

## 사계성 신품종 딸기 ‘고하’의 기내배양을 위한 배지의 적정 조건

이종남<sup>1\*</sup> · 김혜진<sup>1</sup> · 김기덕<sup>1</sup> · 권영석<sup>1</sup> · 임주성<sup>1</sup> · 용영록<sup>2</sup> · 임학태<sup>3</sup>

<sup>1</sup>국립식량과학원 고령지농업연구센터, <sup>2</sup>강릉원주대학교 식물생명과학과, <sup>3</sup>강원대학교 생명건강공학전공

### Appropriate in Vitro Culture Conditions of Growing Medium for New Ever-bearing Strawberry ‘Goha’

Jong Nam Lee<sup>1\*</sup>, Hye Jin Kim<sup>1</sup>, Ki Deog Kim<sup>1</sup>, Young Seok Kwon<sup>1</sup>,  
Ju Sung Im<sup>1</sup>, Young Rok Yeoung<sup>2</sup>, and Hak Tae Lim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Highland Agricultural Research Center, National Institute of Crop Science, Pyeongchang 232-955, Korea

<sup>2</sup>Department of Plant Science, Kangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

<sup>3</sup>Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract.** This study was carried out to determine suitable in vitro culture conditions of new ever-bearing strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.), ‘Goha’. Four-week old plantlets which were derived from the meristem culture were used in this study. Three different culture media including MS, Gamborg B5 and White medium were used for the plant culture and the medium concentrations were at the 5 levels of 1/3×, 1/2×, 1×, 2× and 3×. Sucrose content ranged at four levels of 1, 3, 5 and 8% (w/v). Crown diameter on the MS medium was thicker (2.1 mm) than in other media. Fresh weight on the MS medium was 482 mg, which was heavier than 88 mg or 260 mg of Gamborg B5 or White medium, respectively. Particularly, 1/2MS medium was found to have higher growth rate than these in other treatments (fresh weight, dry weight and D/F rate). Shoot length in the treatment of 1% sucrose concentration was 3.6 cm which was the longest. Shoot length was in inverse proportion to the increasing concentration of sucrose. Fresh weight was increased up to 3% sucrose concentration, but decreased above 5% sucrose concentration. From the results, we found that the best condition for in vitro culture of new ever-bearing strawberry ‘Goha’ was 1/2MS medium supplemented with 1% sucrose concentration.

**Additional key words:** D/F rate, *Fragaria × ananassa*, medium concentration, meristem, sucrose concentration

## 서 언

우리나라 딸기 재배면적은 2008년 6,394ha이며, 생산액 7,000억원 중 육묘산업이 대략 1,000억원 정도로 경영비 중 육묘가 차지하는 비중이 매우 큰 작물이며, 그 중 여름과 가을철에 고랭지에서 재배되는 사계성 딸기는 2009년 약 15ha에서 2010년 18ha로 재배면적이 꾸준히 증가하는 추세이다. 딸기는 2011년 말 품종보호작물로 지정될 예정이며, 이에 따라 외국품종 재배 시 로열티를 지불해야 한다. 현재 사계성 딸기 재배의 대부분을 차지하고 있는 품종은 과다한 로열티를 지불하고 있는 유럽품종으로 이에 대응하여 2007년에 국내 최초 사계성 딸기 신품종 ‘고하’가 육성되었으며

(Lee 등, 2008), 2009년 농가 보급 시 0.3ha를 시작으로 2010년 약 2ha정도로 재배면적을 늘려가고 있는 추세이다.

사계성 딸기 로열티 문제 해결을 위해 국내 신품종 ‘고하’의 빠른 보급이 시급하지만, 현재 정식에 사용되는 딸기묘는 대부분이 탄저병, 시들병, virus병 등에 이병된 묘를 사용하고 있어 조직배양을 통한 무병묘 생산이 선행되어야 한다. 그러나 딸기 조직배양 시 식물생장조절제의 과다사용으로 변이문제가 심각하게 발생하여 국내의 무병묘 공급체계가 거의 없어졌으며 최근 충남농업기술원 논산딸기시험장에서 일부 충남지역만을 대상으로 일계성 딸기묘를 생산 및 보급하고 있다. 사계성과 일계성 딸기의 무병주 생산 및 보급체계를 비교해 볼 때, 묘 생산시기와 저장방법 등이 매우 다르므로 사계성 딸기 무병주 생산을 위한 기본적인 조직배양 기술개발이 먼저 선행되어야 할 것으로 본다. 딸기 조직배

\*Corresponding author: melonad@korea.kr

※ Received 27 April 2010; Accepted 16 October 2010.

양 연구는 대부분 국외에서 이루어졌으며(Hanhineva 등, 2005; Nehra 등, 1989; Qin 등, 2005; Singh와 Pandey, 2004), 국내에서는 일계성 딸기 위주로 몇 편에 불과하며(Choi 등, 1998; Jeong 등, 1996), 특히 사계성 딸기의 조직배양 연구는 전무한 상태이다.

일반적으로 조직배양 시 기내식물의 생장에 영향을 미치는 요인은 무기염류의 종류와 농도, 탄소원의 농도 등 여러 가지가 있으며, 제한적인 공간과 조절된 환경에서 자라기 때문에 무엇보다도 배지의 구성성분이 기내 식물체의 생육에 큰 영향을 미친다. 배양에 필요한 성분은 배양체의 종류에 따라 각기 다르기 때문에 각각에 맞는 배지를 찾아내야 한다. 현재 비교적 광범위하게 적용되는 배지가 몇 가지 개발되어, 이들 중 알맞은 배지를 선택하고, 기내 생육에 가장 효율적인 농도를 밝혀내는 것이 중요하다. 또한 배지 내의 식물세포 및 조직은 독립영양 활동이 부족하기 때문에 에너지원과, 삼투조절제로의 역할을 하는 외부로부터의 탄소원인 sucrose를 필요로 한다(Gurel와 Gulsen, 1998; Nowak 등, 2004; Razdan, 1993; Stavarek 등, 1980). 이 sucrose는 식물체의 성장 및 세포 분화에 생리적으로 가장 큰 영향을 미치므로(Aloni, 1980; Bofunia와 Przywara, 1990; Gibson, 2000; Leva 등, 1990; Steinitz, 1999), 딸기 기내배양에 알맞은 농도의 구명은 중요하다.

이에 본 실험은 신품종 사계성 딸기 ‘고하’의 무병주 생산을 위한 초기 단계로 조직배양 시 기내생육에 알맞은 배지 종류와 농도, 그리고 sucrose 농도를 구명하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 신품종 ‘고하’의 모주는 고설식 수정재 배법으로 증식되었다. 성장점 배양을 위한 러너팁은 본엽이 1매 전개되었을 때 10cm 정도의 길이로 채취하였으며, 70% 알코올에 소독된 가위를 이용하여 러너를 절단했다. 채취한



**Fig. 1.** Plant material to identify subculture conditions derived from the meristem of new ever-bearing strawberry ‘Goha’. Root appeared from the basal part of plantlet after 4 weeks culture.

러너팁은 마르지 않도록 증류수에 담가두었다.

채취한 러너팁을 흐르는 수돗물에 1시간 수세한 후 클린벤치 안에서 2% sodium hypochlorite solution에 침지하여 10분간 표면살균 후 준비한 멸균수로 3-4회 헹구어주었다. 페트리디쉬에 여과지를 깔아 러너팁 표면의 물기를 제거한 후 광학현미경(EMZ-8TR, MEIJI TECHNO, Japan) 하에서 성장점을 0.2-0.3mm 크기로 적출하여 배지에 치상하였다. 배양실의 온도환경은  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 일장조건은 16(명)/8(암)시간으로 배양하였다. 성장점 배양에 사용된 배지는 MS 배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 3% sucrose와 0.8% agar를 첨가한 것이며, pH는 5.6으로 조절하였다. 직경 1.4 × 길이 13cm인 시험관에 10mL의 배지를 분주하여 사용하였다. 실험에 사용된 모든 기기 및 초차류는 고압멸균기로 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

기내배양조건 연구를 위해 성장점 배양 후 4주간 성장한 기내 유식물체(Fig. 1)는 어린 잎 1매를 남기고 모든 잎과 뿌리를 제거한 후 사용하였다.

배지 종류별로는 MS배지, Gamborg B5배지(Gamborg 등, 1968), White배지(White, 1963)를 이용하여 각 1배 농도로 처리하였으며(Table 1), 농도별 실험은 MS배지를 1/3배, 1/2배, 1배, 2배, 3배 등 5처리를 두었으며, MS 배지 농도별 EC는 Table 2와 같다. 위 두 시험은 3% sucrose를 첨가하여 완전히 녹인 후 pH를 5.6으로 조정하고 0.8% plant agar를 첨가하여 고체배지를 만들어 사용하였다. Sucrose 농도 실험은 기본 MS배지에 1, 3, 5 및 8%(w/v)로 처리하였다. 각각의 배지는 250mL용 배양병에 50mL씩 분주하여 121°C에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 모든 실험은 배양병당 2개체의 유식물체를 치상하여 6주간 배양하였으며, 각 처리당 무작위로 10개체를 추출하여 생육량을 조사하였다.

**Table 1.** Comparison of the nitride contents in MS, Gamborg B5, and White media.

Composition	Media (mg·L <sup>-1</sup> )		
	MS	Gamborg B5	White
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	-	-
KNO <sub>3</sub>	1,900	2,528	80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	300
Total	3,550	2,662	380

**Table 2.** Variation of electrical conductivity (EC) according to medium strength in MS medium.

MS medium strength	1/3×	1/2×	1×	2×	3×
EC (dS·m <sup>-1</sup> )	2.23	3.19	6.25	10.73	15.36

## 결과 및 고찰

계대배양 시 배지 종류에 따른 기내식물의 생육특성은 Table 3, Fig. 2와 같다. 초장은 MS와 Gamborg B5배지에서 4.0cm로 차이가 없었으나 White배지에서 3.7cm로 가장 짧았다. 배지 내에 함유된 질소질이 세포성장과 유기물 합성에 밀접한 관계를 갖고 있으며, 질소의 형태 및 농도에 의하여 기내 식물체의 생육이 크게 좌우되는데(Choi, 1997), 그 중 초장은 질소 함량이 많을수록 길어진다는 보고(Choi, 1997; Leifert 등, 1992)는 본 실험의 결과와 일치하였다. 배지 내 질소형태는 질산태 질소와 암모니아태 질소이며, 식물이 암모니아태 질소를 흡수할 경우 수소이온( $H^+$ )을 방출하여 배지 내 pH는 산성화되고(Sathyanarayana 와 Blake, 1994), 산성화된 배지 내에서는 환원형인 질산태 질소의 흡수가 빨라져 배지의 pH가 점진적으로 교정되기 때문에(Choi, 1997), 식물체 생육에 유리한 pH를 유지하기 위해 배지 내에 질산태 질소와 암모니아태 질소를 일정한 비율로 첨가하는 것으로 판단된다. 이러한 과정이 식물생장(Leifert 등, 1992)과 발근(Williams 등, 1985)에 영향을 미치므로 배지 내에 질산태 질소와 암모니아태 질소가 적정 비율로 첨가되는 것이 중요할 것으로 생각된다.

관부직경은 MS배지가 2.1mm로 Gamborg B5배지의 1.7mm와 White배지의 1.8mm에 비해 0.3-0.4mm 더 굵었

다. 딸기는 관부직경이 클수록 순화 시 묘가 튼튼하고 정식 후 액아와 뿌리가 굵어지며 그에 따라 러너발생도 증가하여 결과적으로 대량의 자묘를 생산할 수 있을 것으로 생각되었다.

엽수는 MS배지가 7.8개, Gamborg B5배지가 7.3개로 비슷하였고 White배지는 5.6개로 가장 적었다. 엽면적은 MS배지가  $10.3cm^2$ 으로 가장 넓었으며, Gamborg B5배지와 White배지는  $5.5cm^2$ 와  $4.2cm^2$ 로 비슷하였다. 엽면적이 넓은 MS배지처리가 광합성률이 높을 것으로 생각되고 이에 따라 초기 생육이 좋을 것으로 판단되었다.

뿌리수도 MS배지에서 12.3개로 가장 많았으며, White배지는 7.4개로 가장 적었다. 반면 뿌리길이는 MS배지가 4.3cm로 White배지의 6.6cm에 비하여 짧았는데 비록 MS배지가 뿌리길이는 짧지만 뿌리수가 많으므로 순화 시 뿌리의 활착이 가장 빠를 것으로 판단되었다. 발근은 질소원과 농도에 상당히 큰 영향을 받는데 *Eucalyptus marginata*의 경우 각 질소 형태별로 단독처리한 것보다 질산태 질소와 암모니아태 질소의 비율을 2:1로 처리하였을 때 가장 효과적으로 발근이 되었고(Woodward 등, 2006), 딸기 토양재배 시 근권에 질소질 비료를 시비하였을 때 질산태 질소와 암모니아태 질소를 혼합 시비한 것이 뿌리 발생이 가장 좋았다는 보고(Sas 등, 2003)로 미루어 보아 본 실험에서 사용된 MS배지가 질산태 질소와 암모니아태 질소의 비율이 2:1로 함유되어 있기 때문에 지하부 생육량이 많았던 것으로 판단되었다.

**Table 3.** Growth characteristics of in vitro plants according to media of new ever-bearing strawberry 'Goha'.

Media	Shoot length (cm)	Diameter of crown (mm)	Number of leaves (ea)	Leaf area ( $cm^2$ )	Number of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)
MS	$4.0 \pm 0.2^2$	$2.1 \pm 0.2$	$7.8 \pm 0.4$	$10.3 \pm 2.6$	$12.3 \pm 1.0$	$4.3 \pm 0.2$	$482 \pm 70$	$92 \pm 13$	19.1
Gamborg B5	$4.0 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.2$	$7.3 \pm 0.2$	$5.5 \pm 0.4$	$11.8 \pm 0.7$	$4.6 \pm 0.2$	$394 \pm 46$	$73 \pm 9$	18.5
White	$3.7 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.1$	$5.6 \pm 0.3$	$4.2 \pm 0.8$	$7.4 \pm 0.7$	$6.6 \pm 0.3$	$222 \pm 16$	$51 \pm 4$	23.0

<sup>2</sup>Values presented are mean  $\pm$  standard error (n = 5).



**Fig. 2.** Comparison of in vitro growth according to media of new ever-bearing strawberry 'Goha'.

생체중과 건물중도 MS배지에서 482mg와 92mg로 White 배지의 222mg과 51mg에 비해 250mg과 41mg 더 무거웠다. 또한 생체중에 대한 건물중의 비율(D/F율)은 MS배지가 19.1%, White배지가 23.0%로 오히려 높았는데, D/F율이 높으면 조직이 견고하여, 외부 환경에 대한 적응성이 높아진다(Juan 등, 1995). 본 실험에서 White배지는 다른 배지에 비하여 D/F율은 높으나, 초장 등 성장량이 낮아 적합하지 않을 것으로 판단되며, MS배지가 D/F율도 비교적 높고 엽수, 엽면적 등의 성장량에서 현저한 차이를 보이므로 딸기의 기내배양 시 가장 적합하다고 판단되었다.

MS배지 농도별 실험결과(Table 4, Fig. 3) 초장은 기준농도 1배에서 4.7cm로, 1/2배의 4.7cm, 1/3배의 4.6cm와 큰 차이를 보이지 않았으나, 2배는 2.9cm, 3배는 1.5cm에로 기준농도에 비해 약 1/3 수준으로 현저히 짧아지는 것을 볼 수 있었다. 엽수는 1/2배가 10.5개, 2배와 3배는 각각 6.3개로 기준농도 1배의 8.7개보다 2.5개씩 더 적었으며 엽면적도 엽수와 같은 결과를 보였다. MS배지 농도가 높아짐에 따라 뿌리수가 적어지고, 뿌리길이도 짧아지는 경향이었으며, 가장 높은 농도인 3배는 뿌리수가 2.9개, 뿌리길이가 0.3cm로 지하부 성장량이 가장 적었다. 한편 1/2배는 생체중이 827mg, 건물중이 161mg, D/F율이 19.5%로 다른 농도보다 가장 높았다. 3배는 기준 농도 1배에 비해 생체중은 약 1/2, 건물중은 약 1/4 정도 낮은 수준이었다.

딸기는 염류장해에 가장 약한 작물로서 기내배양액의 비

료농도에 큰 영향을 받는다. 사계성 딸기 고설 수경재배 시 생육초기의 배양액 농도는  $0.6\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$  후기에는  $1.2\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ 가 적당한 것으로 보고되었는데(Lee, 2006), MS 1배 배지의 EC가 고설 재배 시 적정 수준인  $1.2\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ 에 비하여 약 5배 이상 높고 2배는 약 8배, 3배는 약 12배 이상으로 농도가 급격히 높아지므로 배지의 농도가 높을수록 EC가 상승하여 식물체의 생장이 현저히 감소하는 경향을 보였다. 특히 지하부 생육이 억제됨으로서 양분흡수가 원활히 이뤄지지 못해 지상부의 성장도 저해 받았을 것으로 판단되었다.

Sucrose 농도별 처리 결과, 모든 처리구에서 배양 1주 후부터 새로운 잎과 뿌리가 발생하기 시작하였으나 sucrose 8% 처리는 배양 2주째부터 새로운 잎이 나오기 시작하였고, 신초의 생육 속도도 저조하였다(Fig. 4).

초장은 sucrose농도가 높아짐에 따라 점차 작아지는 경향을 보였으나 관부직경과 엽수는 농도간에 큰 차이를 보이지 않았다. *Philodendron erubescens*와 *Cordyline terminalis*에서는  $40\text{-}50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 고농도 sucrose가 초장 신장에 적당하지만(Maene와 Debergh, 1985), *Prunus domestica*(Nowak 등, 2004), *Paederia foetida*(Amin 등, 2003), *Elaeocarpus robustus*(Rohman 등, 2004) 및 알팔파(Stavarek 등, 1980)는 고농도의 sucrose가 오히려 초장의 신장을 저해한다고 보고되었는데 본 실험의 경우 고농도의 sucrose에서 초장 신장이 저해되는 결과와 일치하였다.

엽면적은 sucrose 1%, 3%와 5% 농도에서 약  $6.7\text{cm}^2$ 로

**Table 4.** Growth characteristics of in vitro plants according to MS medium strength of new ever-bearing strawberry 'Goha'.

MS medium strength	Shoot length (cm)	Diameter of crown (mm)	Number of leaves (ea)	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Number of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)
1/3×	4.6 ± 0.3 <sup>2</sup>	2.2 ± 0.1	8.7 ± 0.4	6.0 ± 0.5	12.5 ± 0.7	6.5 ± 0.3	583 ± 53	100 ± 9	17.2
1/2×	4.7 ± 0.2	2.5 ± 0.2	10.5 ± 0.5	7.1 ± 1.0	11.5 ± 0.5	6.5 ± 0.2	827 ± 66	161 ± 13	19.5
1×	4.7 ± 0.3	2.6 ± 0.2	8.7 ± 0.5	6.2 ± 0.8	8.2 ± 0.7	6.1 ± 0.3	593 ± 64	102 ± 11	17.2
2×	2.9 ± 0.2	2.4 ± 0.2	6.3 ± 0.5	3.0 ± 0.2	7.9 ± 0.7	3.2 ± 0.3	533 ± 77	90 ± 13	16.9
3×	1.5 ± 0.2	2.2 ± 0.1	6.3 ± 0.5	2.2 ± 0.2	2.9 ± 0.7	0.3 ± 0.1	292 ± 29	28 ± 3	9.6

<sup>2</sup>Values presented are mean ± standard error (n = 5).



**Fig. 3.** Comparison of in vitro growth according to MS medium strength of new ever-bearing strawberry 'Goha'.

처리간에 큰 차이를 보이지 않았으나, 8% 농도에서는 현저히 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 뿌리수는 sucrose 농도에 관계없이 모두 8개 이상 발생하였으며, 뿌리길이는 sucrose 5% 농도에서 6.2cm로 가장 길었다. 그러나 다른 처리에서도 약 4cm이상으로 자라 식물생장에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다. 본 실험에서도 생체중은 sucrose 3%농도까지 증가하였고 5%이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보여, 딸기 기내배양 시 최대의 생체량을 얻을 수 있는 적정 농도는 3%이하임을 알 수 있었고, 건물중과 D/F율의 분석 결과 sucrose 1% 농도가 적당할 것으로 판단되었다(Table 5, Fig. 4). Lipavska와 Vreugdenhil(1996)은 식물체의 최적 sugar 흡수 농도는 감자가 sucrose 6%, 밀이 sucrose 4%, 유채가 sucrose 5%로 sucrose의 농도를 높여주면 생체중, 건물중 등의 생체량이 증가한다고 보고하였다.

본 실험의 결과, 배지의 sucrose의 농도가 높으면 배지 내 삼투압은 식물체에 비하여 상대적으로 높아지고, 또한 수분 포텐셜은 낮아져 배지의 수분 및 양분이 식물체내로의 흡수가 저해되고 그에 따라 성장도 저해된다는 보고(Lipavska와 Vreugdenhil, 1996)와 일치하였다.

식물생장에 적절한 sucrose 농도가 식물종과 유전자형에 따라 각각 다르다(Brown 등, 1979)는 것으로 미루어 보아 일계성과 사계성 딸기는 각각의 유전자형과 생태형이 다르기 때문에 앞으로 일계성과 사계성의 주요 품종을 추가 연구하고, 본 실험결과를 적용한다면 딸기에 조직배양에 있어

서 더욱 광범위하게 적용시킬 수 있을 것으로 판단된다.

## 초 록

본 실험은 신품종 사계성 딸기 ‘고하’의 무병주 생산을 위해 기내배양 시 적정조건을 구명하고자 실시하였다. 식물 재료로는 성장점 배양 후 4주된 유식물체를 이용하였다. 배지 종류는 MS배지, Gamborg B5배지 및 White배지 등 3종류를 사용하였다. MS배지 농도는 1/3배, 1/2배, 1배, 2배, 3배 농도 등 5처리, sucrose 농도는 1, 3, 5 및 8% (w/v) 등 4처리를 두었다. 배지 종류별 실험 결과, MS배지의 관부직경이 2.1mm로 가장 굵었다. 생체중은 MS배지가 482mg으로 Gamborg B5배지의 394mg과 White배지의 222mg에 비해 88g, 260g 각각 더 무거웠다. MS배지 1/2배 처리가 생체중, 건물중, D/F율 등의 생육량이 다른 농도에 비해 높았다. 초장은 sucrose 1%에서 3.6cm로 가장 길었으며, 농도가 높아질수록 점점 짧아지는 경향을 보였다. 생체중은 sucrose 3% 농도까지 증가하다가 5%이상에서는 감소하는 경향을 보였다. 따라서 사계성 딸기 ‘고하’의 기내배양 시 1/2 MS 배지에 sucrose 1%를 첨가하는 것이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

**추가 주요어 :** 생체중에 대한 건물중의 비율, 딸기, 배지 농도, 성장점, 당 농도

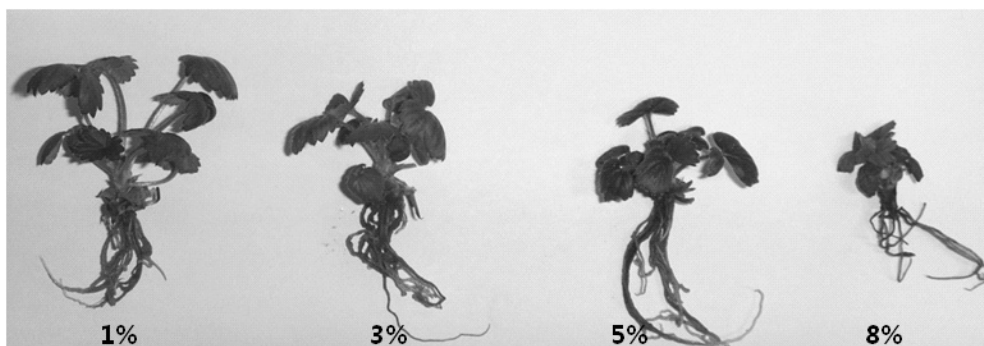


Fig. 4. Comparison of in vitro growth according to sucrose concentrations of new ever-bearing strawberry ‘Goha’.

Table 5. Growth characteristics of in vitro plants according to sucrose concentration of new ever-bearing strawberry ‘Goha’.

Sucrose (%)	Shoot length (cm)	Diameter of crown (mm)	Number of leaves (ea)	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Number of roots (ea)	Root length (cm)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	D/F rate (%)
1	3.6 ± 0.2 <sup>z</sup>	3.0 ± 0.2	8.4 ± 0.7	6.7 ± 0.9	8.5 ± 1.0	3.8 ± 0.2	433 ± 63	77 ± 11	17.8
3	3.0 ± 0.1	3.5 ± 0.2	8.1 ± 1.1	6.0 ± 0.5	8.5 ± 0.5	4.6 ± 0.3	517 ± 51	78 ± 8	15.1
5	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.2	7.8 ± 0.3	5.9 ± 0.1	10.3 ± 0.8	6.2 ± 0.3	454 ± 40	80 ± 7	17.6
8	1.8 ± 0.2	3.2 ± 0.2	7.5 ± 1.0	3.3 ± 0.4	11.8 ± 1.6	3.7 ± 0.4	384 ± 73	110 ± 21	28.6

<sup>z</sup>Values presented are mean ± standard error (n = 5).

- Aloni, R. 1980. Role of auxins and sucrose in the differentiation of sieve and trachery elements in plant tissue cultures. *Plant* 150:255-263.
- Amin, M.N., M.M. Rahman, and M.S. Manik. 2003. In vitro clonal propagation of *Paederia foetida* L. A medicinal plant of Bangladesh. *Plant Tiss. Cult.* 13:117-123.
- Bofunia, H. and L. Przywara. 1990. Rola cukrowców roślinnych kulturach in vitro. *Wiad. Bot. [Sugars in plant tissue culture]* 43:25-36.
- Brown, D.C.W., D.W.M. Leung, and T.A. Thorpe. 1979. Osmotic requirements for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.* 46:36-41.
- Choi, J.Y., H.J. Kim, and H.N. In. 1998. Plant regeneration via organogenesis from leaf and stipule segments of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 25:347-351.
- Choi, S.J. 1997. *Plant tissue culture.* Seon Jin Press. p. 48.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.
- Gibson, S.I. 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* 124:1532-1539.
- Gurel, S. and Y. Gulsen. 1998. The effects of different sucrose, agar and pH levels on in vitro shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Tr. J. Bot.* 22:363-373.
- Hanhineva K., H. Kokko, and S. Karenlampi. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In vitro Cel. Devel. Biol. Plant* 41:826-831.
- Jeong, H.B., S.H. Ha, and K.Y. Kang. 1996. In vitro multiplication of strawberry vertical rotary culture of shoot tip. *RDA. J. Agri. Sci.* 38:273-278.
- Juan, C.D.P., E.G. Sutter, and K.A. Shackel. 1995. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiol. Plant.* 95:225-232.
- Lee, J.N. 2006. Physiological and ecological response of ever-bearing strawberry in the highlands cultivation for off-season production. PhD. Diss. Kangneung National University. Gangneung.
- Lee, J.N., E.H. Lee, J.S. Im, C.W. Nam, and B.W. Yae. 2008. Breeding of new ever-bearing strawberry 'Goha' for summer culture. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26:413-416.
- Leifert, C., S. Pryce, P. Lumsden, and P. Waites. 1992. Effects of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. *Plant Tiss. Org. Cult.* 30:171-179.
- Leva, A.R., G. Bartolini, R. Muleo, S. Biricoliti, and A. Benelli. 1990. Micromorphological studies on *Actinidia* cv. Harvard calli as influenced by different sugars. In: XXIII International Horticultural Congress (ed) Abstracts of Contributed Papers, p. 3123. Firenze (Italy).
- Lipavska, H. and D. Vreugdenhil. 1996. Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45:103-107.
- Maene, L. and P. Debergh, 1985. Liquid medium additions to established cultures to improve elongation and rooting in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 5:23-32.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Nehra, N.S, C. Stushnoff, and K.K. Kartha. 1989. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:1014-1018.
- Nowak, B.K., K. Mieczynski, and L. Hudy. 2004. Sugar uptake and utilization during adventitious bud differentiation on in vitro leaf explants of Wegierka Zwykla plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 76:255-260.
- Qin Y, S. Zhang, LX. Zhang, Q. Qin, K. Chen, and C. Xu. 2005. Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films. *Plant Science.* 168:1425-1431.
- Razdan, M.K. 1993. Introduction and techniques. In: An introduction to plant tissue culture. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, Bambey, Calcutta. p. 1-40.
- Rohman, M.M., M.N. Amin, and R. Ahmed, 2004. In vitro rapid regeneration from cotyledon explants of native olive (*Elaeocarpus robustus* Roxb.). *Asian J. Plant Sci.* 3:31-35.
- Sas, L., H. Marschner, V. Römheld, and S. Mercik. 2003. Effect of nitrogen forms on growth and chemical changes in the rhizosphere of strawberry plants. *Acta Physiol. Plant.* 25:241-247.
- Sathyanarayana, B.N. and J. Blake. 1994. The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on in vitro rooting of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 77-78.
- Singh, A.K. and S.N. Pandey. 2004. Genotypic variation among strawberry cultivars for shoot organogenesis. *Acta Hort.* 662: 244-280
- Stavarek, S.J., T.P. Croughan, and D.W. Rains. 1980. Regeneration of plants from long-term cultures of alfalfa cells. *Plant Sci. Lett.* 19:253-261.
- Steinitz, B. 1995. Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *J. Plant Physiol.* 155:1-8.
- White, P.R. 1963. *The cultivation of animal and plant cells.* The Ronald Press, New York. p. 228.
- Williams, R.R., A.M. Taji, and J.A. Bolton. 1985. Specificity and interaction among auxins, light, and pH in rooting of Australian woody species in vitro. *HortScience.* 20:1052-1053.
- Woodward, A.J., I.J. Bennett, and S. Pusswonge. 2006. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on in vitro shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. *Sci. Hort.* 110:208-213.