

기내 배양환경이 거베라 유묘의 기외이식 후 생육에 미치는 영향

이현숙^{*} · 임기병¹ · 정재동² · 김창길³

경상북도 농업기술원, ¹국제식물연구소, ²경북대학교 원예학과, ³상주대학교 원예학과

Effects of Several Culture Conditions on in vivo Growth and Development in *Gerbera hybrida*

LEE, Hyun Suk^{*} · LIM, Ki Byung¹ · CHUNG, Jae Dong² · KIM, Chang Kil³

Kyungbuk Agriculture Technology Administration, Taegu, 702-320, Korea

¹Bussiness unit Genetics and Breeding, Plant Research International P.O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands

²Dept. of Horticulture, Kyungpook Nat'l Univ., Taegu, 702-701, Korea

³Dept. of Horticulture, Sangju Nat'l Univ., Sangju, 742-711, Korea

ABSTRACT Propagules grown at different *in vitro* culture conditions such as heterotrophic, mixotrophic and photoautotrophic conditions were investigated for growth, total photosynthesis ratio and flowering. Survival rate of propagules after transplanting was higher in photoautotrophic propagules than in the heterotrophic and mixotrophic ones. Total photosynthesis was higher plantlets growth in photoautotrophic ($154 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-2}$) those grown than in mixotrophic ($148 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-2}$) and heterotrophic ($102 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-2}$) 30 days after transplanting into fields. Day to flowering of the plant cultured in photoautotrophic condition was shortened by 7~10 days than those of heterotrophic and mixotrophic ones. Length of the petiole, number of leaves, leaf area and chlorophyll content were also increased.

Key words : Flowering, *Gerbera hybrida*, heterotrophic, mixotrophic, photoautotrophic, photosynthesis ratio

서 론

조직배양기술을 이용한 식물의 대량번식은 산업적으로 큰 공헌을 해왔고 앞으로 더 많은 식물에 적용될 가능성이 높지만 여러 가지 요인에 의해서 제한을 받고 있는 것도 사실이다. 제한 요인으로서 재료의 오염으로 인한 초기배양을 확립하기 어렵고, 증식률이 낮은 식물의 증식률을 높이는 문제, 기내 증식된 식물의 토양 활착률을 높여 생산비를 절감하는 문제 등 여러 가지가 있다. 이러한 여러 가지 문제 중에서 특히 기내증식 과정 중 배지의 물리성, 배양환경의 부적합으로 인하여 발생하는 형태적, 생리적으로 비정상적인 유묘의 발생은 기내증식의 효율성 및 토양 활착률을 감소시키는 원인이 되

기 때문에 이에 대한 방지 대책이 필요하다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 배양환경 개선에 관한 연구가 스타치스 (Kozai 등 1987), 카네이션 (Kozai와 Iwanami 1988), 장미 (Kozai 등 1990a), 심비디움 (Kozai 등 1990b) 등을 대상으로 이루어져 왔으며 이들 대부분은 고광도와 CO_2 처리를 함으로써 배양묘의 생육을 촉진시켰다고 하였다. 즉, 광도와 CO_2 농도를 높여줌으로써 환경조절에 의해 배양체 스스로가 광합성 능력을 가질 수 있는 독립 영양체로 전환되어 기외이식 후 생존율이 높고 생장속도가 빨라 품질향상의 효과를 얻을 수 있었다. 이러한 배양환경 개선에 관한 연구 중에서 거베라의 경우 Woltering (1990)과 Jeong 등 (1996)은 기내 배양시에 CO_2 의 농도가 높고 배양용기 내로의 공기순환 횟수가 클 때 유묘 생장에 효과적이었다고 하였으나 미세번식에 관한 부분적인 연구이고 기외로 이식한 후 초기생장과 정식 후의 생육과 연관하여 비교 검토된 바가 없다.

*Corresponding author. Tel 053-320-0289

E-mail 222hs@hamail.net

본 실험은 거베라 배양묘를 대상으로 몇 가지 기내환경을 구분하여 처리함으로써 토양이식 후 생존율, 정식 후 유묘 생장 및 개화상태 등을 비교 검토하여 고품질 종묘생산에 효과적인 기내환경을 설정하는 데 필요한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

절화용 거베라 ‘Ansofie’, ‘Beauty’, ‘Florent’, ‘Nevada’, ‘Princessa’, ‘Tamara’ 등 6품종을 사용하였다. 배양묘는 Murashige 등 (1974)이 사용한 MS 기본배지에 adenine sulfate $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, kinetin $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 한천 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가하고 기본배양환경을 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 광도 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF, 일장 16시간으로 하여 20일간 배양한 후 실험재료로 사용하였다. 기내 환경은 3가지로 구분하였는데 첫째, MS 기본 배지에 adenine sulfate $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IAA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 한천 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가하여 시간당 공기순환 횟수 0.01회 (Kozai 등 1986)로 조절한 밀폐용기에 배양묘를 이식하여 기본배양환경에서 배양하였고 (이하 heterotrophic 또는 타가영양이라 함), 둘째, 타가영양과 동일한 배지를 사용한 후 배양용기 내로 공기주입이 가능하도록 pore size $0.2 \mu\text{m}$ 인 membrane filter를 배양용기의 뚜껑에 2군데 부착하여 시간당 공기순환 횟수를 1회로 조절한 후 배양묘를 이식하였다. 항온실 (HB-301LP) 조건은 광도 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF, 온도 25°C , 16시간 일장, $\text{CO}_2 500 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 가 연속적으로 공급이 가능하도록 하였다(이하 mixotrophic 또는 혼합영양이라 함). 셋째, 별도로 고안된 자동화 배양기 (특허출원 제98-12257호)를 이용하여 인공 혼합 상토 {cocopeat:peatmoss:perlite:vermiculite=30:20:30:20 (% v/v)}를 충진한 트레이 {15 (W) \times 24 (L) \times 3.5 cm (H)}에 혼합영양 상태로 배양한 유묘를 24분씩 3반복으로 이식하여 광도 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF로 조절하고 온도 25°C , 16시간 일장, 상대습도 70%, $\text{CO}_2 500 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 하에서 배양하면서 18시간마다 48 mL 씩 1회 관수하였고 별도의 영양분은

공급하지 않았다 (이하 photoautotrophic 또는 자가영양이라 함). 기내 환경을 달리하여 20일간 배양한 유묘 (타가영양묘, 혼합영양묘 및 자가영양묘)는 각각 50공 셀크기의 트레이로 이식하여 유리온실에서 30일간 육묘하였다. 플러그 육묘시 상토는 cocopeat:peatmoss:perlite:vermiculite=30:20:30:20 (% v/v)으로 혼합 조제한 인공상토를 사용하였고 유리온실은 맑은 날 정오의 광도가 $200 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 가 되도록 차광하였다. 정식은 유리온실에 하였으며 배수성이 양호한 사질 양토에 10a 당 10 ton의 완숙퇴비를 시용한 후 줄 사이 40 cm, 포기 사이 30 cm로 처리당 15주씩 난괴법 3반복으로 하였다. 생육조사는 정식 후 7일, 15일, 30일 후에 각각 지상부 생장, 엽록소 함량과 광합성량을 비교하였으며 광합성률은 휴대용 광합성 측정기 (LI-COR, Li-6200)를 사용하여 오전 11시에 측정하였다. 그리고 기내환경별 유묘의 정식 후 개화 소요일수와 지상부 생장 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

기내배양환경을 달리하여 생산된 유묘를 기외 이식하여 육묘 30일 후의 생존율과 생육상태를 보면 (Table 1), 이식 후의 생존율은 타가영양묘에 비해 혼합영양묘와 자가영양묘에서 높았으며 특히 자가영양묘는 97.6%로 가장 높았다. 이러한 결과는 자가영양묘는 타가영양묘나 혼합영양묘와는 달리 한천배지가 아니라 상토를 사용한 배지에서 배양하였기 때문에 생존율이 높은 것으로 판단되며 이때 생성된 뿌리는 자연 상태에서 발달한 삽목묘의 뿌리와 거의 흡사한 형태였다. McCelland (1989)에 의하면 기내 배양묘는 상토에서 발달한 삽목묘보다 뿌리나 모세근이 두껍게 형성이 되나 도관부의 발달은 저조하여 기외이식 후 지상부의 증산작용과 뿌리의 수분공급 균형이 깨어지게 되어 쉽게 말라죽는 경우가 있으며 이는 순화기간 동안에 차광이나 미스트 장치를 함으로써 새로운 부정근의 발생으로 정상 생육이 가능하다고 하였다. 본 실험의 경우 자가영양묘는 배양 중 뿌리의 발생이 양호할 뿐만 아니라 뿌리형태도 기외 삽목시에 발생하는 뿌리와 거의 유사한 형태로써 지하부에서의 양수분 흡수능력과 지상부

Table 1. Growth of seedlings grown at different culture conditions when transplanted into 50 cells plug tray after 30 days in ‘Beauty’.

Culture conditions	Survival (%)	Petiole length (mm)	Leaf area (mm^2)	Fresh weight (A) (mg/plantlet)	Dry weight (B) (mg/plantlet)	B/A (%)
Heterotrophic ^z	83.3	29.7a ^w	152.1a	475.0b	18.9b	4.0b
Mixotrophic ^y	93.3	19.4a	203.1a	494.5b	19.3b	4.0b
Photoautotrophic ^x	97.6	25.1a	331.8a	1,211.7a	117.7a	9.7a

^zHeterotrophic; closed container (number of air exchange-0.01 time/hour), 30 g · L⁻¹ sucrose and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

^yMixotrophic; air permeable container (number of air exchange-1.0 time/hour), 30 g · L⁻¹ sucrose, 500 mol · mol⁻¹ CO₂ and 70 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF.

^xPhotoautotrophic; medium {cocopeat:peatmoss:perlite:vermiculite=30:20:30:20 (% v/v)} without sugar, under 500 mol · mol⁻¹ CO₂ and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF in culture chamber.

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

의 증산작용에 있어 균형을 유지시킬 수 있었던 것으로 생각된다. 그리고 자가영양묘의 경우 배양중에 발생한 뿌리는 기와 이식 후 묘의 활착을 용이하게 함으로써 기내번식의 기본 단계중 순화단계를 단축하거나 생략시킬 수 있을 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라 자가영양묘는 한천 대신에 지지물로 상토를 사용함으로써 기와이식시 한천을 제거해야 하는 번거로움을 줄일 수 있으므로 기와이식에 소요되는 인력을 절감할 수 있을 것으로 기대된다. 그리고 엽면적, 생체중, 건물중 및 건물비 등도 타가영양묘와 혼합영양묘에 비해 자가영양묘가 좋아 묘소질이 전반적으로 향상되었음을 알 수 있었다.

기와이식하여 활착후 육묘한 유묘를 본 포장에 정식한 후

의 생육을 보면 (Table 2), 정식 후 일수가 경과함에 따라 타가영양묘와 혼합영양묘보다 자가영양묘가 전반적으로 엽병장, 엽수, 엽면적 등이 양호하였으나 통계적 유의성은 없었다. 이상에서 볼 때 배양환경을 달리하여 배양한 유묘들은 기외로 이식 후 활착이 타가영양묘와 혼합영양묘보다 자가영양묘가 상당히 유리하였으나 그 이후의 배양묘간 생장에 있어서는 큰 차이가 없었다. 일반적으로 조직배양을 이용한 종묘생산에 있어서 기외로 이식시 활착이 어려워 차광과 미스트 등 별도의 관리가 필요한데 본 실험의 타가영양묘 경우는 기와이식 시 생존율 향상을 위해 세심한 관리가 필요할 것으로 생각되었으며 이러한 점에서 자가영양묘는 타가영양묘에 비해 상당

Table 2. Growth of propagules grown at different culture conditions according to transplanting days into fields in 'Beauty'.

Culture conditions	After 7 days			After 15 days			After 30 days		
	Petiole length (mm)	No. of leaves	Leaf area (mm ²)	Petiole length (mm)	No. of leaves	Leaf area (mm ²)	Petiole length (mm)	No. of leaves	Leaf area (mm ²)
Heterotrophic ^z	35.2c ^w	3.2a	244.1a	42.6a ^y	3.9a	384.3a	54.1a	4.0a	820.1a
Mixotrophic ^y	45.3b	3.1a	304.4a	51.0a	4.2a	377.6a	55.2a	4.3a	858.7a
Photoautotrophic ^x	52.3a	3.9a	263.0a	57.5a	4.6a	402.7a	58.4a	5.0a	961.3a

^{w,y,x}See foot note of Table 1.

Table 3. Growth of propagules of several cultivars in *Gerbera hybrida* Hort. grown at different culture conditions after 7 days transplanting into fields.

Culture conditions	Cultivars	Petiole length (mm)	No. of leaves	Leaf area (mm ²)	Fresh weight (mg)	SPAD value of leaves
Heterotrophic ^z	Ansofie	38.1	3.5	258.7	2,457.3	37.4
	Beauty	35.2	3.2	244.1	2,880.1	38.4
	Florent	32.4	2.3	253.2	2,646.0	37.4
	Nevada	25.1	2.9	350.0	2,778.4	35.4
	Princessa	39.0	3.4	254.1	2,238.1	36.4
	Tamara	35.0	3.7	366.9	2,205.4	38.4
Mixotrophic ^y	Ansofie	42.1	3.8	292.1	2,622.0	39.4
	Beauty	45.3	3.1	304.4	3,320.7	41.4
	Florent	42.4	3.3	290.9	2,889.0	40.4
	Nevada	35.1	3.1	254.2	2,900.1	40.4
	Princessa	47.0	4.0	280.0	2,717.0	39.4
	Tamara	45.2	4.1	266.8	2,441.9	41.4
Photoautotrophic ^x	Ansofie	47.5	4.0	301.6	2,781.3	40.4
	Beauty	52.3	3.9	263.0	3,455.7	42.0
	Florent	50.0	3.3	363.7	2,925.0	41.4
	Nevada	44.7	3.6	351.5	3,325.5	40.9
	Princessa	54.2	4.0	311.9	2,927.1	40.7
	Tamara	45.1	4.3	303.8	2,918.0	41.4
LSD _{0.05}						
Culture systems (A)		1.2	0.1	14.1	50.5	3.4
Cultivars (B)		1.2	0.1	15.7	137.6	3.0
A × B		2.4	0.2	27.1	238.3	5.3
Significance						
Culture systems (A)		**	**	**	**	ns
Cultivars (B)		**	**	**	**	ns
A × B		**	**	**	ns	ns

^{w,y,x,z}See foot note of Table 1.

NS, **Nonsignificant or significant at 5% level.

히 유리할 것으로 판단되었다.

거베라의 품종별로 기내 배양환경을 달리하여 기외이식 후 생육을 조사한 결과 (Table 3), 모든 품종에서 타가영양묘보다 혼합영양과 자가영양묘의 생육이 양호하였으며 품종간 차이는 없었다. 현재 거베라는 절화용과 분화용 등 약 60여 품종이 국내에 도입되어 있으며 도입된 품종들은 대부분 화란, 프랑스 등에서 육성된 것으로 기후적으로 국내 재배에 적합한 품종이 주로 선발되어 재배하고 있다. 또한 거베라는 다른 숙근류나 구근류와 같이 저온처리 또는 일장처리에 의하여 개화가 촉진되는 것이 아니라 정식 후 일정 기간 (약 3~4개월) 생육하면 화아가 분화되어 개화한다. 본 실험에 사용한 품종들은 최근 우리나라에서 인기 있는 절화용 대류계통으로 조직 배양묘 생산에 주로 이용되고 있으며 까다롭지 않은 재배상의 특성을 감안한다면 정식 후 생장하여 개화기에 도달할 때까지 소요되는 시간에 있어 품종간 차이는 크지 않을 것으로 생각된다.

배양환경을 달리하여 생산한 유묘를 기외이식한 후 총광합성을 조사한 결과 (Figure 1), 기외이식 후 생장이 계속되는 동안에 자가영양묘가 가장 높았는데 타가영양묘는 자가영양묘와 혼합영양묘에 비해 상당히 떨어졌다. 3종류의 배양묘가 모두 정식 후 7일이 경과할 때까지는 총광합성량이 $50 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이하를 유지하다가 정식 30일 후에 자가영양묘는 $154 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로서 가장 높았고 혼합영양묘는 $148 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이었고 타가영양묘는 $102 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 를 유지함으로써 가장 낮게 나타났다. 특히, 기외 이식 7일 후 타가영양묘의 광합성을 매우 낮았는데 자가영양묘나 혼합영양묘에 비해 이식 후 활착이 늦고 생육이 부진하여 스스로 광합성을 할 수 있는 식물체로의 전환이 지연되었기 때문인 것으로 생각된다. 이식 후 시간이 경과함에 따라 타가영양묘도 광합성을 증가하였으나 증가폭은 자가영양묘나 혼합영양묘에 비해 작았다.

Choi (1994)는 조직배양 감자를 기외로 이식하였을 경우 일반묘에 비해 초기생육은 부진하지만 중·후기에는 비슷한데 외부로부터 수분과 영양물질이 잘 되는 조건이나 뿌리의 발달이 양호한 식물체는 일반 씨감자와 비슷한 발육을 할 수

있다고 하였는데 본 실험의 거베라 경우에도 생육 초기에 광합성을 매우 낮았지만 생육이 진전되면서 광합성량도 큰 폭으로 증가함을 볼 수 있었다.

배양환경을 달리하여 생산한 유묘를 각각 기외이식한 후 개화시와 생장을 비교해 보면 (Table 4), 자가영양묘가 타가영양묘와 혼합영양묘에 비해 개화시는 7~10일 정도가 빨랐고 엽병장, 엽수, 엽면적 등이 양호하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 자가영양과 혼합영양묘는 타가영양묘보다 기외이식 후 활착률도 15% 이상 증가하였고 정식 후 계속되는 묘의 생장도 양호하였으며, 특히 자가영양묘는 타가영양묘나 혼합영양묘에 비하여 기외이식 후 생육이 빠르게 진전되어 개화기를 앞당길 수 있었다.

이러한 결과는 화훼산업의 출발이 종묘생산이고 종묘의 품질이 수확품질을 좌우함과 연관하여 생각할 때 커다란 의미를 부여할 것으로 판단되며 앞으로 고품질의 종묘생산에 관한 보다 더 세심한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

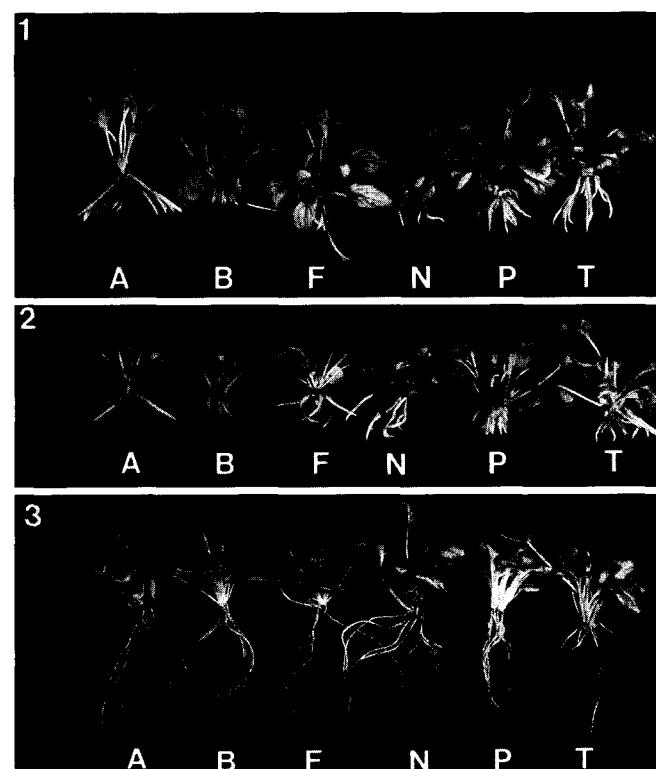


Figure 2. Propagules growth of several cultivars (a; Ansofie, b; Beauty, f; Florent, n; Nevada, p; Prinssesa, t; Tamara) in *Gerbera hybrida* Hort. grown at different culture conditions.

1; Heterotrophic condition (closed container (number of air exchange-0.01 time/hour), $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, PPF $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

2; Mixotrophic condition (air permeable container (number of air exchange-1.0 time/hour), $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, $500 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 and $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF).

3; Photoautotrophic condition - medium {cocopeat:peatmoss: perlite:vermiculite=30:20:30:20 (% v/v)} without sugar, under $500 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 and $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF in culture chamber.

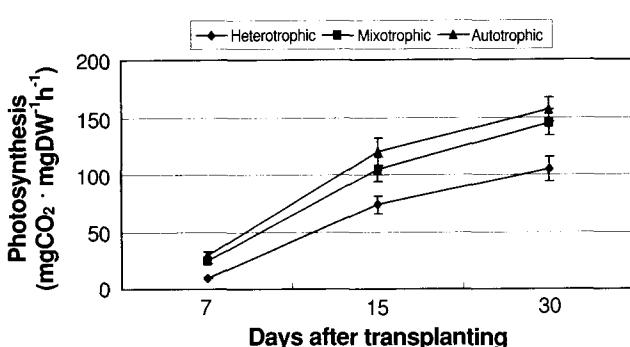


Figure 1. Photosynthesis of propagules grown at different culture conditions according to transplanting days into fields in 'Beauty'.

Table 4. Seedling growth and days to flowering of propagules grown at different culture conditions after trans planting into fields in 'Beauty'.

Culture conditions	Days to flowering	Petiole length (mm)	No. of leaves	Leaf area (mm ²)	SPAD value of leaves
Heterotrophic ^z	122	47.6a ^w	4.5a	434.7a	44.1a
Mixotrophic ^y	119	53.0a	5.2a	477.1a	45.2a
Photoautotrophic ^x	112	58.5a	5.6a	502.0a	48.4a

^{zyxw}See foot note of Table 1.



Figure 3. Flowering of propagules grown at different culture conditions after planting into fields {Left: Heterotrophic condition-closed container, air exchange frequency ; 0.01time/hour, (MS medium with 30 g · L⁻¹ sucrose and 40 μmol · m⁻² · s⁻¹), Right; photoautotrophic condition-medium [cocopeat:peatmoss:perlite:vermiculite=30:20:30:20 (% , v/v)] without sugar, under 500 mol · mol⁻¹CO₂ and 40 μmol · m⁻² · s⁻¹ PPF in culture chamber}.

적 요

배양환경을 달리하여 생산한 배양묘 (타가영양묘, 혼합영양묘, 자가영양묘)를 기외 이식한 후에 생존율은 타가영양묘에 비해 혼합영양묘와 자가영양묘가 높았고 특히 자가영양묘는 97.6%로 가장 높았으며 정식 일수가 경과함에 따라 엽병장, 엽수, 엽면적은 자가영양묘가 타가영양묘와 혼합영양묘에 비하여 다소 좋았으나 유의성은 없었다. 정식 30일 후 유묘의 총광합성량은 자가영양묘가 154 mgCO₂ · mgDW⁻¹h⁻¹로서 혼합영양묘 (148 mgCO₂ · mgDW⁻¹h⁻¹)와 타가영양묘 (102 mgCO₂ · mgDW⁻¹h⁻¹)보다 높았다. 그리고 개화시기는 자가영양묘가 타가영양묘와 혼합영양묘에 비해 7~10일 정도가 빨랐고 엽병장, 엽수, 엽면적, 엽록소 함량 등도 양호하였다.

사사 - 본 연구는 농림수산 기술개발사업에 의하여 수행된 1996년에서 2000년까지의 연구결과 중 일부임.

인용문헌

- Choi YW, Cho JL and Kim LS (1994) Studies on rapid in vitro multiplication of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers and their practical use. J Kor Soc Hort Sci 35:213-219
- Jeong BR, Yang CS and Park JC (1996) Growth of *Gerbera hybrida* in vitro as affected by CO₂ concentration and air exchange rate of the vessel. Acta Hort 440:510-514
- Kozai T, Kazuhiro FW and Ichiro WT (1986) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels (2). Effect of stoppers and vessels on gas exchange times between inside and outside of vessels closed with stoppers. J Agr Met 42:119-127
- Kozai T, Iwanami and Fujiwara K (1987) Environment control for mass propagation of tissue cultured plantlets (1). Effect of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. Plant Tiss Cult Lett 4(1):22-26
- Kozai T and Iwanami Y (1988) Effect of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon flux on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J Jap Soc Hort Sci 57:279-288
- Kozai T, Lee H and Hayashi M (1990a) Photopropagation of Rosa plantlets under high CO₂ and high photosynthetic photon flux conditions. p.173. In Abstr. XXII Intl. Hort. Congr. 27 Aug.-1 Sept. 1990. Firenze, Italy
- Kozai T, Oki H and Fujiwara K (1990b) Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet in vitro. Plant Cell Tiss Org Cult 22:205-211
- McClelland MT (1989) Effects of proliferation and rooting micro environments on micropropagated woody plant. MS Thesis, University of illinois, Urbana
- Murashige T, Serpa M and Jones JB (1974) Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. HortSci 9:175-180
- Woltering EJ (1990) Beneficial effects of carbon dioxide on development of gerbera and rose plantlets grown in vitro. Sci Horticul 44:341-345