

탄소급원에 의한 얌의 기내 비대근 형성과 순화

이나념 · 김지아 · 김용욱 · 김태동

Microtuberization and Acclimatization in the *Dioscorea cayenensis* Thunb. by the Carbon Source

Na Nyum Lee · Ji Ah Kim · Yong Wook Kim · Tae Dong Kim

Received: 18 November 2017 / Revised: 26 March 2018 / Revised: 24 May 2018 / Accepted: 6 June 2018
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In this experiment, we investigated the effects of various carbon sources and concentrations on the microtuber induction and acclimatization of the yam (*Dioscorea cayenensis*). First, the effects of the *in vitro* carbon sources and concentrations on the microtuber induction were examined. The highest efficiency of the microtuber induction was obtained in the 7% sucrose treatment, whereas the glucose treatment shows no effect on the microtuber formation. Secondly, the effects of the survival rate and the microtuber formation rate after the acclimatization were examined. The diameter (6.1 mm) and fresh weight (0.5g) of the tuberous root are the highest in the pretreatment of the 7% sucrose. Although the survival rate of the pretreatment of the low concentration sucrose (3% sucrose) is 100 %, the growth and development were inhibited. These results suggest the 7% sucrose treatment is appropriate for the yam microtuber formation and acclimatization. In addition, this protocol could be used for the propagation of virus- or disease-free clones and the multiplication of elite yam cultivars.

Keywords *Dioscorea cayenensis*, microtuberization, carbohydrate

서 언

얌(yam)은 마과(*Dioscoreaceae*), 마속(*Dioscorea*)에 속하는 단 자엽식물로 *Dioscorea cayenensis*, *D. rotundata*, *D. composita*, *D. opposita* 등 600종 이상이 분포하고 있으며 괴경을 이용한다. 얌은 전세계적으로 중요한 식량자원으로 백만명 이상 인구의 주요한 영양공급원과 노지 식재를 위한 재료로도 사용된다. 주로 서아프리카, 남아메리카, 아시아 지역에 분포하고 있으며, 국제연합식량농업기구(FAO)에 따르면 서아프리카의 440만 헥타 이상 지역에서 얌을 재배하고 있다고 보고하였다(IITA and NRI 2006). 얌 100 g에는 16.4~31.8 g의 탄수화물, 1.4~3.5 g의 단백질 그리고 0.2~0.4 g의 지방이 포함되어 있으며, 65% 이상의 수분, 비타민, 미네랄 등 많은 영양성분을 함유하고 있어 식량이 부족한 지역에 영양분공급원으로 중요한 식량작물이다. 얌의 번식은 영양번식으로 이루어지며 괴경(tubers) 혹은 주아(bulbils)단편을 식재 재료로 사용한다. 수확 후 얌의 괴경은 휴면상태이므로 재배를 위해서는 식재 전 저장이 필요하며, 휴면타파 후 줄기생육이 이루어지고 식물체가 형성되면 장기저장은 불가능하다. 얌은 카사바(cassava)나 타로(taro)와 같은 구황작물과 같이 수확 후 해충, 설치류 및 곰팡이 등과 같은 외부적인 원인에 의해 생산량의 25~60% 이상이 소실된다고 알려져 있다(IITA and NRI 2006). 이러한 외부영향에 의한 소실은 다른 구황작물과 비교하여 얌의 생산단가가 높아질 수밖에 없는 원인을 제공한다. 전통적으로 얌은 비대근 전체를 사용하여 번식시킨다. 따라서 수확한 얌 괴경의 약 40% 정도를 다시 번식을 위한 재료로 사용한다. 이것은 식량자원으로 얌의 축적량을 감소시키며, 특히 개발도상국의 식량 안보에 심각한 위협을 주고 더 나아가 기존 전통적인 번식방법은 병원균을 퍼뜨려 생산량의 감소를 가져 온다(IITA and NRI 2006). 따라서 이러한

[†]These authors contributed equally to this work.

N.-N. Lee[†] · J. A. Kim[†] (✉) · T. D. Kim
국립산림과학원 산림생명공학연구과
(Forest Biotechnology Division, National Institute of Forest Science (NIFoS), Suwon, 16631, Korea)
e-mail: jiahkim@korea.kr

Y. W. Kim
국립산림과학원 산림소득자원연구과
(Special Forest Products Division, National Institute of Forest Science (NIFoS), Suwon, 16631, Korea)

문제점을 극복하기 위해 조직배양을 이용한 다양한 기술이 개발되었으며, 이중 기내비대경(microtuber)을 생산하는 방법이 가장 효율적인 방법으로 보고되고 있으며 현재 까지도 기술개발이 이루어지고 있다. 비대경(microtuber), 유사체(Protocorm Like Body) 및 뿌리줄기(rhizome)등을 이용한 조직배양 방법은 일반적인 번식방법이 어려운 식물체에서 사용되어왔다(Ng and Saleh 2011; Huang and Chung 2011; Rayirath et al. 2011; Torres-Morán et al. 2010). 이러한 기내 비대경 생산을 통한 번식방법은 구황작물에서 가장 큰 문제가 되고 있는 바이러스 및 병에 대한 저항성을 가진 무병주(virus or disease-free plantlets)의 대량생산을 가능하게 하며, 작물의 특성상 장기저장과 이동이 어려운 유전자원의 저장 및 이동을 보다 용이하게 하였다(Uchendu et al. 2016). 이와 관련된 연구보고로 Balogun (2006)은 암의 생장점배양을 통해 무병주식물체의 대량생산에 성공하여 암 생산량 증대를 가능하게 하였다. 또한 암의 비대경 유도를 위해서는 광의 영향(Shou Yong Choy 1988; John et al. 1993), sucrose의 농도(Shou Yong Choy 1988; Alizadeh et al. 1998; Chen et al. 2007; Ovono et al. 2007; Olivier et al. 2012; Li et al. 2014), 여러 가지 식물생장 호르몬의 종류(John et al. 1993; Alizadeh et al. 1998; Chen et al. 2007; Li et al. 2014), 기본배지의 종류(Alizadeh et al. 1998) 그리고 Jasmonic acid의 농도(Ovono et al. 2007; Olivier et al. 2012)등이 기내비대경유도에 영향을 주는 요인으로 보고되었다. 이중 탄소원으로 sucrose의 처리가 암의 기내 비대근 형성에 가장 영향을 주는 요인으로 보고하고 있다. 그러나 sucrose 외의 다른 종류의 탄소원 처리를 이용한 기내 비대근 생산에 관한 연구결과는 아직 보고된 것이 없다. 본 연구에서는 암의 줄기 정단 배양 과정에서 발생된 기내 비대근의 일부에서 뿌리비대에 영향을 주는 탄소급원류의 종류 및 농도별 처리에 의해 식물체 생육과 비대근 형성에 미치는 효과에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

기내 배양에 사용된 암(*Dioscorea cayenensis* Thunb.)재료는 캄보디아 산림연구소로부터 제공받은 기내식물체를 재료로 사용하였다. 암의 식물체는 마디를 포함한 약 1 cm의 줄기 절편을 1/2MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 2% sucrose와 0.3% gelrite를 첨가한 배지에 배양하였으며, 4주 간격으로 신선한 배지로 계대배양 하였다. 모든 배지의 pH는 5.7로 맞추고 유리배양용기(100 × 150 mm)에 배지를 첨가한 후, 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하였다. 1일 16시간 조명(40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ cool white fluorescent lamp)과 온도는 25 ± 1°C로 조절되는 배양실에서 기내 식물체를 생육시켰다.

탄소급원 종류별 처리

식물재료는 기내에서 4주간 배양한 암 식물체의 줄기를 사용 하였다. 정단부가 포함된 암의 줄기를 배양하여 유도된 식물체로부터 뿌리비대에 미치는 탄소급원 종류에 의한 뿌리비대의 효과를 조사하기 위해 1/2MS 배지에 0.3% gelrite를 첨가하고, 탄소급원으로 sucrose 3, 5, 7, 10%, glucose 3, 5, 7, 10%를 각각 처리한 배지에 배양하였다. 배양 환경은 1일 16시간 조명(40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ cool white fluorescent lamp), 25 ± 1°C로 조절되는 배양실에서 기내 식물체를 생육시켰다. 각 처리구는 각각 5반복이었으며, 배양 120일 후 비대경의 유도율, 유도수, 직경, 뿌리길이 그리고 줄기길이 등을 측정하였다.

탄소급원의 종류 및 농도에 따른 비대근 생산

탄소원 종류 및 농도에 따른 순화 후 생육을 확인하기 위해 배양 120일 후 토양순화를 실시하였다. 순화를 위해 기내 암 식물체는 뿌리부위의 배지를 제거한 후 탄소원의 종류와 농도 별로 나누어 인공토양(peatmoss : vermiculite : perlite = 1:1:1 v/v/v)에 이식하여 60일 후 줄기생육과 비대근 형성 및 생육을 조사하였다.

결과 및 고찰

탄소급원 종류 및 농도에 따른 기내 식물체의 생육 및 비대근 형성

기내에서 유지되고 있는 암 식물체의 액아가 포함된 줄기절편을 다양한 탄소원이 첨가된 배지에 배양하였다. 배양 120일 후 식물체의 생육은 탄소급원의 종류와 농도에 따라 차이를 보였다(Table 1 and Fig. 1). 절편당 유도된 줄기수는 sucrose와 glucose 모두 처리 농도간 차이를 보이지 않았으며 sucrose 처리에서 절편당 줄기유도수가 더 높았다. 3 ~ 10% sucrose 처리에서 절편당 줄기 유도수는 평균 3.0 ~ 3.6개로 농도간 큰 차이를 보이지 않았다. Glucose 처리에서는 평균 1 ~ 2개의 절편당 줄기가 유도되어 sucrose 처리와 비교하여 1/2 이상 낮은 줄기 유도수를 보였다(Table 1 and Fig 1). 줄기의 길이 생육은 sucrose 처리에서 더 좋은 경향을 보였으며, 처리농도가 증가할 수록 줄기 길이가 점차 증가하다 7% sucrose 이상의 농도에서는 길이생육이 감소하였다(Table 1). Glucose는 처리농도가 증가할수록 줄기생육이 점차 감소하여 3% 처리와 비교하여 10% glucose 처리에서는 1.5배 이상 줄기의 길이생육이 감소하였다(Table 1). 암의 기내배양 식물체의 비대근은 오직 sucrose 처리에서만 형성되었다. 유도된 비대근의 길이는 3% sucrose 처리에서 평균 0.6 cm, 7% sucrose 처리에서 평균

Table 1 Effect of different kinds and concentrations of carbohydrates on the growth of plantlets and root thickening after 120 days of cultures

Carbohydrate Conc.(%)	No. of shoots/explant	Length of shoot (cm)	Root length (mm)	No. of thickening roots/explant	% of thickening root induction	
Sucrose	3	3.0±1.1ab ^z	3.0±1.0a	0.6±0.1bc	0.3±0.5c	37.5
	5	3.4±0.7a	3.2±1.5a	0.7±0.3b	1.1±0.8b	75.0
	7	3.6±0.5a	3.3±1.3a	1.3±0.6a	1.6±0.9a	87.5
	10	3.5±1.4a	2.5±0.8b	0.9±0.5b	1.5±0.7ab	100.0
Glucose	3	1.0±0.1c	3.1±1.2a	NT	NT	NT
	5	2.0±0.8b	2.7±1.0b	NT	NT	NT
	7	1.9±0.7b	2.6±1.0b	NT	NT	NT
	10	2.0±1.0b	2.2±0.9bc	NT	NT	NT

*NT : non-tuber

^zMean separation within columns by Duncan’s multi range test (P≤0.05)

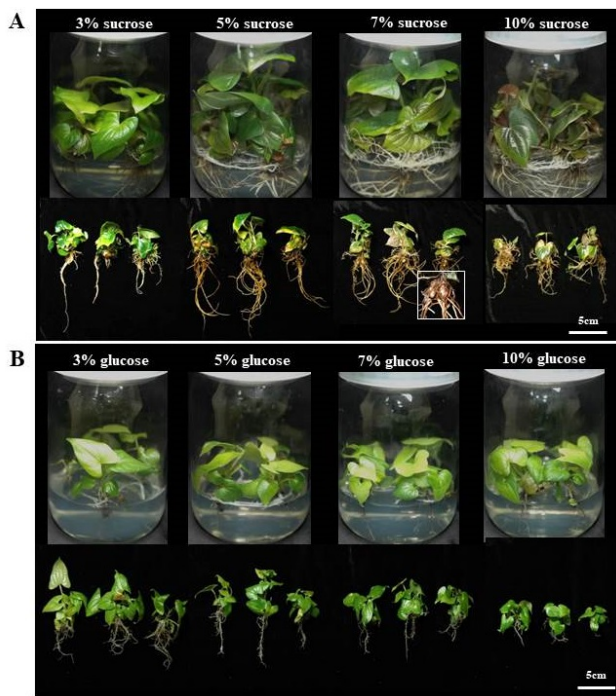


Fig. 1 The growth of plantlets grown on different kinds and concentrations of carbohydrates after 120 days of culture. (A) sucrose treatments, (B) glucose treatments. Scale bar=5 cm

1.3 cm로 저농도와 비교하여 2배 이상 뿌리의 길이신장이 이루어졌고, 10% sucrose처리에서는 점차 길이생육이 감소하였다(Table 1). 기내비대근 형성율은 3% sucrose처리 시 37.5%, 5% sucrose처리 시 75%, 7% sucrose 처리 시 87.5% 그리고 10% sucrose처리에서는 100%로 처리농도가 증가 할수록 비대근의 형성이 증가하였으나, 10% sucrose 처리에서는 절편당 유도된 비대근 수를 제외하고 줄기와 뿌리의 생육이 저조한 것이 관찰되었다. 결과적으로 암 기내식물체의 비대근 형성을 위해서는 7% sucrose처리가 적절한 농도임을 확인하였다. 탄소급원 중 sucrose는 기내 배양에 가장 많이 사용되고 있는

며, sucrose와 glucose 두 가지 탄소급원의 동일 중량에서 glucose의 몰농도가 sucrose보다 높아 동일양의 탄소급원 처리 시 glucose는 sucrose보다 더 낮은 삼투효과를 가져올 수 있다(Thorpe et al. 2007). 따라서 암의 기내 비대근 유도를 위한 탄소급원으로 sucrose가 적절하다고 판단된다.

탄소급원 종류와 농도에 따른 순화효과

60일 동안 sucrose와 glucose가 농도 별로 첨가된 1/2MS 배지에서 생육한 비대근이 형성된 기내식물체를 수확하여 순화에 영향을 주는 탄소원 종류 및 농도에 따른 효과를 관찰하였다. 모든 탄소원 처리에서 순화 60일 후 괴경(비대근)이 형성되었다. 식물체당 유도된 비대근 수는 3% sucrose처리 식물체는 1.75개, 5%와 7% sucrose처리 식물체는 2개 그리고 10% sucrose처리 식물체는 평균 5개의 비대근을 형성하여 2~7% 처리배지에서 생육한 식물체와 비교하여 고농도 sucrose 처리에서 2배 이상 많은 비대근이 형성되었다(Table 2). Glucose처리배지에서 생육한 식물체에서는 3%처리 식물체 2.3개, 5% 처리 식물체 1.5개, 7%처리 식물체 2개 그리고 10% 처리는 식물체 당 1.25개로 sucrose처리와 비교하여 비대근 형성이 저조하였다(Table 2). 비대근의 길이는 sucrose처리에서는 농도가 높아 질수록 길이생육이 저조하였다. 3% sucrose 처리식물체의 비대근 길이는 12.6 cm, 5%처리는 11.3 cm, 7% 처리는 10 cm 그리고 10% 처리식물체는 8 cm로 고농도 sucrose 처리에서 생육한 뿌리는 1.5배 이상 생육이 저조해 진 것이 관찰되었다(Table 2 and Fig. 2A). Glucose처리 식물체의 비대근 길이는 3%처리에서 12 cm, 5%처리 12.3 cm, 7% 처리 14.3 cm 그리고 10%처리 11.5 cm로 7% glucose처리에서 뿌리의 길이생육이 가장 좋았으며 그 이상의 농도에서는 생육이 저조해 지는 것이 관찰되었다(Table 2 and Fig. 2C). 비대근의 직경은 3% sucrose처리 식물체의 비대근에서 3.5 mm, 5% 처리에서 5.7 mm, 7% 처리에서 6.1 mm로 처리 농도가 높아 질수록

Table 2 Effect of different kinds and concentrations of carbohydrates on the growth of plantlets and root thickening after 60 days of acclimatization

Carbohydrate Conc.	No. of microtuber	Length of thickening root (cm)	Diameter of thickening root (mm)	Fresh weigh of root (g/plant)	Production rate of microtuber (%)	Shoot length (cm)	
Sucrose	3%	1.75±1.26bc ^z	12.63±2.5ab	3.52±1.72c	0.09±0.04d	75	11.0 ±1.07a
	5%	2.0 ±0.0b	11.33±0.58b	5.76±0.61b	0.30±0.13b	100	8.0 ±1.0b
	7%	2.0 ±0.0b	10.0 ±2.0b	6.16±1.6a	0.58±0.51a	100	7.0 ± 0.0bc
	10%	5.00±1.73a	8.00±1.0c	4.53±1.67bc	0.51±1.34a	100	6.67±1.5c
Glucose	3%	2.33±0.13b	12.03±1.7ab	5.57±1.66b	0.18±0.13c	100	8.73±2.4b
	5%	1.50±0.09c	12.33±2.08a	5.10±0.89b	0.10±0.09c	75	11.40±1.9a
	7%	2.00±0.18b	14.33±1.53a	5.97±2.11ab	0.27±0.18b	100	10.67±1.2a
	10%	1.25±0.12c	11.50±1.0b	5.54±1.57b	0.17±0.12c	75	9.25±2.06ab

^zMean separation within columns by Duncan's multi range test ($P \leq 0.05$)

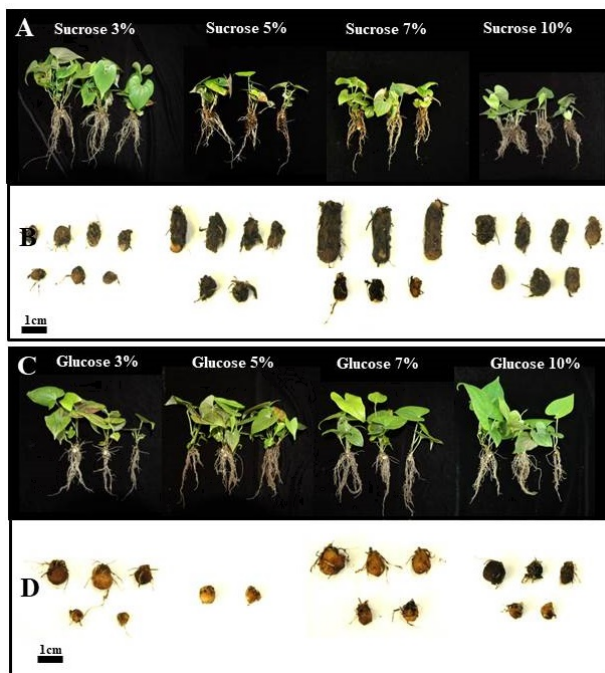


Fig. 2 Microtubers produced and plantlet from *in vitro* plantlets pretreated with sucrose and glucose. Minutubers were harvested 60 days after plantlet transfer to soil. (A) pretreatment with sucrose, (B) microtuber from A plants, (C) pretreatment with glucose, (D) microtuber from C plants

직경생장이 증가하였으며, 10% 처리에서는 4.53 mm로 7% 이상의 농도에서는 비대근의 직경생장이 감소되는 것이 관찰되었다(Table 2 and Fig. 2B). Glucose처리 식물체의 비대근 직경은 5.1~5.9 mm로 처리 농도 간 직경생장의 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2 and Fig. 2D). 식물체당 유도된 비대근의 생중량은 7% sucrose처리 식물체에서 0.58 g으로 3% 처리와 비교하여 5배 이상 높았으며, 7% 이상 농도에서는 생중량이 감소하는 것이 관찰되었다(Table 2). 다양한 탄소급원의 종류 및 농도에서 생육한 기내식물체의 순화 후 생육과 발달

은 sucrose와 glucose 간 상반되는 경향을 보였다. Sucrose처리 기내생육 식물체는 저농도 전처리에서 자란 식물체가 고농도 전처리에서 자란 식물체 보다 순화 후 생육이 우수하였고 순화 후 생존율은 3% sucrose처리에서 자란 기내식물체는 100% 생존하였다(Figs. 3A and 4). Glucose처리 기내생육 식물체는 고농도에서 생육한 식물체가 저농도에서 자란 식물체 보다 생장이 우수한 것이 관찰되었고, 순화 후 생존율 또한 3% glucose처리에서는 37.5%, 10% glucose처리에서는 87.5%의 생존율을 보였다(Fig. 3B and 4). 따라서 얇은 기내비대근 형성과 순화 후 식물체의 생육과 발달을 위해서는 7% sucrose 처리가 적절한 것으로 사료된다.

얇은 탄소급원 처리에 의한 기내비대근 형성에 관한 연구는 주로 탄소원으로 sucrose를 사용하였고 고농도 sucrose처리 시 기내비대근 형성이 가능하였다고 보고하였으며(Shou Yong Choy 1988; Alizadeh et al. 1998; Chen et al. 2007; Ovono et al. 2007과 2009; Olivier et al.; 2012; Li et al. 2014) 본 연구에서도 유사한 연구결과를 보여주었다. 그 외에 마(Dioscorea)속 식물의 비대근 형성에 관한 연구에서도 탄소급원, 옥신, 싸이토키닌 및 호르몬 등을 처리한 결과 탄소급원인 sucrose처리에서 비대근의 형성이 가장 좋았다고 보고하였다(Yan 2011). 또한 비대근을 가진 *Watsonia*(붓꽃과 식물), 마(Dioscorea)속, 더덕 등에서 또한 40~100 g의 고농도 sucrose처리 시 비대근 형성이 촉진되었다고 보고하고 있다(Ascough et al. 2008; Alizadeh et al. 1998; Feng et al. 2007; Kim et al. 2013). Conner과 Falloon (1993)은 고농도의 sucrose처리는 실제로 대사에 필요한 탄소급원으로 이용되지만 삼투스트레스로도 작용할 것이라고 언급하였다. 또한 Yan 등은(2011) 고농도 탄소급원이 에너지원으로써의 역할 그리고 배지 내 삼투성을 증가시켜 환경적으로 스트레스를 유발하는 역할을 하는 것이라고 제시하였다. 최근 보고된 무(radish)의 뿌리 비대와 sucrose와의 관련 연구에서 sucrose의 대사과정은 뿌리비대에 가장 중요한 활동이라고 언급하면서 sucrose 분해는 다

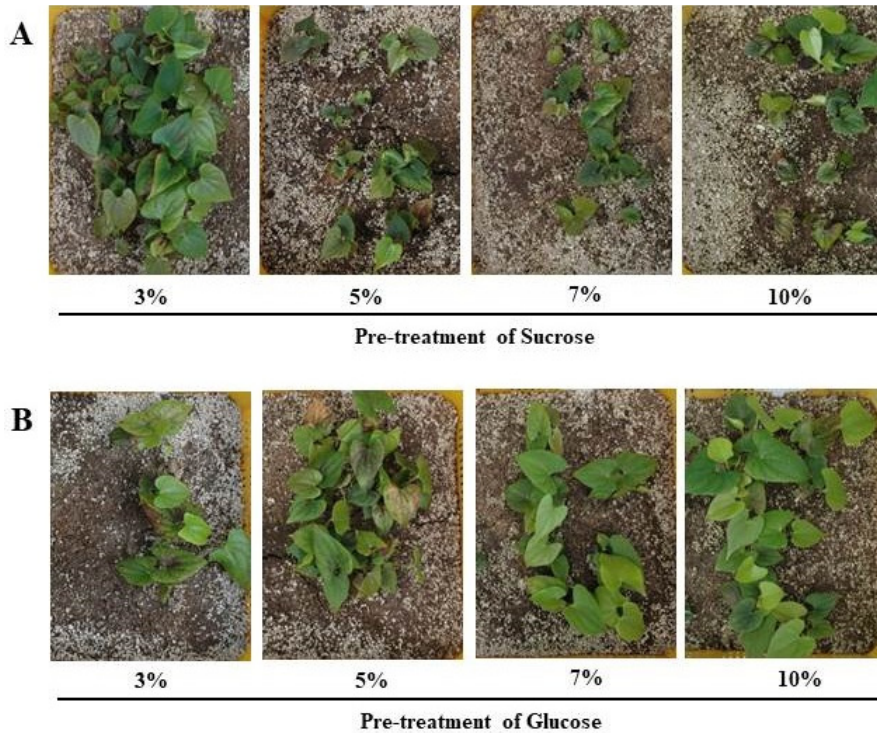


Fig. 3 Acclimatization of *in vitro* growth plantlets after 60 days. (A) acclimatized plants from *in vitro* pretreatment of sucrose, (B) acclimatized plants from *in vitro* pretreatment of glucose

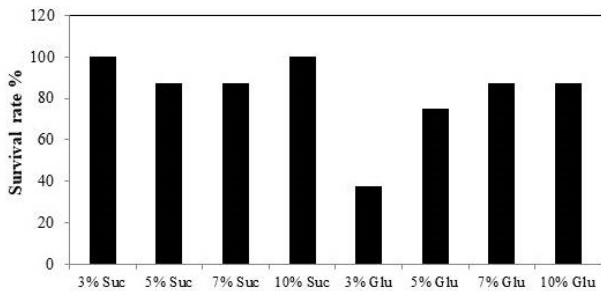


Fig. 4 The survival rate of *Dioscorea cayenensis* after acclimatization for 60 days

세포성 식물에서 탄소대사와 식물의 비대뿌리 발달을 위한 필수 요소라고 언급하였다. 또한 탄소원 대사과정의 핵심 효소를 포함하고 있는 SUS (sucrose synthases) 유전자는 뿌리 비대와 매우 밀접한 관계를 가지고 있으며 SUS는 비대근의 발달을 위한 sucrose의 대사과정에서 중심적인 역할을 할 것이라 추정했다. 이러한 증거는 뿌리비대가 시작될 때 뿌리 조직에서 SUS의 활성이 현저하게 증가했으며 이것은 sucrose의 대사과정이 뿌리비대의 시작 시 스위치와 같은 역할을 한 것이라고 언급하였다. 또한 고구마, 감자 등과 같은 비대근 및 비대경을 가진 식물의 비대뿌리 발달연구에서도 이와 유사한 sucrose 합성에 관여하는 SUS가 비대근 형성에 결정적인 역할을 담당한다고 보고하였다(Yuki et al. 2015). 위에서 언급한 것과 같이 sucrose는 비대뿌리 발달과정에 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있는 것이 확인되었다. 순화식물체

의 생육과 발달에 있어 탄소급원의 영향은 순화이전 적정량의 탄소원 처리는 기내식물체가 종속영양에서 독립영양생장으로 전환 될 수 있는 스위치와 같은 역할을 하며 적정량의 탄소원 처리는 순화 후 식물의 광합성 효율을 증가시켜 식물체의 생육을 개선시킬 수 있다고 보고했다(Sheela et al. 2010). 본 연구에서는 기내 암식물체의 비대근 형성에 탄소급원 종류 및 농도가 밀접한 관계가 있으며, 순화식물체의 생육과 발달에 있어 기내에서 처리한 탄소급원이 영향을 준다는 것을 밝혔다. 이러한 연구는 향후 암(*Dioscorea cayenensis*) 재배에서 가장 문제가 되고 있는 무병묘 식재 재료의 대량생산 및 이와 관련된 연구에 활용이 가능할 것으로 본다.

적 요

이 실험에서 우리는 암의 기내 비대근 유도과 순화에 영향을 미치는 탄소급원의 효과를 연구하였다. 첫 번째로 기내 비대근 유도를 위한 탄소원의 종류와 농도의 효과를 실험하였다. 7% sucrose 처리에서 기내 비대근 유도 효율이 가장 높았으며, glucose 처리에서는 기내비대근이 형성되지 않았다. 두 번째로 기내식물체의 순화 후 생존율과 비대근 형성율을 실험하였다. 순화 후 형성된 비대근의 직경(6.1 mm)과 생중량(0.5 g)은 7% sucrose에서 생육한 기내식물체에서 가장 높았다. 저농도(3%)의 sucrose 처리에서 생육한 기내식물체의 순화 후 생존율은 100%였으나 식물체의 생육과 발달이 억제되었다. 이

리한 결과는 양의 기내 비대근 형성과 순화를 위해 7% sucrose 처리가 적정하며 이러한 기술은 양의 바이러스 및 병 저항성 클론과 우수 개체의 번식을 위해 적용이 가능하다.

Reference

- Alizadeh S, Mantell SH, MariaViana A (1998) *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composite* Hemsl. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 53:107-112
- Ascough GD, Erwin JE, van Staden J (2008) Reduced temperature, elevated sucrose, continuous light and gibberellic acid promote corm formation in *Watsonia vanderspuyiae*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 95:275-283
- Balogun M, Fawole I, Ng S, Ng N, Shiwachi H, Kikuno H (2006) Interaction among cultural factors in microtuberization of white yam (*Dioscorea rotundata*). *Trop Sci* 46:55-59
- Chen FQ, Fu Y, Wang DL, Gao X, Wang L (2007) The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. *J Plant Growth Regul* 26:38-45
- Conner AJ, Falloon PG (1993) Osmotic versus nutritional effects when rooting *in vitro* asparagus minicrown on high sucrose media. *Plant Sci* 89:101-106
- Feng F, Ye CH, Li YZ, Xu WF (2007) Effects of growth regulators, carbon sources and photoperiod on *in vitro* formation and growth and development of microtubers of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Physiol Commun* 43:1045-1049
- Huang CH, Chung JP (2011) Efficient indirect induction of protocorm-like bodies and shoot proliferation using field-grown axillary buds of a *Lycaste* hybrid. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106:31-38
- International Institute for Tropical Agriculture (IITA) and Natural Resources Institute (NRI) (2006) "On the bright side of yam production" Retrieved on January 29, 2009 from: www.new-ag.info/06-3/develop/dev03.html
- John JL, Courtney WH, Decoteau DR (1993) The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 34:245-252
- Kim Ji Ah, Heung Kyu Moon, Yong Eui Choi (2013) Microtuber formation from *in vitro* *Codonopsis lanceolata* plantlets by sugar. *J Plant Biotechnol* 40:147-155
- Li M., J Li, W Liu, L Liu, J Lu, J Niu, X Liu and Q Yang (2014). A protocol for *In vitro* production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). *Biosci Biotechnol Biochem* 78: 1005-1009
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479
- Ng CY, Saleh NM (2011) *In vitro* propagation of Paphiopedilum orchid through formation of protocorm - like bodies. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 105:193-202
- Olivier KA, Konan KN, Anike FN, Agbo GN, Dodo HW (2012) *In vitro* induction of minitubers in yam (*Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 109: 179-189
- Ovono PO, Kevers C, Dommes J (2007) Axillary proliferation and tuberisation of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 91:107-114
- Rayirath UP, Lada RR, Caldwell CD, Samuel K, Asiedu SK, Kevin J, Sibley KJ (2011) Role of ethylene and jasmonic acid on rhizome induction and growth in rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 105:253-263
- Sheela Chandra, Rajib Bandopadhyay, Vijay Kumar, Ramesh Chandra (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett* 32:1199-1205
- Shou Yong Choy Ng (1988) *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 14:121-128
- Thorpe T, Stasolla C, Yeung EC, de Klerk GJ, Roberts A, George EF (2007) Plant propagation by tissue culture 3rd edition, p115-174. In: E.F. George MA Hall, and GJ de Klerk (eds). Chapter 4. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. Springer Dordrecht, Netherlands
- Torres-Morán MI, Martha Escoto-Delgadillo, Sandy Molina-Moret, Diana M. Rivera-Rodríguez, Ana P. Velasco-Ramirez, Diógenes Infante, Liberato Portillo (2010) Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 103:403-409
- Uchendu EE, Shukla M, Saxena PK, Joachim E. R. Keller (2016) Cryopreservation of potato microtubers: the critical roles of sucrose and desiccation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 124: 649-656
- Yan H, Yang L, Li Y (2011) Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104:193-198
- Yuki M, Michihiko S, Kenji K, Nobukazu N, Mari S, Misaki I, Yuichi K, Yoshiyuki M, Hiroyuki K, Kanako K, Tsutomu K, Akihito W, Hajime O, Hiroshi I, Nobuhiro M, Kunihiro N, Yu S & Takuji S (2015) The radish genome and comprehensive gene expression profile of tuberous root formation and development. *Scientific Reports* 5:10835, DOI: 10.1038/srep10835