

유식물체 증식·순화용 배양시스템 개발

한길수 허정욱 김시찬 이용범 김상철 임동혁 최홍기

Development of Culture System for Masspropagation and Acclimatization of Tissue Cultured Plantlets

K. S. Han J. W. Heo S. C. Kim Y. B. Lee S. C. Kim D. H. Im H. G. Choi

Abstract

In mass production of seed-potato plantlets, the processes for *in vitro* propagation and *ex vitro* acclimatization with a high cost should be improved by a culture system with environmental control using scaled-up culture vessels. The experiment was conducted to design a hydroponic culture system for enhancement of growth and development of seed-potato (*Solanum tuberosum*) plantlets cultured under photoautotrophic (without sugar in culture medium) conditions with controlled light intensity and ventilation rate. The culture system was consisted of scaled-up culture vessels, ventilation pipes, a multi-cell tray and an environmental control system (ECS) for optimum controlling in temperature, light intensity, ventilation rate, and culture-medium supply. Growth and development of the plantlets was significantly increased under the ECS compared with a conventional culture system (CCS) of photomixotrophic culture (with sugar in culture medium) using small scale vessels. For 21 days, leaf area of the plantlets was expanded more than 2 times, and number of internodes also approximately 4 times greater under the ECS. In addition, the photoautotrophic growth in sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) plantlets was greater more than 2 times compared with the CCS.

Keywords : Seed potato, Plantlet, Plant tissue culture, Forced ventilation, Masspropagation, Growth and development

1. 서론

조직배양에 의한 씨감자 배양소식물체(유식물체)의 생산은 생장점 배양 → 배양소식물체 유도 → 증식 → 발근유도 → 순화 등으로 여러 공정을 거쳐 이루어진다. 기내에서는 주로 경삽의 형태로 유식물체를 증식하고 기외에서는 수경재배 방식으로 씨감자를 생산하고 있다. 또한 수경재배 전단계인 감자 유식물체의 기내생산에 있어서 소형의 배양용기에서 증식하고 기외에서 순화하는 작업이 전체 노동력의 70% 이상을 차지하고 있어 기내 유식물체의 증식과 기외 순화공정을 생략화할 수 있는 기술개발이 필요하다.

한편, 조직배양기술을 이용한 기내 유식물체생산에 있어서 감자 이외에 국화, 고구마 및 카네이션 등 다수 유식물체의 광독립영양배양(배지에 당을 첨가하지 않고 광강도 및 이산화탄소를 시용하여 배양체를 배양함)은 이들 유식물체의 광합성 및 생장을 촉진하는데 매우 유효한 배양기술로 알려져 있다(Nakayama et al., 1991; Heo et al., 1999; Shim et al., 2001; Kim et al., 2004). 이들 유식물체의 기내 광합성 및 생장을 촉진하기 위하여 배지에 당을 첨가하는 대신에 광강도나 기내 이산화탄소 농도를 증가시키는데, 일반적으로 기내에서 배양되는 다수 유식물체의 생장을 최대로 하는 광강도는 약 $150\text{-}250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 범위로 알려져 있다. 또한,

The article was submitted for publication in July 2006, reviewed and approved for Publication by the editorial board of KSAM in April 2007. The authors are Kil Su Han, Researcher, KSAM member, Jeong Wook Heo, Si Chan Kim, Researcher, KSAM member, Yong Beom Lee, Senior Researcher, KSAM member, Sang Cheol Kim, Researcher, KSAM member, Dong Hyeok Im, Researcher, KSAM member, and Hong Gi Choi, National Institute of Agricultural Engineering, RDA, Suwon, 441-707, Korea. Corresponding author: K. S. Han, Research Engineer, National Institute of Agricultural Engineering, RDA, Suwon, 441-707, Korea; Tel: +82-31-290-1889; Fax: +82-31-290-1930; E-mail: <han3188@rda.go.kr>.

배양기내 이산화탄소 농도를 증가시키기 위해서는 직접적으로 이산화탄소를 사용하는 방법과 이산화탄소를 직접 사용하지 않고 간접적으로 배양기내 환기량을 조절하여 명기동안 이산화탄소 농도를 대기수준으로 유지시키는 방법이 있다 (Heo et al., 1999; Heo et al., 2001; Nguyen et al., 2001). 이산화탄소를 직접적으로 사용하지 않고 유식물체의 성장단계에 맞추어 환기량을 조절하므로써 명기동안 기내의 이산화탄소 농도의 급격한 저하를 막고 유식물체의 증산 및 광합성 등의 물질대사를 촉진시킬 수 있다.

따라서 본 연구는 광강도 및 환기량을 조절하는 광독립영양배양방법에 의하여 씨감자용 감자 유식물체의 증식·발근·순화가 연속적으로 이루어질 수 있는 적정 배양환경 제어 알고리즘을 분석하여 수경재배형 배양시스템을 개발하기 위한 기초기술을 제공하기 위하여 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시작기 설계

기존의 유식물체 배양방법은 삼각플라스크와 같은 소형의 배양병을 이용하기 때문에 배양환경의 조절이 어렵고 많은 양을 배양하기에 부적절하므로 증식과 순화가 가능한 배양시스템이 필요하다. 그림 1은 다음과 같은 기능을 수행할 수 있는 시스템의 개략도이다. 1) 기내 조직 배양체의 성장단계에 따라서 환기량 및 배양액 입배출 시간을 자동으로 제어할 수 있고 2) 조직배양실내 배양체 증식용뿐만 아니라 조직배양묘의 온실내 순화용 환경조절이 가능하며 3) 배양액 저장탱크와 배양조 사이에 자외선 살균등을 설치하여 배양기간 동안 배양액의 오염을 방지하여야 하고 4) 광강도, 온도 및 pH 등 배양액 및 배양환경을 수시로 확인하여 배양체의 성장에 적

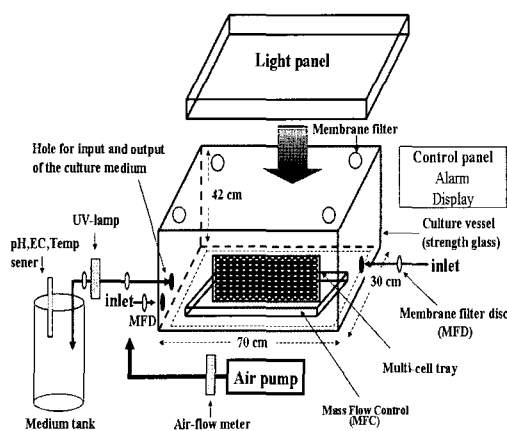


Fig. 1 Schematic diagram of the system for mass propagation and acclimatization.

Table 1 Introduction of the environmental culture system

Plant materials	Single node cuttings (potato, chrysanthemum, sweet potato)
Culture medium	1/2 MS with sucrose of 30 g L ⁻¹ supply: Ebb & Flood
Supporting material	Perlite
Culture vessel	Acrylic panel (W 700×L 420×H 300 mm, thickness 5 mm),
Medium supply	Magnetic pump, PM-15NM, shaft material: ceramic, tube: φ14mm
Ventilation rate control	0~100 cc min ⁻¹ , M3030V
Light control	Lamp type: External Electrode Fluorescent Lamp (W 600 × L 300 × H 40 mm) lighting part: 6 mm in diameter, 400 mm in length, 24 ea control range: 50~150 μmol m ⁻² s ⁻¹
Sterilization	UV lamp (253.7 nm in wavelength, 6 Watt in electric power)
Contamination alarm	Alarm system according to the variation of pH value
Main control board	Arm9 CPU (200 MHz), display (1024X768), flash memory (64 MByte), RAM (64 MByte), touch control, USB Interface, RS232C Interface, ADC (10 bit)
pH sensor and controller	- pH sensor: PHOENIX Electrode Company, BP620DLG-B210, Steam Sterilizable, 0~13 pH, -5~135°C, 150PSI, Double Junction - CPU (90S2313), AD7135 (15 Bit)
Temp. sensor	PT100, Range: -200~600°C, stainless still (316 L)

절한 배양환경을 조절할 수 있어야 한다.

나. 식물재료 및 환경조건

(1) 식물재료

성능평가 및 예비실험에 적용된 식물재료는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 당 30 g/L를 첨가한 광혼합영양배양 조건에서 증식된 단절단엽의 감자(*Solanum tuberosum*, cv. *Dejima*), 국화(*Chrysanthemum morifolium*, cv. *Cheonsu*) 및 고구마(*Ipomoea batatas*, cv. *Shincheonmi*) 배양체를 이용하였다. 각 단절단엽의 배양체들은 실험 개시일에 1/2 MS배지에 당을 첨가하지 않은 액체배지에서 배양하였다(광독립 영양배양 조건). 각 배양체 수는 50개체였으며 반복수는 4였다. 실험기간은 실험개시일을 배양 1일째로 하여 21일로 하였다. 강제환기 및 배양액 입배출은 식물체 이식 7일째부터 실시하였다.

(2) 배양실 환경조건

배지는 고압멸균기를 이용하여 살균하였으며 배양조, 공기 공급장치, 배양체지지물 및 트레이는 UV살균하였다. 배양조 및 환경조절장치가 위치한 배양실내 명기 및 암기의 대기온도는 각각 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 및 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 조절하였으며 상대습도는 $60\pm 10\%$ 였다. 배양액의 pH는 멸균전 5.7이었으며 배양기내 환기는 배양개시 7일후부터 개시하였다. 배양기간 동안 3일간격으로 200, 400 및 600 cc min^{-1} 로 증가시켰으며, 실험종료일의 환기량은 600 cc min^{-1} 였다. 실험기간 동안 배양조 상부에 위치한 광강도는 $100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 로 조절되었다.

다. 시스템의 구성

조직배양용 환경조절형 배양시스템(Environmental Control System)은 그림 2와 같이 배양소식물체의 광합성 및 생장촉진에 의한 순화형 배양묘 생산을 목적으로 개발하였다. 배양조는 배양액 입배출 및 환기를 위한 구조로 설계하였으며 배양액 입배출구 및 공기주입구는 실리콘 튜브로 연결한 후에 배양조내 오염을 방지하기 위하여 공극이 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 인 공기여과필터를 부착하였다(Fig. 1 참조). 배양액 탱크에는 실험기간중 배양액을 무균상태로 보존하기 위하여 탱크의 배양액 부입구에 오염방지를 위하여 배양조와 동일한 필터를 부착하였다. 또한 탱크의 입구에는 배양액의 EC, pH 및 온도를 측정할 수 있는 센서를 부착하여 배양액의 pH변화에 따른 생물반응기내 오염 발생여부를 부저작동에 의해 예측할 수 있도록 하였다. 환기량 조절장치는 공급되는 공기의 양을 제어하기 위한 장치로, 분당 환기량을 제어할 수 있도록 하였으며 이 조절장

치에 의해 제어되는 공기량과 환기기간동안에 누적된 공기의 양을 계측할 수 있도록 조절하였다.

배양액은 마그네틱 펌프를 이용하여 배양조로부터 입배출되었으며 on 및 off시간 이외에 배양액을 배출한 상태나 흡입된 상태에서 일정시간 유지할 수 있도록 조절하였다. 배지 공급 및 배출시간은 각각 2시간으로 하였으며 배양액이 공급된 후 1시간동안 흡입상태를 유지하도록 설정하였다. 또한 배양조에서 배양액이 배출되면 그림 2와 같이 UV 살균이 가능한 살균장치를 통과하여 배양액이 자동 살균되도록 하였다.

광강도 조절장치는 실험기간 동안 광강도의 변화를 확인할 수 있도록 광의 전원 콘센트를 출력포트의 콘센트에 연결하여 자동제어하도록 설계하였다. 광원은 램프 표면의 열발생이 적은 백색의 외부전극형광램프로 하였으며 광강도는 $50 - 150\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (약 4,400 - 9,500 lux)로 조절가능하다.

한편, 통합제어장치는 그림 3에서 보는바와 같이 목적으로

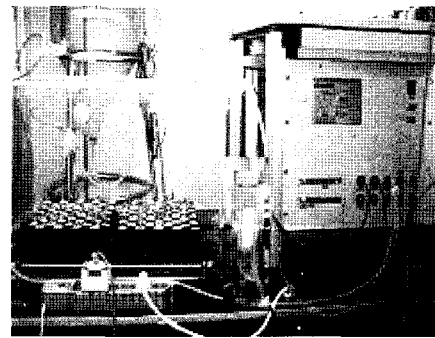


Fig. 2 ECS for masspropagation and acclimatization of *in vitro* plantlets.

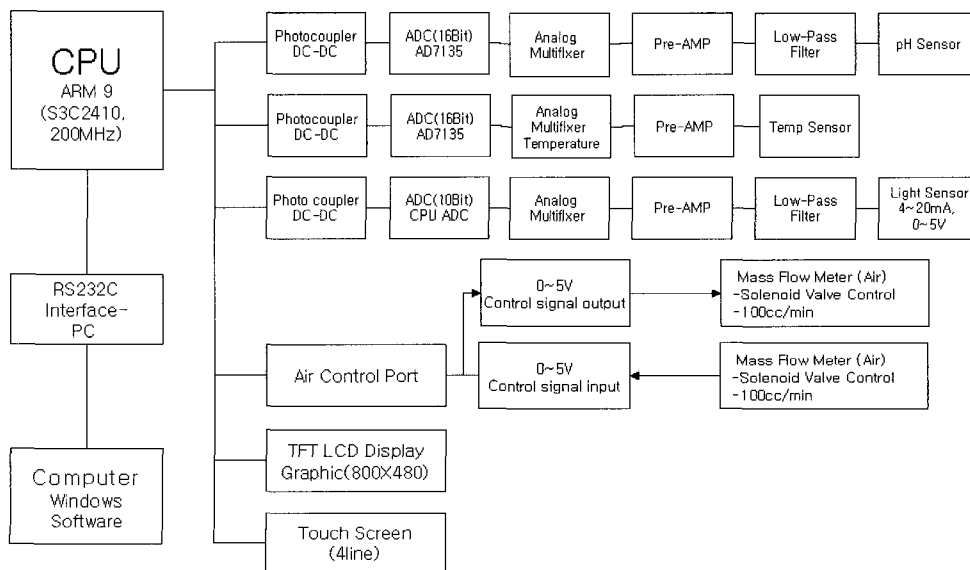


Fig. 3 Block diagram of total control system of ECS.

하는 각각의 설정값을 임의로 설정하여 환경요인을 측정 및 제어할 수 있으며, 온도, pH 및 광강도와 같은 요인들의 값을 보정할 수 있는 보정기능을 첨가하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 시스템 제작

(1) 시스템의 제원

이 시스템은 배양조, 배양환경통합제어장치, 광강도 제어장치, 살균 및 오염경보장치 등으로 구성된다. 시스템은 환기량 및 배양액 입배출 제어가 가능하고 배양체 증식용뿐만 아니라 조직배양묘의 온실내 순화용 환경조절장치로 이용할 수 있다. 또한 배양액 저장탱크와 배양조 사이에 자외선 살균등을 설치하여 배양액의 오염을 방지하며 광강도, 온도 및 pH 등 배양체의 생장에 적절한 배양환경을 조절할 수 있도록 제작하였다.

나. 성능시험

(1) 감자 배양소식물체의 성장

광독립기형 증식 및 순화용 배양시스템 내에서 21일간 광독립영양배양방법(배지에 당을 첨가하지 않고 광강도 및 환기량 조절에 의해 배양체의 성장을 촉진하는 배양방법)에 의해 배양한 결과, 배양시스템구에서 종래의 배양방법(배지내 당을 첨가하여 400~500 mL의 소형배양기에서 배양하는 광혼합영양배양방법)에 의해 배양된 소식물체에 비해 현저한 성장촉진효과가 있는 것으로 나타났다.

배양시스템구에 있어서 감자 배양소식물체의 엽면적은 대조구에 비해 2배 이상 증가하였다(Fig. 4). 배양기간 동안 증가된 마디수는 대조구에서 3.4였으며 배양시스템구에서 6.9개로, 배지에 당을 첨가하지 않고 환기횟수 및 광강도를 증가시키는 광독립영양배양방법을 이용한 배양시스템구에서 마디수가 2배 이상 증가하였다. 한편, 21일간 개발된 배양시스템 조건하에서 배양된 감자 배양소식물체의 마디수 증가는 대조구인 관행구에 비해 현저히 증가하였는데, 배양시스템구에서는 관행구에 비해 약 2배 이상 증가하였다(Fig. 5). 생체중 및 건물중에서도 두 처리구간에 통계적인 유의차가 인정되어 배양시스템구에서 현저한 성장촉진효과가 인정되었다.

또한, 배양종료 후 배양소식물체를 포트에 정식하여 순화시킨 결과, 생존율이 100%인 것으로 보아 환기조절에 의한 기내순화가 이루어진 것으로 판단되었다.

이상으로 감자 배양소식물체 증식에 있어서 배양시스템의 이용은 배양소식물체의 성장 및 증식에 있어서 관행의 배양

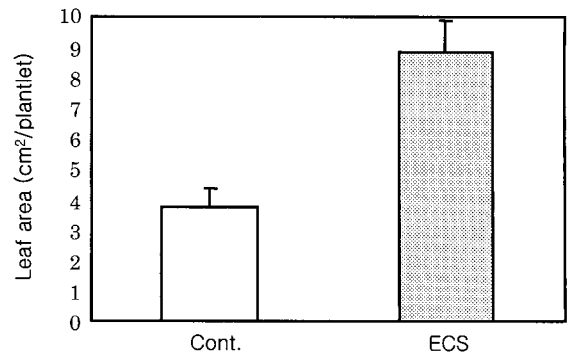


Fig. 4 Leaf area of seed-potato plantlets on day 21.

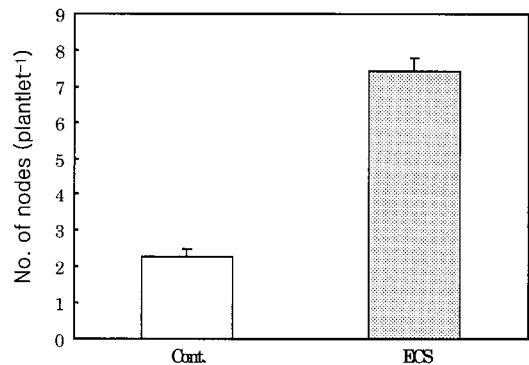


Fig. 5 Number of nodes of seed-potato plantlets on day 21.

방법에 비해 유효한 것으로 생각되며, 대형의 배양조를 이용한 환경조절형 배양시스템은 환기에 의해 배양조내 상대습도를 저하되고 이에 따라 소식물체의 순화촉진 및 순화기간 단축에도 효과적일 것으로 생각된다.

(2) 국화 배양소식물체의 성장

배양개시 7일 이후부터 환기에 의한 소식물체의 성장촉진 효과가 나타나기 시작하여 배양 14일째에는 대조구와 현저한 성장차이를 나타내었다(Fig. 6). 환기조절형 배양시스템에서 21일간 배양된 국화 배양소식물체의 생장은 종래의 배양방법에 비해 현저히 촉진되었다. 배양개시 21일째 배양소식물체의 생체중, 건물중, 전개엽수 및 엽면적은 통계적인 유의차가 인정되어 관행의 배양방법에 비해 배양시스템을 이용한 배양에서 현저하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 국화 배양소식물체의 생체중은 대조구인 관행구에서 식물체당 328 mg였는데 비해 배양시스템구에서는 700 mg로 약 2배 증가하였으며 엽면적은 통합제어장치 처리구(20 cm²)에서 대조구(9.4 cm²)에 비해 2배 이상 증가하였다. 대조구의 소식물체는 배양 3주째에 뿌리발생이 거의 이루어지지 않았으나 배양시스템구에서는 근부발달이 왕성하였는데, 이것은 지상부 및 지하부의 환기처리에 의한 것으로 생각되었다.

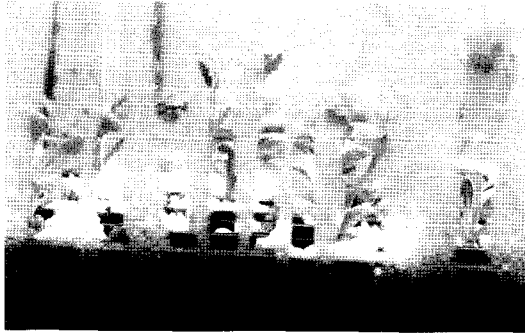


Fig. 6 Chrysanthemum plantlets on day 14.



Fig. 8 Sweet potato plantlets on day 14.

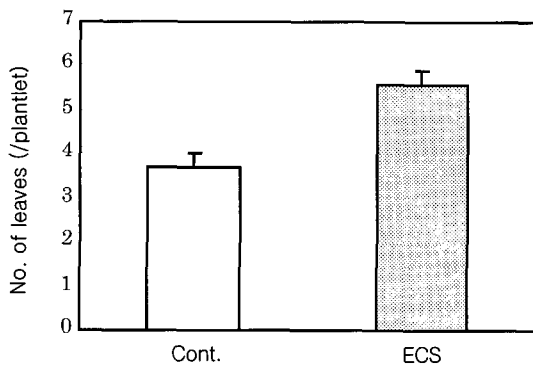


Fig. 7 Number of unfolded leaves of chrysanthemum plantlets on day 21.

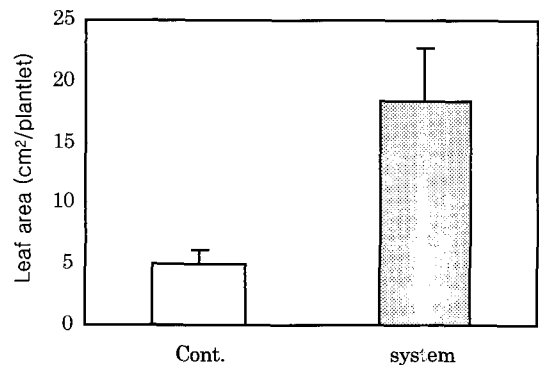


Fig. 9 Leaf area of sweetpotato plantlets on day 21.

(3) 고구마 배양소식물체의 생장

대조구에 비해 배양시스템구에 있어서 배양소식물체의 생장은 통계적으로 유의하게 증가하였다. 환경조절형 배양시스템에서 21일간 배양된 고구마 배양소식물체의 근부 생체중은 대조구에 비해 2배 이상 증가하였다. 대조구의 뿌리는 가늘고 긴 형상을 나타내는 반면 배양시스템 조건하에서 배양된 소식물체의 경우에는 굵고 짧게 형성되었다. 배양개시 21제 배양시스템구에서의 식물체의 건물중은 대조구에 비해 2배 이상 증가하였다. 배양시스템에 있어서 엽면적은 대조구에 비해 3배 이상 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 9). 배양시스템은 국화 배양소식물체의 경우와 마찬가지로 고구마 배양소식물체의 생장에 유의한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

감자뿐만 아니라 국화 및 고구마 배양소식물체의 성능시험을 통하여 환경조절형 배양시스템은 이들 소식물체의 기내 생산에 매우 유효한 것으로 판단되었다. 특히, 배양조내 환기에 의한 소식물체의 성장촉진은 배양기간 동안, 환기에 의해 소식물체를 둘러싼 엽면경계층 저항이 작아지고 이에 의해 증산 및 광합성과 같은 물질대사가 활발히 이루어진 결과로 판단되었다. 국화 및 포도와 같은 소식물체들은 관행의 소형 배양기를 이용하여 배지에 당을 첨가하는 대신에 배양기 뚜껑에 환기필터를 부착하여 환기량을 증가시키고 광강도를

높여줌으로서 이들 소식물체의 광합성 및 생장을 촉진시키는 배양방법에 의한 대량생산에 대한 연구들이 진행되어 왔다 (Nakayama et al., 1991; Shim et al., 2001; Kim et al., 2004). 이밖에 고구마 나 커피 배양소식물체의 기내생장 촉진을 위한 환기실험 결과, 필터에 의한 수동적 환기보다 배양조를 크게 하여 공기펌프를 이용한 능동적 환기에 의해 소식물체의 광합성 및 생장이 현저히 촉진된다(Heo and Kozai, 1999; e. g., Heo et al., 2001; Wilson et al., 2001 이들 연구와는 달리, 환경조절형 배양시스템은 환기량 뿐만 아니라 광강도, 온도 및 배양액 pH등의 환경요인을 일시에 조절하고 실험기간 동안 이를 데이터화할 수 있는 통합제어 기술을 갖추고 있다. 따라서 환기필터 등을 이용한 간접적 환기에 의한 성장촉진을 유도한 선행과 연구들에서 제시된 배양공정을 효율적으로 자동제어할 수 있을 것으로 판단된다.

다. 실용화를 위한 개선사항

감자 배양소식물체의 증식 및 순화용 배양시스템 개발을 위한 기초 자료를 얻기 위해 고안된 배양시스템은 감자 배양소식물체 이외에 국화 및 고구마의 기내 삽수 증식 및 기내 성장뿐만 아니라 기외순화에 효과적인 것으로 판단되었다. 배양시스템은 감자를 비롯한 기타 기내 배양소식

물체의 기내 광독립영양생장(배지에 첨가하는 당을 생장에 이용하는 대신에 환기량 및 광강도를 증가시키므로서 공기중의 이산화탄소를 탄소원으로 하여 독립적으로 생장함)을 촉진하여 결과적으로 관행의 배양방법에 비해 배양 소식물체의 생장을 촉진시킬 수 있다.

본 실험에서는 배양기간이 길지 않았기 때문에 배양액 pH 보정을 수행하지는 않았으며 환기량 조절에 의한 영향을 검토하였으나, 개발된 배양시스템은 배양조를 둘러싸고 있는 물리적, 화학적 환경요인(배양액 pH, 배양액온도, 광강도, 환기량)의 변화를 관찰할 수 있도록 설계하였다. 특히, 배양액의 오염발생을 경보하여 배양액 pH를 보정할 수 있으며 광강도 및 환기량을 정기적으로 측정하며, 배양소식물체의 생장 단계에 맞추어 환기량을 제어할 수 있다. 또한, 배양시스템은 수경재배 방식의 하나인 Ebb & Flood 방식을 응용하여 배양조내 배양액을 입배출시키는 방식으로 지하부의 용존산소농도를 높일 수 있어 배양소식물체의 근부생장을 촉진시킬 수 있다. 통합제어장치는 지하부뿐만 아니라 지상부로의 환기량 조절을 가능하도록 설계하여 각 Cell마다 환기량을 적절하게 조절하므로써 배양소식물체의 광합성 및 증산속도 등의 물질대사를 촉진할 수 있다. 그러므로 증식 및 순화용 배양시스템은 배양에 4-6주 소요되는 감자, 국화 및 고구마뿐만 아니라 목본식물이나 난과식물 등 배양기간이 6주 이상으로 비교적 긴 식물체의 기내 생장촉진 및 기외 순화기간 단축에도 효과적인 것으로 생각된다.

본 연구는 배양시스템을 개발하기 위한 기초기술을 제공하기 위하여 수행하였기 때문에 실용화를 위하여 다음과 같은 사항이 개선되어야 할 것으로 판단된다. 1) 배양조내에 설치된 강제환기용 파이프의 무게를 재고하여 배양조를 둘러싼 시스템을 경량화할 필요가 있다. 2) 배양조의 반영구적 이용을 위하여 아크릴 패널로 제작된 배양조를 강화유리 등, 배양조의 광투과성을 향상시키며 배양조의 살균작업이 용이한 재질로 바뀌어야 할 필요가 있다. 3) 통합제어장치는 현재 장치 내에 유량계를 포함하고 있지 않기 때문에 환기량 조절작업이 수동으로 이루어지고 있다. 따라서 정확한 환기량 측정 및 제어를 위하여 환기량을 자동으로 측정 및 조절할 수 있는 장치개선이 필요하다. 4) 환기량 조절범위는 0~1,000 cc/min까지 증가시켜서 배양소식물체 생장후기단계의 환기량을 증가시킬 필요가 있다. 5) 또한 배양소식물체 배양후기의 광독립영양생장을 더욱 촉진시키기 위하여 현재 광강도 제어장치의 광강도를 약 200~250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이상으로 증가시켜야 할 필요가 있다.

4. 요약 및 결론

환경조절형 배양시스템(ECS)은 배양조 및 유식물체를 둘러싼 환기량 조절에 의해 유식물체를 둘러싼 엽면 경계층 저항이 작아지고 이에 따라 유식물체의 광합성 및 증산과 같은 물질대사가 종래의 배양방법에 비해 현저하게 촉진시킬 수 있다. 또한 ECS하에서 21일간 배양된 감자 유식물체뿐만 아니라 기타 고구마 및 국화 유식물체의 생장은 관행의 배양방법에 비해 현저히 증가하였으며 기외 순화율은 100%였다.

본 배양시스템의 실용화를 위하여 배양조내 강제환기용 파이프의 경량화, 강화유리와 같은 영구적으로 사용가능한 배양조 재질 및 ECS의 환기량 조절용 펌프 용량을 증가시키는 등의 개선이 요구되었다. 현재는 배양조를 둘러싼 기타 환경요인(광강도 배양체 지지물의 종류 등)에 의한 영향을 검토하고 보정장치의 작동 및 통합제어장치의 단순화를 위한 연구를 수행하고 있다.

본 배양시스템의 실용화를 위하여 배양조내 강제환기용 파이프의 경량화, 강화유리와 같은 영구적으로 사용가능한 배양조 재질 및 ECS의 환기량 조절용 펌프 용량을 증가시키는 등의 개선이 요구되었다. 현재는 배양조를 둘러싼 기타 환경요인(광강도 배양체 지지물의 종류 등)에 의한 영향을 검토하고 보정장치의 작동 및 통합제어장치의 단순화를 위한 연구를 수행하고 있다.

참고 문헌

1. Heo, J. W. and T. Kozai. 1999. Forced ventilation micro-propagation system for enhancing photosynthesis, growth, and development of sweetpotato plantlets. *Environ. Control in Biol.* 37(1):83-92.
2. Heo, J. W., S. B. Wilson, T. Kozai. 2001. A forced ventilation micropropagation system for photoautotrophic production of sweetpotato plug plantlets in a scaled-up culture vessel : 1. Growth and uniformity. *Horttechnology* 11(1):90-94.
3. Kim, S. J., E. J. Hahn, J. W. Heo, K. Y. Paek. 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. *Sci. Horticulturae* 101: 143-151.
4. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
5. Nakayama, M., T. Kozai, K. Watanabe. 1991. Effects of the presence/absence of sugar in the medium and natural/forced ventilation on the net photosynthetic rates of potato explants in vitro. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 8:105-109.
6. Nguyen, Q. T., T. Kozai, J. W. Heo, D. X. Thai. 2001. Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched conditions. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.* 66:217-225.
7. Shim, S. W., J. W. Heo, S. K. Kim, K. Y. Paek. 2001. Effects of number of air exchanges, sucrose and BA on shoot proliferation and growth of 'Campbell Early' grape (*Vitis hybrid*) plantlets. *J. KSHS.* 42(5):540-544.
8. Wilson, S. B., J. W. Heo, C. Kubota, T. Kozai. 2001. A Forced ventilation micropropagation System for photoautotrophic production of sweetpotato plug plantlets in a scaled-up culture vessel: 2. Carbohydrate status. *HortTechnology* 11(1):95-99.