

마디 절편의 현탁배양에 의한 카사바의 미세증식

윤실 · 조덕이¹ · 소웅영*

전북대학교 생물과학부, ¹우석대학교 생물학과

Micropropagation of Cassava by Suspension Culture Derived from its Nodal Explants

YOON, Sil · CHO, Duck Yee¹ · SOH, Woong Young*

Department of Biological Science, Chonbuk National University, 561-756, Korea

¹Department of Biology, WooSuk University, Chonbuk, 565-701, Korea

ABSTRACT For the micropropagation, node explants of cassava were cultured in liquid MS medium with various concentrations of cytokinins on a rotary shaker (100 rpm) for 2 weeks. The adventitious roots and shoots from the explants were differentiated more efficiently in liquid medium than in solid. But root formation was not inhibited in medium with BAP and kinetin at low concentration ($>0.05 \text{ mg l}^{-1}$), while in medium added with BAP and zeatin at high level ($<0.25 \text{ mg l}^{-1}$), it was inhibited by callus forming on cut end of the cuttings. However, all of plantlets grown in liquid medium for more than 2 weeks showed symptoms of hyperhydricity. The plantlets grown in liquid medium were transferred into culture bottles filled with fine sand or artificial soil (pitmoss:perlite:vermiculite, 1:1:1 v/v) wetted with half strength of Knop's solution. After transplanted to culture bottles, some of vitrescent leaves were defoliated and new leaves were normally formed from shoot apex. Most of plantlets ($>95\%$) were hardened-off successfully only in culture bottles with fine sand, and grew into 3-5 cm seedlings possessing 4-6 nodes after 4 weeks. Thus, the mass propagation of cassava on medium containing cytokinin could be established based on the suspension culture using node explants.

Key words: BAP (Benzylaminopurin), hyperhydricity, suspension culture

서 론

열대지역 주민의 주식작물인 카사바는 현재까지 삼목에 의해 영양번식되어온 결과 병충해 손실이 세계적으로 해마다 20~50%에 이르고 있으므로 실용적인 대량증식법 개발이 절실히 요구되고 있다 (Puonti-kaerlas 1999). 카사바의 미세증식방법으로 체세포배양에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 (Stamp 1987; Raemakers 1993; Guohua 1998) 異狀胚 출현 등의 문제에 대한 기초연구가 필요한 상황에 있다.

현재까지 카사바의 미세증식은 대부분 정단부 또는 마디절편을 한천배지상에서 배양하는 방법으로 이루어지고 있어서 (Rocca 1982; McClelland et al. 1997; Karhu 1997; Li et al. 1998), 대량증식법의 발전에 한계가 있다. 또한 multi-shoot 배양방법 (Smith 1986; Bhagawat et al. 1996; Konan et al. 1997) 역시 고체배지상에서 연구되고 있으나 부정아 생장이 매우 지연되고, 발생된 부정아를 다시 발근배지로 옮겨야 하는 2중의 배양과정으로 이루어져야 한다.

한편 현탁배양은 조직의 흡수면적 증대 등으로 생장이 촉진되고 대량생산이 가능하기 때문에 산업적으로 응용될 수 있다. 최근 난 (Park et al. 1996)을 비롯한 카네이션 (Earle and Langhans 1975), 감자 (Akita and Takayama 1988), *Philodendron* (Ziv and Ariel 1991), 및 용담 (Hosokawa et

*Corresponding author. Tel 063-270-3353

E-mail sohwy@moak.chonbuk.ac.kr

al. 1998)과 같은 일부 초본식물의 기관절편은 현탁배양으로 증식이 가능하여 대량배양 및 작업시간 단축 등의 발전을 보게 되었다. 그러나 일반적으로 현탁배양된 식물조직에서는 형태 및 생리적으로 비정상적인 과수화현상이 나타나 생장에 장애가 되기 때문에 대량증식법으로 발전시키는 데 문제점이 있다 (Snir and Erez 1980). 그러므로 카사바 기관절편의 현탁배양기술이 개발된다면 육묘산업 발전에 크게 기여할 수 있을 것이다.

본실험은 현탁배양에 의한 카사바 마디절편의 미세증식방법을 연구하기 위해, 신속하면서도 간편한 기관배양 조건을 확립하고, 나아가 현탁배양된 유식물의 과수화를 극복하는 동시에 효과적으로 순화시키는 방법을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

마디절편의 현탁배양

재료인 카사바 (*Manihot esculenta* Crantz, c.v. MCol 22)는 1996년 남미 콜롬비아의 CIAT (Centro International Agricultural Tropical)로부터 분양받은 것으로, 그 동안 생장 조절물질을 첨가치 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 계대배양해온 것이다. 실험에 사용된 마디절편은 유리배양병 속에서 7~10 cm 키로 자란 유식물의 줄기로부터 1~3번째 마디를 (경정부는 제외) 액아가 포함되도록 하여 약 10 mm 길이로 준비한 것이며, 마디의 잎은 葉柄을 1~2 mm 정도만 남기고 제거했다. 배양액에 첨가된 사이토키닌은 BAP (benzylaminopurin), 카이네틴 및 제아틴 3종이며, 각각의 처리 농도는 0.01, 0.05, 0.25, 그리고 1.0 mg l⁻¹ 4가지였다.

배양액은 MS기본배지에 sucrose 20 g l⁻¹을 첨가하고 pH는 5.6으로 조정했으며, 배양기로는 100 ml 용량의 플라스크를 사용했다. 각 플라스크에는 10 ml씩 배양액을 분주한 후 121°C, 1.2 기압에서 15분간 고압멸균했다. 배양체는 25±2°C, 약 40 μmol m⁻²s⁻¹에서 16시간 광주기로 배양했다. 현탁배양 (100 rpm)은 2주 동안 한 후 각 조건에서 발생된 부정아와 부정근의 성장상태를 관측했으며, 마디절편 하부 절단면에 발생된 캘러스 상태도 비교했다. 기관발생 측정에서 부정아 길이는 액아 기점으로부터 부정아 정단부까지, 율엽 수는 엽신 길이가 2 mm 이상인 것, 부정근은 1 mm 이상 신장된 것을 측정했다. 이 실험은 3반복으로 각 처리구당 총 54~58개의 절편을 배양하여 그 결과를 평균했다.

유식물의 순화

2주 동안 현탁배양된 유식물은 (1) BAP (0.01-0.05 mg l⁻¹)에서 성장된 유식물 (캘러스 없이 부정근 수 1~2개, 부정근

길이 23~27 mm, 부정아 길이 3~4 mm), (2) 제아틴 (0.01-0.05 mg l⁻¹)에서 성장된 유식물 (캘러스가 발생된 부정근 수 1~3개, 부정근 길이 0~5 mm, 부정아 길이 약 7~9 mm) 두 그룹으로 구분하여 이식했다. 이식시 BAP에서 성장된 유식물 중 부정근이 너무 긴 것은 이식이 불편하여 그 길이를 5 mm 정도만 남기고 절단 후 심었다. 또한 위의 두 부류의 유식물은 2종의 토양, 즉 (1) 농업용 인공토양 (pitmoss: perlite:vermiculite=1:1:1, v/v)과 (2) 마사토 (전주 근교 야산에서 채취)를 담은 2가지 유리병에 각각 이식하여 배양했다.

유리병으로는 직경 6 cm, 높이 11 cm의 주스병을 이용했으며, 유리병당 인공토양은 50 ml 분량에 1/2 농도의 크롬씨 용액 20 ml를 섞고, 마사토는 50 ml에 10 ml를 혼합하여 알루미늄 포일로 막아 오토클레이브한 뒤, 이식작업은 비무균환경에서 했다. 이때 유식물은 멸균수로 수세한 뒤 1개 유리병에 3개씩 심었다. 유리배양병은 마디절편 배양 때와 같은 온도와 광선조건에서 4주간 생육시킨 뒤 성장상태를 계속했다.

결과 및 고찰

마디절편의 액체배지 배양

2주간 현탁배양된 절편은 고체배지에서 3주 배양된 것보다 부정아와 부정근 발생이 훨씬 촉진되었으므로 본실험은 액체 배양을 위주로 실시되었다 (Figure 1, 2). 일반적으로 현탁배양된 조직은 영양흡수면적의 증대와 통기효과의 증가 및 절편체로부터 분비되는 폐놀성 물질의 희석에 의해 생장이 촉진되는 것으로 알려져 있다 (Lim-Ho 1982). 현탁배양에 의한 이러한 기관발생 촉진효과는 카사바에서 더욱 현저하게 나타났다. 즉 부정아 길이 생장에 있어, 한천배지상에서는 3주 배양기간 동안 부정아 길이가 전체 조건에서 2 mm를 넘지 못

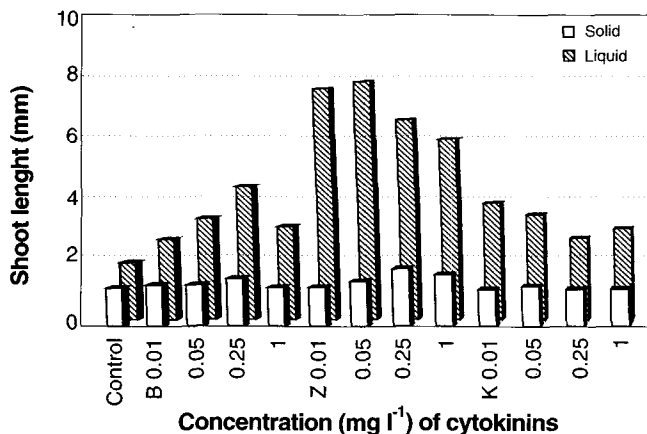


Figure 1. Effects of cytokinins on shoot organogenesis from node explants of cassava cv. MCol 22 cultured in solid medium for 3 weeks and in liquid medium for 2 weeks (B:BAP, Z:Zeatin, K:Kinetin).

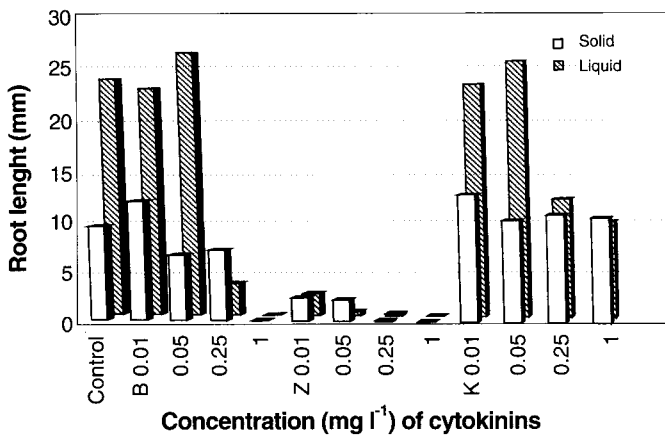


Figure 2. Effects of cytokinins on adventitious root formation from node explants of cassava cv. MCol 22 cultured on solid medium for 3 weeks and in liquid medium for 2 weeks (B:BAP, Z:Zeatin, K:Kinetin).

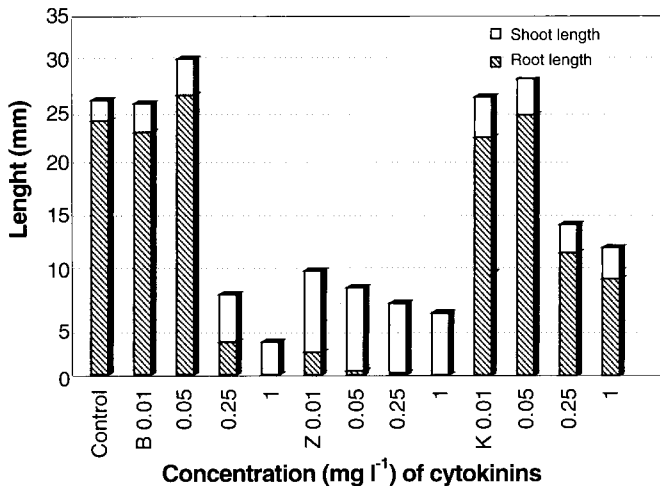


Figure 3. Effects of cytokinins on adventitious root and shoot development from node explants of cassava cultured in liquid medium for 2 weeks (B:BAP, Z:Zeatin, K:Kinetin).

했으나, 현탁배양된 경우에는 2주 동안에 BAP 0.25 mg l⁻¹에서 4.6 mm 정도로 2배 이상 신장했고, 특히 제아틴 0.05 mg l⁻¹에서는 BAP보다 1.7배 더 신장된 8.1 mm로 자랐다 (Figure 1). 한편 카이네틴 처리는 다른 사이토키닌에 비해 부정아 신장에 미치는 영향이 매우 적었다. 이와같이 카사바의 부정아 길이 신장에는 BAP보다 오히려 제아틴이 더 효과적이었으며, 적정 첨가농도는 0.01 mg l⁻¹이었다. 그러나 농도가 더 높아지면 과수화현상이 심해지고 부정아 신장도 둔화되었다. 카사바의 부정아 발생에 제아틴의 영향이 가장 크다는 결과는 Hussio et al. (1998)도 보고하고 있다.

한편 부정근 발생 역시 고체배양보다 현탁배양 조건에서 훨씬 촉진적인 결과를 나타냈으며, MS 기본배지인 대조구를 비롯하여 저농도의 BAP나 카이네틴 처리 조건에서 잘 이루어졌다 (Figure 2). 일반적으로 사이토키닌 처리는 부정근 발

Table 1. Effects of cytokinins on adventitious root and callus formation from node explants of cassava cultured in liquid medium for 2 weeks*

| Treatments (mg l ⁻¹) | Rooting rate (%) | No. of root | Callus forming rate(%) | Callus size(mm) | |
|----------------------------------|------------------|-------------|------------------------|-----------------|-----|
| Control | 100 | 1.8 | 0 | 0 | |
| BAP | 0.01 | 1.7 | 0 | 0 | |
| | 0.05 | 1.5 | 0 | 0 | |
| | 0.25 | 21 | 0.5 | 100 | ++ |
| | 1.00 | 0 | 0 | 100 | ++ |
| Kinetin | 0.01 | 1.4 | 0 | 0 | |
| | 0.05 | 1.9 | 0 | 0 | |
| | 0.25 | 1.4 | 0 | 0 | |
| | 1.00 | 100 | 1.5 | 0 | 0 |
| zeatin | 0.01 | 39 | 0.7 | 100 | + |
| | 0.05 | 15 | 0.2 | 100 | ++ |
| | 0.25 | 8 | 0.1 | 100 | ++ |
| | 1.00 | 0 | 0 | 100 | +++ |

Callus size represents the diameter of callus formed on basal side of node explants. +: 2.5~3.0 mm, ++: 3.0~4.0 mm, +++: 4~5 mm

생을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Schrandolf and Reinert 1959; Ben-Jaacov et al. 1991). 그러나 본실험에서 저농도의 BAP 및 카이네틴 처리는 부정근 발생을 억제하지 않았다. 이는 저농도의 사이토키닌 처리는 부정근 발생을 억제하지 않은 예가 되며, 동부의 캘러스로부터 발생된 부정근은 사이토키닌 처리에 의해 촉진된 경우도 있다 (Soh et al. 1998; Soh et al. 1999).

카사바의 미세증식에서는 부정아 신장이 양호한 유식물일수록 토양이식 후 발근이 쉽게 이루어졌다. 본실험에서 BAP (0.25 mg l⁻¹) 또는 제아틴 (0.01-0.05 mg l⁻¹)이 처리된 유식물의 부정근들은 5 mm 내외의 길이로 짧게 신장해 있었으므로 토양이식작업 때 간단히 심을 수 있었다. 또한 이들은 토양이식된 후에 사이토키닌 영향을 받지 않으므로 왕성하게 발근하여 one step culture 시스템에 의한 유식물 생산을 가능케 했다.

과수화현상은 현탁배양의 가장 큰 난제가 되어 있다. 카사바의 현탁배양에서도 배양기간이 경과되면 될수록 기관생장은 촉진되었지만 유경과 유엽에서 과수화현상을 보이기 시작하여, 2주 이상 지나면 과수화가 더욱 심해지고 발생한 유엽들은 진탕에 의한 물리적 마찰로 조직에 손상이 나타나기 시작했다. 그러나 배양 2주경의 과수화현상은 비교적 큰 잎 (엽신 길이 6~7 mm 이상)에서만 나타났으며, 엽육이 비대되면서 오그라들고 연녹색을 띄는 투명화 초기현상을 보였다.

장기현탁배양의 또다른 문제점은 진탕배양에 의한 생장극성 상실로 부정아와 부정근이 휘어 자라면서 서로 얽히어 기외작업 때 이식작업을 매우 불편하게 만드는 것이었다. 배양기간이 2주 이상 연장될 경우 이러한 현상은 더욱 심해져 서로 엉켜버린 조직을 상처없이 분리하기 매우 어렵게 되었다.

따라서 카사바의 현탁배양기간은 2주일이 최장 한계일로 판단되었다. 이 단계의 유식물들은 토양 이식 후 엽신 길이가 5~6 mm 이하인 유포이나 새로 발생되는 잎은 정상형태로 성장하게 되어 유포 생산에 장애가 되지 않았다.

토양에서의 유식물 생장

저농도의 사이토키닌 처리로 부정아 길이가 6~8 mm 이상 신장된 유식물은 세사성 마사토에 이식했을 때 비무균조건에서 생육시켜도 95% 이상 생존하여 4주 후에는 과수화 상태를 완전히 극복한 4-6개의 마디를 가진 3~5 cm 길이의 유포로 자랐으며 (Figure 5 A,B), 이후 화분에 이식했을 때 정상 생장했다. 그러나 부정아 길이가 5~6 mm 이하로 짧은 유식물은 부정근 길이와 관계없이 토양에서의 생장이 지연되어 4주가 지나도 거의 성장되지 않았다. 부정아가 짧은 유식물의 생장지연은 Maene and Deburgh (1983)에 의해서도 보고되어 있다.

한편 농업용 인공토양에 이식된 유식물은 부정아와 부정근이 잘 발생되었더라도 비무균조건에서 서서히 고사하여 한

개체도 생존하지 못했다. 본 실험결과 유식물 순화에는 인공 토양보다 유기물이 첨가되지 않은 마사토가 더 적당하다고 판단되었다. 그리고 토양이식 후 4주가 경과된 유포는 순화가 거의 이루어진 상태에 있기 때문에 고체배지에서 6주 배양된 유식물보다 순화와 생장이 더 유리하게 진행될 것으로 판단되었다.

본실험과 같이 사이토키닌만을 단독처리한 조건의 현탁배양에서 one step culture 시스템으로 마디절편을 배양하는 것은 대규모생산의 가능성뿐만 아니라 배양기간 단축, 배양공간 축소, 배양액 절약 및 한천을 쓰지 않는 경제적 효과를 얻을 수 있는 동시에 이식시간을 줄이고 유식물 상처를 최소화하는 이점이 있다. 다만 현탁배양은 연속적으로 계대배양하기 어렵다는 단점이 있지만, 토양이식을 앞둔 최종단계의 증식 과정에 현탁배양법이 이용된다면, 매우 경제적으로 건강한 유포를 생산할 수 있는 상업적 육묘기술로 발전될 수 있다고 판단된다. 본실험은 현탁배양 방식에 의한 목본식물 조직의 미세증식이 가능함을 제시한데 의미를 부여할 수 있을 것이다.

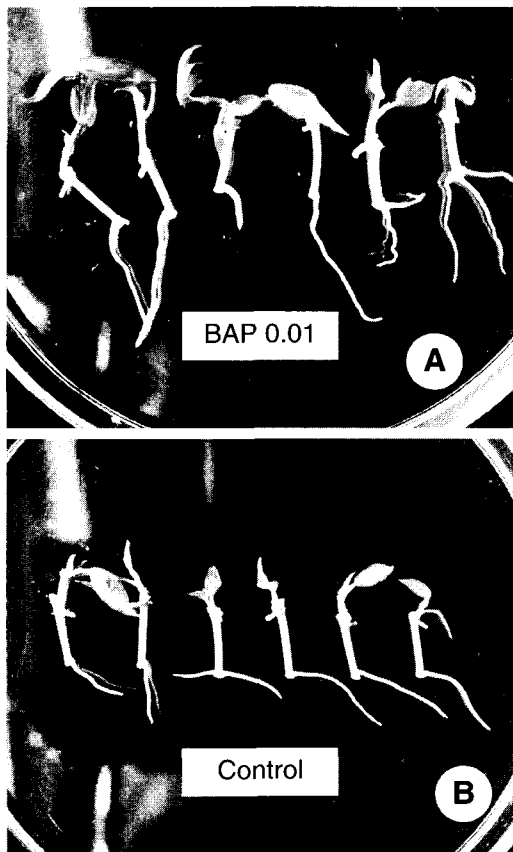


Figure 4. Comparison of node explants (cassava) cultured in liquid medium with 0.01 mg l⁻¹ BAP(A) and control (B) for 2 weeks. When they were cultured more than 2 weeks, the shoots showed hyperhydricity.

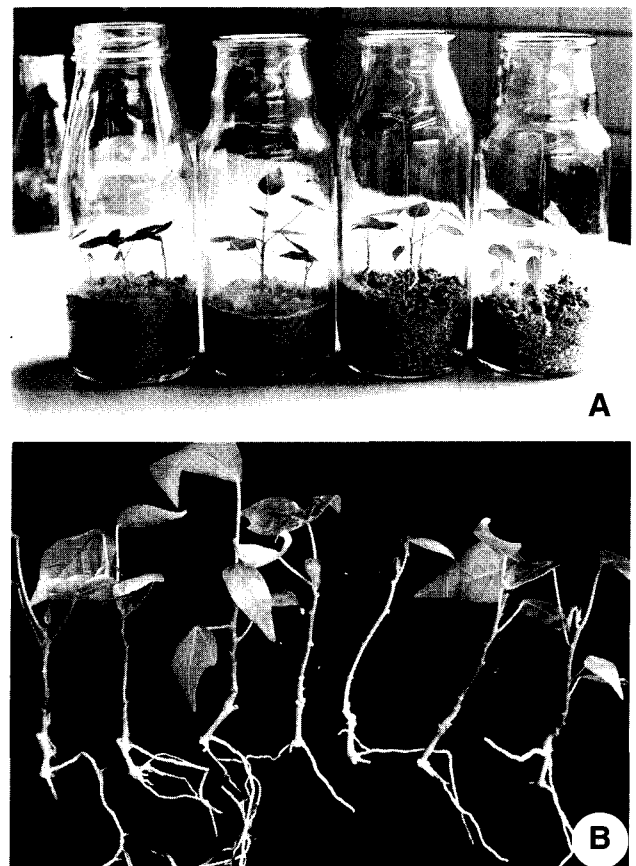


Figure 5. Most plantlets were hardened-off successfully when they were cultured in the bottle with fine sand wetted by Knop's solution for 4 weeks (A, B).

적 요

카사바 (*Manihot esculenta* Crantz, cv. MCol 22)의 마디 절편을 MS 기본배지에 3종류의 사이토키닌을 여러 농도로 첨가한 조건에서 2주동안 현탁배양한 결과, 고체배지에서 3주 배양된 것보다 훨씬 생장이 효과적이었다. 현탁배양된 유식물에서는 過水化現狀이 나타났으나, 이들을 細沙 (마사토 + 1/2 농도의 크롭씨액)를 담은 유리배양병에 이식하여 생육시킨 결과, 유경에서 새 잎이 신장되면서 과수화를 벗어나 4주 후에는 4~6개의 마디를 가진 유경길이 3~5 cm의 정상 유묘로 성장됨으로서, 목본식물인 카사바의 경우 마디절편의 현탁배양에 의한 대량증식의 가능성을 확인했다. 현탁배양시 저농도의 제아틴 ($0.01-0.05 \text{ mg l}^{-1}$) 처리는 BAP 최적조건에서보다 2배나 길게 부정아 길이를 신장시켰다. 사이토키닌 처리로 부정아가 잘 발생된 유식물은 토양이식 작업을 간편하게 했으며, 토양 이식 후 부정근을 활발히 발생시켜 one step culture 시스템 배양이 가능하게 했다. 과수화된 유식물은 기외에서 순화가 어려웠으나 유식물이 혼입되지 않은 細沙를 담은 유리배양병에서는 비무균조건일지라도 95% 이상 순화될 수 있었다.

인용문헌

- Akita M, Takayama S (1988) Mass propagation of potato tubers using jar fermenter techniques. *Acta Hort* 230:55-61
- Ben-Jacov J, Ackerman A, Tale E, Jacobs G (1991) Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. *HortSci* 26:74
- Bhagwat B, Vieira CEV, Erickson LR (1996) Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibbereric acid. *Plant Cell Tiss Org Cult* 46:1-7
- Earle ED, Langhans RW (1975) Camation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. *HortSci* 10:608-610
- Guohua M (1998) Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54:1-7
- Hosokawa K, Oikawa Y, Yamamura S (1998) Mass propagation of ornamental gentian in liquid medium. *Plant Cell Rep* 17:747-751
- Hussio I, Chaput MH, Serraf I, Ducreux G, Sihachaka D (1998) Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava and analysis of the conformity of regenerated plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53:205-211
- Karhu ST (1997) Rooting of blue honeysuckle microshoots. *Plant Cell Tiss Org Cult* 48:153-159
- Konan NK, Schopke C, Carcamo R, Beachy RN, Fauquet C (1997) An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristem. *Plant Cell Rep* 16:444-449
- Li HQ, Guo JY, Huang YW, Liang CY, Liu HX, Potrykus I, Puonti-Kaerlas J (1998) Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Rep* 17: 410-414
- Lim-Ho CL (1982) Tissue culture of local orchid hybrids at the Singapore Botanic Gardens. In: Rao AN (ed), pp. 259-300
- Maene L, Debergh PC (1983) Rooting of tissue cultured plant under in vivo condition. *Acta Hort* 131:201-208
- McClelland MT, Smith MA, Carothers ZB (1997) The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33:81-89
- Murashige T, Skoog R (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Park YS, Kakuta S, Kanco A, Okabe M (1996) Efficient propagation of protocorm-like body of *Phalenopsis* in liquid medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45:79-85
- Puonti-Kaerlas J, Kloti A, Potrykus I (1999) Biotechnological contributions to food security with cassava and rice. *Plant Biotechnology*. 16(1):38-48
- Raemakers CJM, Bessembinder JJE, Staritsky G, Jacobsen E, Visser RGF (1993) Induction, germination and shoot development of somatic embryo in cassava. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33:151-156
- Roca WM (1982) Root and tuber crops. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds), Handbook of Plant Cell Culture Vol 2:260-301. MacMillan Publishing Company, New York
- Schrandolf H, Reinert J (1959) Interaction of plant growth regulators in regeneration process. *Nature* 184:465-466
- Smith MK, Biggs BJ, Scott KJ (1986) *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell Tiss Org Cult* 6:221-228
- Snir I, Erez A (1980) *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. *HortSci* 15:597-598
- Soh W-Y, Choi PS, Cho DY (1998) Effects of cytokinin on adventitious root formation in callus culture of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *In Vitro Cell Dev Biol* 34:189-195
- Soh W-Y, Bhojwani SS, Lee SC (1999) Developmental and structural aspects of root organogenesis. In: Soh W-H & Bhojwani SS (eds) Morphogenesis in Plant Tissue Cultures. pp. 133-169, Kluwer Academic Publishers.
- Stamp JA, Henshaw GG (1987) Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell Tiss Org Cult* 10:227-233
- Ziv M, Ariel T (1991) Bud proliferation and plant regeneration in liquid-cultured *Philodendron* treated with ancymidol and paclobutazol. *J Plant Growth Regul* 10:53-57