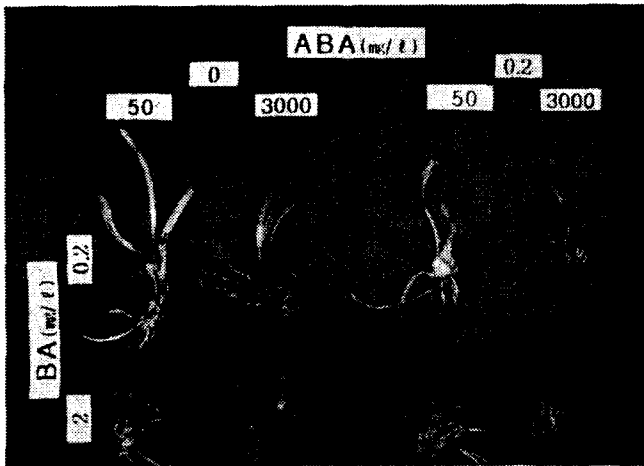


Figure 2. Effects of BA, ABA and Light on growth of micro-bulb of *Lilium longiflorum* *in vitro* culture.

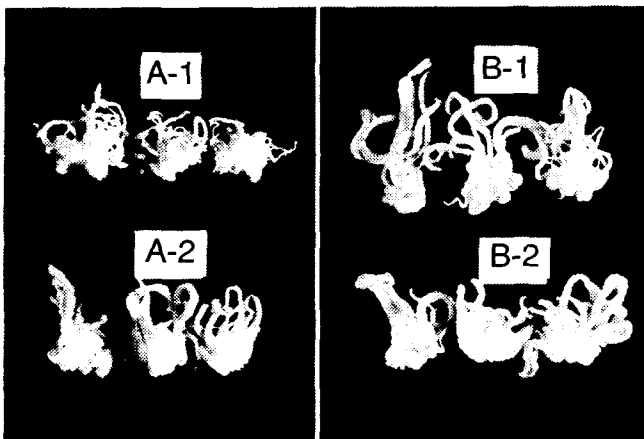


Figure 3. Effects of growing date of materials after differentiation using the leaf scale segment and BA, 2,4-D treatment on growth of micro-bulb of *Lilium longiflorum* *in vitro* culture. A-line; 3 month, B-line; 2 month, 1-line; BA 2 mg/L, 2-line; BA 2 and 2,4-D 0.2 mg/L.

편배양에서 자구의 형성은 특히 명배양에서 좋았으며, 암배양에서 재생된 자구는 전혀 잎을 가지고 있지 않았다고 보고하였다. 또한 BA 농도가 0.2 mg/L 처리구에 있어서는 동시에 첨가한 ABA 농도가 0.2 mg/L에서 광도에 관계없이 생육이 부진하였으나 BA의 농도가 2 mg/L로 상향 처리됨에 따라 ABA 처리에 의한 억제 효과가 상실됨을 알 수 있다. 초장에 있어서는 조도와 관계없이 BA 2 mg/L이나 ABA가 첨가될 경우 신장의 억제를 보였지만, BA 0.2 mg/L 단독 처리구에서는 억제 현상이 보이지 않았으며, 구의 생체중에 있어서는 전체의 생체중에서와 비슷한 경향을 보이고 있어 BA 0.2이나 또는 2 mg/L 단독처리에 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 처리구에서 구중이 다소 증가하는 것으로 나타났으나 통계적 유의차는 거의 인정되지 않았다.

소인경구의 계대배양 시기 결정

기내에서 성장하고 있는 인경구의 인편을 배양하여 소인경구를 분화시킨 후 인편배양 개시시기로부터 1, 2, 3개월된 소인경구를 재료로 공시하여 어느 시기에 액체 배양하는 것이 효과적인가를 검토하고자 하였으나, 인편 배양 1개월 후에는 소인경구의 발달이 계대배양을 할 정도가 되지 못하여 사용하지 못하였으며 2개월 및 3개월간 배양한 인경구를 사용하여 배양한 결과는 figure 3에서와 같다. 이 결과에서 4월 14일 동시에 조사한 결과를 전체적으로 볼 때 2개월된 소인경구의 생장이나 3개월된 소인경구의 생장에 별다른 차이가 없음을 알 수 있었다. 이로써 액체진탕 배양을 위한 소인경구의 재료로서는 인편배양으로부터 인경구의 분화를 유도시킨 후 장기간의 배양이 필요하지 않고 2개월 정도의 배양만으로도 효율적인 재료로서 사용이 가능함을 알 수 있었고 따라서 배양 기간 단축의 가능성을 보여 주었다. 또한 액체 진탕배양을 위한 배지에 있어서는도 BA 2 mg/L 단독처리인 A-1 및 B-1구와 BA 2 mg/L 및 2,4-D 0.2 mg/L과의 혼용구인 A-2 및 B-2구를 비교할 때 두 처리간의 인경 생육에 뚜렷한 차이를 보이지 않는 것으로 보아 백합의 액체 진탕배양에 있어 auxin인 2,4-D의 처리는 뚜렷한 효과가 보이지 않았음을 알 수 있다.

적 요

백합의 건전 우량주의 확보와 대량 증식을 위해 소인편을 배양하여 얻어진 직경 3 mm 정도 크기의 소인경구를 사용하여 액체배양을 실시하였다. 인경구의 생장에 미치는 sucrose와 질소 농도의 영향을 알아본 결과 인경구의 생장과 무게에 가장 효과적인 처리구는 10 mM NH_4NO_3 에 sucrose 9% 또는 20 mM NH_4NO_3 에 sucrose 6%인 것으로 나타났으며, 새로운 소인경구의 분구는 NH_4NO_3 20 또는 40 mM에 sucrose 3%에서 가장 양호하였다. 또한 전체 생체중은 광도 60

$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ 에 BA 0.2 mg/L 단독 처리구에서 효과적이었으며, 구중은 BA에 농도에 큰 차이없이 0.2와 2 mg/L 처리에 광도 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ 에서 증가하는 경향을 보였다. 액체 진탕배양에 적절한 소인경구의 배양기간은 2개월 정도인 것으로 나타났다.

사사 - 이 논문은 1996년도 교육부 지원 학술진흥재단의 자유공모과제 (96-001-G0178) 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Aartrijk J. van, Blom-Barnhoorn GJ (1981) Growth regulator requirements for adventitious regeneration from *Lilium* bulb-scale tissue *in vitro* in relation to duration of bulb storage and culture. *Sci Hort* 14:261-268
- Bennidi A (1979) Cytological chimeras in plant regenerated from *Lilium longiflorum* tissues *in vitro*. *Z Pflanzenzuchtung* 82:349-353
- Chung JD, Chun CK, Suh YK, Rhee EM (1983) *In vitro* propagation of *Hyacinthus orientalis* L. *J Kor Soc Hort Sci* 24:162-168
- Chung JD, Chung CK, Rhee EM (1984) *In vitro* propagation of *Hyacinthus orientalis* L. *J Kor Soc Hort Sci* 25:72-79
- Han BH, Yae BW, Goo DH, Ko JY (1999) 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 orientalis* Hybrid 'Casa Blanca'. *Kor J Plant Tiss Cult* 26:103-107
- Lee EM, Jung HJ, Min BH, Lee YB (1995a) Effects of growth regulators on shoot differentiation and bulblet formation in shoot-tip and bulb-scale cultures of *Lilium longiflorum*. *Kor J Plant Tiss Cult* 22:83-87
- Lee EM, Jung HJ, Lee YB (1995b) Regeneration of bulblets from bulblet-derived bulb-scales of *Lilium longiflorum*. *Kor J Plant Tiss Cult* 22:89-93
- Maesato, K, Sharada K, Fukui M, Hara T and 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
- Niimi Y (1984a) Bulblet productivity of explants from scales, leaves, stems and tepals of *Lilium rubellum* Barker, *Scientia Hort* 22:381-394
- Nishiuchi Y (1980) Studies on the vegetative propagation of tulip. Regeneration of bulblets in bulb-scale segments cultured *in vitro*. *J Jap Soc Hort Sci* 49:235-240
- Rice RD, Alderson PG, Wright NA (1983) Induction of bulbing of tulip shoot *in vitro*. *Sci Hort* 20:377-390
- Robb SM (1957) The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thunb. *J Exp Bot* 8:348-352
- Seabrook JEA, Cumming BG (1982) *In vitro* morphogenesis and growth of *Narcissus* in response to temperature. *Sci Hort* 16:185-190
- Simmonds JA, Cumming BG (1976) Propagation of *Lilium hybrids*. II. Production of plants from bulb-scale callus culture for increased propagation rates. *Sci Hort* 5:161-170
- Stimart DP, Ascher PD (1978) Tissue culture of bulb-scale section for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *J Amer Soc Hort Sci* 103:182-184
- Takayama S, Missawa M (1979) Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of various cultural conditions. *Physiol Plant* 46:184-190
- Takayama S, Missawa M (1980) Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulb and sucrose concentration on differentiation and scale-leaf formation *in vitro*. *Physiol Plant* 48:121-125
- Takayama S, Missawa 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, Missawa M (1983) A scheme for mass propagation of *Lilium in vitro*. *Sci Hort* 18:353-362
- Ziv M (1979) Transplanting *Gladiolus* plants propagated *in vitro*. *Sci Hort* 11:257-260

(접수일자 1999년 10월 25일)