

액체배지배양에서 당근 체세포배의 발아 억제 현상

소웅영* · 이은경 · 홍성식¹ · 조덕이²

전북대학교 생물과학부 · ¹전남대학교 생물교육학과 · ²우석대학교 생물학과

Germination Arrest of Carrot Somatic Embryos Cultured in Liquid Medium

SOH, Woong-Young* · LEE, Eun Kyung · HONG, Sung Sik¹ · CHO, Duck Lee²

Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

¹Department of Biology Education, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

²Department of Biology, Woosuk University, Chonbuk, 565-701, Korea

ABSTRACT Cotyledonary somatic embryos after being cultured in a liquid MS medium for 1 week were subcultured on a solid MS medium and then the embryos germinated at a rate of 92%, but the rate was lowered by extending the culture period of the embryos on a liquid medium: 26% germination on a liquid medium culture for 4 weeks. Somatic embryos subcultured on the liquid medium showed the normal elongation of hypocotyl and radicle but in part showed secondary embryogenesis on hypocotyl and callus formation on and around the root-hypocotyl juncture. Through observation of scanning electron microscope, apical meristem in plumule showed the loose arrangement of cells, and abnormal leaf primordium formation and growth arrest of the primordium or no leaf primordium formation. Therefore, it is suggested that the germination arrest of carrot somatic embryos on liquid medium culture is due to the structural abnormality of the apical meristem in plumule.

Keyword : *Daucus carota*, definition for germination, medium condition, shoot apical meristem

서 론

식물조직배양에서 캘러스는 일반적으로 고형배지에서 유도되며 체세포배발생에 의한 재생식물체도 많은 경우에 고형배지배양에서 얻을 수 있다. 그러나 고형배지배양은 배양작업과정에 너무나 많은 조작노력이 필요하므로 대량배양에 한계가 있다. 한편 액체 배양법은 이와 같은 애로를 어느 정도 완화시킬 수 있으며 배양체의 증식에 있어서도 능률적인 사례가 많기 때문에 배양기를 이용한 대량배양이 시도되고 있다 (Soh et al. 1996; Etienne et al. 1997).

체세포배는 성숙과 더불어 발아로 이어지면서 일련의 유식

물 생산체계의 출발점이 되고 있으므로 (Lee et al. 1997; Soh et al. 1998) 연구의 대상으로 주목되고 있다. 그런데 액체배지배양에서는 체세포배 또는 유식물의 유리화 현상이 일어나기 쉬운 문제점이 있고 (Saito and Nishimura 1994; Etienne et al. 1997) 또한 체세포배의 발아율도 낮은 어려움이 있으므로 이와 같은 문제점은 체세포배로부터 유식물의 능률적인 생산을 위해서 반드시 해결되어야 할 중요한 과제로 대두된다.

체세포배의 발아는 배축의 신장과 더불어 유근의 생장이 먼저 일어나고 이어서 유경으로부터 경정발생이 일어나게 된다. 체세포배의 발아과정에서 유근의 생장은 일반적으로 장애 없이 쉽게 일어나지만 유경의 경정분열조직의 활성이 빈약하여 발아 장애가 나타나는 경우는 빈번하게 관찰된다 (Nickle and Yeung 1993; Soh 1993). 특히 액체배지 배양에서 이와 같은 장애가 많으므로 경정 분열조직의 활성화와 체세포배 발

*Corresponding author. Tel 063-270-3353

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

아의 관계에 관심을 기울여야 할 것이다 (Soh, 1996; Padmanabhan et al. 1998). 본 연구에서는 액체배양에서 체세포배의 발아억제 현상과 경정분열조직의 구조 변화를 밝힘으로써 체세포배의 발아를 향상시키는 기초확립에 기여할 목적으로 시도되었다.

재료 및 방법

당근 (*Daucus carota* L.) 하과품종의 종자를 70% 에탄올에 1분간 그리고 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적시켜서 표면 살균을 한 다음 멸균수로 3~4회 세척하여 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에서 6일간 무균 발아시킨 유식물을 재료로 사용했다. MS 기본배지에 1 mg/L 2,4-D, 및 3% 설탕을 첨가하여 pH 5.8로 조정하였고 배지의 고형화를 위해 8% 한천을 첨가하였으며 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압멸균하여 준비된 배지에 유식물의 하배축 절편을 (5×5 mm) 배양하였다. 배양물은 25±1°C의 암처에서 3주간 유지되었다.

앞에서와 같이 준비된 고행배지를 25 mL씩 분주한 페트리 접시 (87 mmφ×15 mm)에서 하배축의 절편체로부터 캘러스를 유도한 다음 배발생능 캘러스만을 선별하였고, 0.1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS 액체배지를 20 mL씩 분주한 100 mL 플라스크에 옮겨 진탕기 진탕속도 100 rpm에서 현탁배양하여 증식시켰다. 증식된 현탁배양 세포괴는 100μm 및 200μm의 나이론체로 이중여과시킨 다음 2,4-D를 제거한 MS 배지로 3~4회 세정한 다음 MS 기본배지에서 배발생능 캘러스를 증식시킬 때와 같이 현탁배양하면서 배발생을 관찰하였다. 구형, 심장형, 어뢰형, 및 자엽기배 등의 발생단계별 체세포배는 일정 배양기간에 맞춰서 선별한 다음 다시 해부현미경 밑에서 특정단계의 배만을 선별하여 발아시험에 사용하였다. 액체배지에서 발생된 발생단계별 체세포배의 발아배지는 MS 기본배지를 액체 및 고체형으로 준비하여 사용하였다. 고행발아배지에서 체세포배는 3주간 배양한 후 발아율을 관찰하였다. 한편 발아율에 미치는 액체발아배지에서의 배양기간의 영향을 구명하기 위하여 액체배지상에서 발생된 자엽기 체세포배를 1, 2, 3, 또는 4주간 액체배지에서 연속배양 후 고행 MS 기본배지에 각각 이식하여 발아율을 관찰하였다. 발생단계별로 30개의 체세포배를 재료로 한 관찰을 세 번 반복하여 발아율을 산정했다. 발아 판정 기준은 배축과 뿌리의 신장이 일어나며 아울러서 제1엽이 자라 나온 것으로 정했다 (Merkle et al. 1990; Soh et al. 1996; Lee et al. 1997).

접합자배, 자엽기 체세포배 및 발아중인 체세포배의 경정분열조직은 주사전자현미경 (ISI ABT, SR-50, Tokyo, Japan)으로 관찰 및 촬영되었다. 관찰을 위한 재료는 Craff III액에 고정된 다음 t-butyl alcohol에서 탈수시켰고 t-butyl alcohol freeze-drying method(Inoue and Osatake 1988)로 동결건조

한 후 금박을 입혀서 관찰하였다.

결 과

액체배지에서 발생된 체세포배를 발생단계별로 MS 고행기 본배지에 옮겨서 발아시켜보면 구상 및 심장형배는 전혀 발아되지 않고 탈분화되어 캘러스만이 형성되었다 (Figure 1).

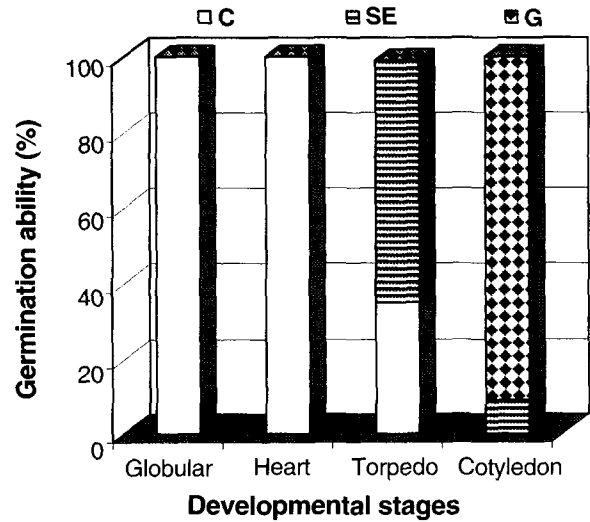


Figure 1. Germination ability of somatic embryos at different developmental stages in carrot cell cultures. Somatic embryos were developed in MS liquid medium then transferred on MS solid medium for germination. Among the embryos, germination occurred in only cotyledonary embryos. In globular and heart-shaped embryos, instead of germination, only callus formation occurred (C) as well as a part of torpedo embryos. Secondary embryos (SE) were formed on most torpedo embryos.

그런데 고행배지에서 발생된 구상 및 심장형배는 캘러스 덩이에서 분리시켜 하나씩 고행발아배지에 옮겨서 배양하면 자엽기배를 분리시켜 배양했을 경우보다 발아율은 떨어지지만 액체배지에서 발아시킬 경우보다 더 높은 발아율을 보였다. 어뢰형배의 경우는 과반수가 발아되지 않고 2차배가 배축과 자엽부위에서 발생되고 약 3분의 1정도는 캘러스형성이 일어나므로 결국 정상적인 발아를 한 체세포배는 관찰할 수 없었다. 자엽기배의 일부에서는 배축에 2차배 형성이 일어났지만 대부분의 배가 휴면 없이 발아하여 유식물로 재생되었다. 이처럼 액체배지에서 체세포배를 자엽시기까지 발생시킨 다음 고행발아배지에서 계대배양하면 정상적인 유식물체의 재생이 잘 일어났다.

체세포배의 발아에 미치는 액체발아배지에서의 배양기간의 영향을 밝히기 위해 액체배지에서 발생된 자엽기배를 액체발아배지에서의 발아기간을 달리하여 (Figure 2) 배양한 다음 고행배지에 옮겨서 발아율을 관찰하였다. 그 결과 1주일간 액

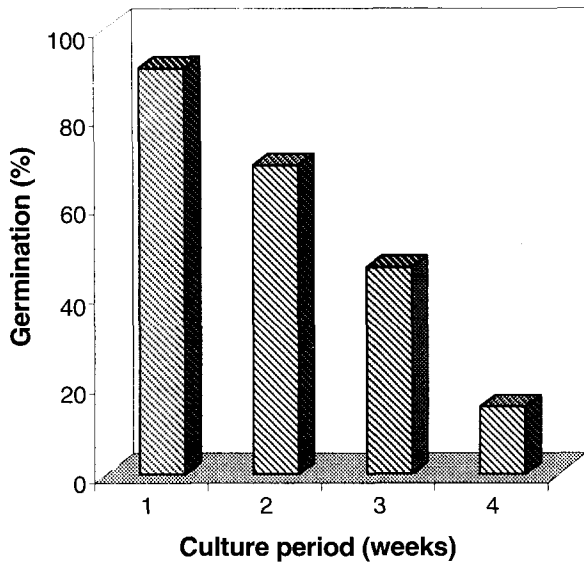


Figure 2. Effects of culture period in liquid medium on germination of somatic embryos. Cotyledonary embryos were cultured in MS liquid medium for 1, 2, 3, and 4 weeks, then they were cultured on MS solid medium for 1 to 4 weeks.

Table 1. Dimension of somatic embryos at cotyledonary and germinating stages

Developmental stage	Dimension of organ (µm)		
	Cotyledon	Hypocotyl	Root
Cotyledonary	405	2000	10
Germinating	13000	26000	35000

Cotyledonary somatic embryos formed in MS basal liquid medium were germinated in the same medium for 4 weeks. The embryos did not show the development of leaf from the apical meristem of plumule.

체세포배지에서 발아를 위한 배양을 하고 고형배지로 옮긴 경우 92%의 발아율을 보였지만 액체배지에서 배양기간이 길어질수록 발아율은 낮아졌고 4주간 액체배지에서 배양을 한 경우에는 26% 밖에 발아되지 않았으며 계속하여 액체배지배양을 하면 전혀 발아하지 않았다.

체세포배를 액체배지에서 발아시키면 경정분열조직으로부터 제1엽이 발생된 뚜렷한 발아는 일어나지 않았다. 그리고 유근의 생장이 일어나면서 배축이 신장되고 자엽 역시 다소 신장되므로 (Table 1) 외관상으로 발아가 일어난 것 같지만 앞에서 제시한 발아 기준에 의한 진정한 의미의 발아는 일어나지 않았다 (Figure 3). 또한 뿌리 기부와 배축 하부에서 캘러스가 형성되고 이로부터 부정근이 발생되거나 배축과 엽 표면에서 2차배가 발생하는 등의 변화가 관찰되었다 (Figure 4). 이와 같은 변화도 액체배지에서 체세포배가 정상적인 유식물로 재생될 수 없는 하나의 원인이 되었다.

자엽기 체세포배의 유경은 경정분열조직이 둥 모양으로 되

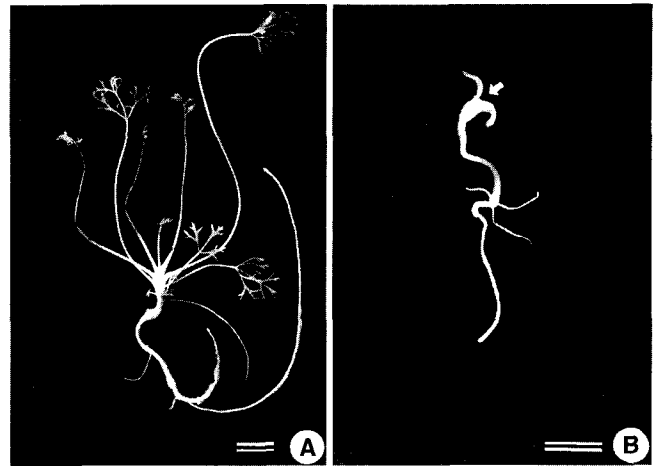


Figure 3 Germination of carrot somatic embryos on solid (A) and liquid (B) medium for 4 weeks. Plantlet regenerated on MS solid medium has normal leaves and roots, but in MS liquid medium somatic embryo without growing leaf (arrow) between two cotyledons shows only the elongation of root, hypocotyl and cotyledons. Bars represent 1 cm (A, B).

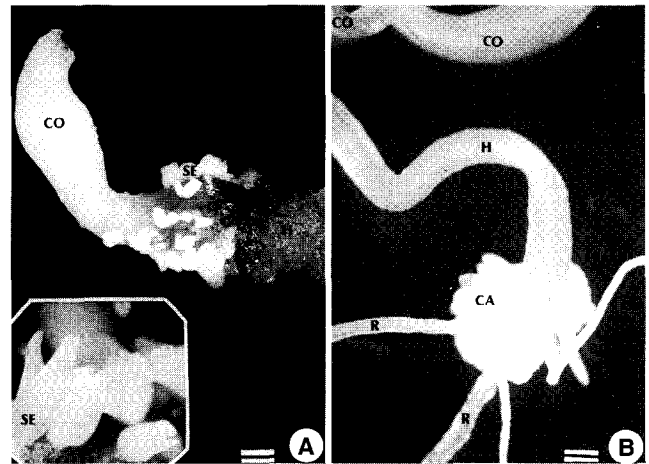


Figure 4. Somatic embryos during germination in liquid medium culture. Some embryos have secondary embryos on their hypocotyl (A) and others have callus on their root base and distal hypocotyl (B). Scale bars represent 1 mm (A) and 1.5 mm (B) respectively. CA, callus; CO, cotyledon; H, hypocotyl; R, root; SE, secondary embryo.

어 있고 배의 발아는 경정분열조직으로부터 엽원기의 발생이 일어나면서 정상적으로 진행되었다 (Figure 5). 그러나 액체배지에서 배양된 자엽기 체세포배로부터는 잎의 발생이 일어나지 않았다. 이와 같이 경정 분열조직의 기능이 부실하게 된 원인을 밝히기 위해 경정분열조직의 구조를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 정상적인 분열조직의 형성이 되지 않았거나 그 활성이 분명치 않았다 (Figure 5).

종자발아중에 접합자배의 경정분열조직은 둥 모양을 이루고 있으며 이 분열조직의 활성에 의해 엽원기가 형성되면서

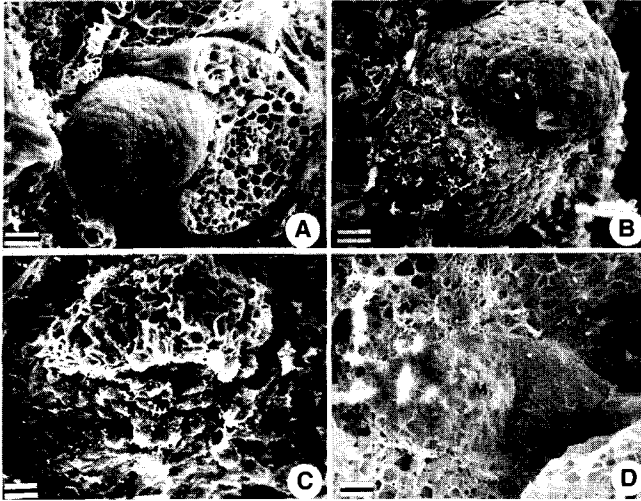


Figure 5. Scanning electron micrographs of plumular apex of zygotic (A) and somatic (B-D) embryos during germination.

In zygotic embryos (A) leaf primordia from apical meristem are developed, one of them was cut (2) and the other is initiated (1). In somatic embryos germinated on MS agar medium leaf primordium is developing from apical meristem which are composed of somewhat large cells compared to those of zygotic embryos (B). In MS liquid medium leaf primordia from apical meristem are formed (C, D) which is flat form and shows irregular arrangement of cells. M, apical meristem; P, leaf primordium; l, second leaf primordium; 2, first leaf primordium. Scale bars represent 20 μ m(A), 22 μ m(B), 25 μ m(C) and 29 μ m(D) respectively.

엽서가 결정된다 (Figure 5A). 액체배지에서 발생된 2자엽 체세포배를 고형발아배지에서 발아시킬 경우 접합자배 발아과정의 경정분열조직 구조와 대체적으로 같았으나 세포의 배열이 치밀하지 않고 규칙성 불분명하다 (Figure 5B). 2자엽 체세포배를 액체발아배지에서 발아시키면 경정분열조직으로부터 제1엽원기가 형성되거나 (Figure 5C, D) 형성되지 않는 경우도 있는데 엽원기가 형성된 경우 그 구조는 울퉁불퉁하고 경정분열조직의 세포배열은 불규칙한 구조를 이루며 제1엽원기는 생장이 중단된 상태에 머물러 있었으므로 발아는 일어나지 않았다. 그러므로 체세포배가 액체배지에서 발아될 수 없는 원인은 경정분열조직의 구조적 결함에 있는 것으로 판단된다.

고 찰

액체배지에서 발생된 구상 및 심장형배는 고형 발아배지에서 발아되지 않을 뿐 아니라 다시 캘러스로 탈분화되었다. 이와 같은 현상은 다른 식물에서도 대체로 같은 경향이거나 아주 일부만이 (8%) 성숙 및 발아되었고 (Nickle and Yeung 1993) 당근 체세포배의 발아는 배가 성숙한 후에 일어났다. 어뢰형배를 발아배지에 옮겨 배양하면 캘러스화되는 비율은 3분의 1 정도이고 대부분이 2차배 형성을 보였다 (Figure 1). 이와는 달리 고구마의 어뢰형 체세포배는 발아가 되는 것으

로 보고된 바 있으므로 (Padmanabhan et al. 1998) 식물에 따라서 체세포배의 발생 단계별 발아능력이 서로 같지 않다는 것을 알 수 있다. 자엽기의 체세포배는 발아배지에서 대부분이 발아가 잘 되고 (92%) 아주 일부만이 2차배의 형성을 보였다 (Figure 1). 고형배지에서 발생된 당근의 자엽기 체세포배는 2차배의 형성 없이 99%가 발아되었으므로 (Lee et al. 1997) 액체배지에서 발생된 배는 고형배지에서 보다 건실성이 지조한 것으로 판단된다. 그리고 통기배양에 의한 저습도 환경에서는 체세포배의 형성 및 발아율이 증진되었음을 검토해 볼 때 (Lee et al. 1997; Liu et al. 1994; Soh et al. 1998) 체세포배의 발아에는 과습환경이 장애요인이 된다는 것을 알 수 있다. 다른 하나의 원인은 체세포배가 액체배지에 잠겨 있는 시간이 길면 길수록 발아는 억제되었으므로 액체배지의 용존 산소부족 때문에 발아가 억제되었을 것으로 보인다 (Figure 2; Nomura and Komamine 1985).

자엽기의 체세포배가 휴면을 거쳐서 발아하는 사례는 드물고 (Choi et al. 1998; Choi et al. 1999) 일반적으로 휴면을 하지 않고 발아하는 특징이 있으며 당근의 경우에도 자엽기 체세포배는 휴면 없이 발아하여 유식물로 재생되었다 (Soh et al. 1996; Soh et al. 1998). 체세포배의 발아는 배축의 신장 및 유근의 생장으로부터 시작되며 이와 같은 생장과정을 발아된 것으로 판정하는 경우가 적지 않다. 그러나 본 연구에서는 유근의 생장과 더불어 유경으로부터 제1엽이 발생된 경우만을 발아한 것으로 판정했으며 이와 같은 기준을 적용하면 자엽기 체세포배를 액체발아배지에서 4주 이상 발아시켜도 발아가 되지 않는 것을 확인했다 (Figure 3B). 유근이 생장한 상태를 발아로 인정하면 figure 3B는 발아한 것으로 판정되겠지만 4주 이상 액체발아배지에서 배양해도 경엽부의 형성은 물론 발생중인 제1엽의 생장이 일어나지 않았으므로 유식물의 재생은 될 수 없었다. 컵 모양 자엽을 가진 체세포배는 전혀 발아능력이 없지만 발아배지에서 유근의 생장만은 정상적으로 일어나므로 유근생장 중심의 발아 기준을 적용하면 발아한 것으로 인정해야 될 것이다 (Soh et al. 1996). 일반적으로 당근을 비롯한 많은 식물의 경우 체세포배로부터 뿌리 발생은 쉽게 일어나지만 경엽부의 발생은 쉽지 않은 경향이 있다 (Cailloux et al. 1996).

본 연구의 주사전자현미경 관찰에서 경정분열조직의 불규칙적인 세포배열 등 비정상구조와 이로부터 발생된 부실한 엽원기의 생장정지현상 (Figure 5) 또는 엽원기의 발생이 일어나지 않는 현상이 확인되었으며 이와 같은 결과는 체세포배가 발아하지 못한 주요 원인으로 판단된다. 고형배지에서 발아시킨 당근 및 고구마의 체세포배 중에서 발아되지 않는 체세포배가 많았으며 이들 체세포배의 경정분열조직을 중단면으로 관찰한 결과 구조적 결함을 가지고 있었다는 것이 밝혀졌다 (Nickle and Yeung, 1993; Padmanabhan et al. 1998). 그러므로 체세포배의 발아율이 접합자배의 발아율에 미치지 못하는 주요 원인은 경엽부의 발생기원이 되는 경정

분열조직의 구조적 결합과 빈약한 활성에 있는 것으로 사료된다.

발생중에 proline이 축적된 셀러리 체세포배는 건조한 배양환경에서도 정상적인 식물체로 재생이 되었다 (Saranga et al. 1992). 건설한 체세포배의 발생과정에서는 전분 또는 단백질의 축적이 일어나며 (Tulecke and Granahan 1985) 이들 저장물질은 배의 발아과정에서 소비될 준비물이다. 또한 자주개자리 체세포배의 전분축적은 발아과정에서 경엽부의 형성에 관련되어 있었다 (Cailloux et al. 1996). 경정부의 발생과정에서 저장 물질의 축적현상은 본 연구의 범위 밖에 있으므로 당근 체세포배의 발아에 대한 심도 있는 이해를 위해 경정분열조직의 형태학적인 관찰에 이어서 저장물질의 변화와 경정분열조직의 분화에 관한 연구도 수행되어야 할 것이다.

적 요

발아를 위한 MS 액체배지에서 체세포배를 1주일간 배양하다가 고형배지로 옮겨 배양하면 92%가 발아하지만 액체배지 배양기간이 길어지면 발아율이 낮아져서 4주간 배양 후 고체배지로 옮기면 26% 밖에 발아하지 않았다. 액체배지에서 발아처리된 체세포배는 배측과 유근의 생장은 충실하게 일어나는데 일부에서는 배측에 2차배가 발생되거나 배측과 유근 기부에서 캘러스가 형성된 경우도 있었다. 주사전자현미경에 의한 관찰 결과 경정분열조직을 이루고 있는 세포는 엉성하게 배열되어 있고 제1엽원기가 발생된 경우 그 구조가 충실하지 못하여 생장이 중단되어 있으며 엽원기의 발생이 않된 경우도 있었다. 그러므로 액체배지에서 체세포배의 발아가 억제된 원인은 경정분열조직의 구조적 결합으로 경엽부 형성이 일어나지 못하기 때문으로 사료된다.

사사 : 본 연구는 교육부 기초과학연구소 지원 연구비 (BSRI-1998-015-D00205)의 지원에 의해 수행되었으며 주사전자현미경에 의한 관찰을 도와준 전북대학교 생명과학부 김경식 교수에게 사의를 표하는 바이다.

인용문헌

- Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P, Teisson C (1997) Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **50**: 33-37.
- Cailloux F, Julien-Guerrier J, Linossier L, Coudret A (1996) Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Sci.* **120**: 185-196.
- Choi YE, Yang DC, Park JC, Soh W-Y, Choi KT (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos arising directly from cotyledons of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* **17**:544-511.
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT (1999) High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant Cell Rep.* **18**: 493-499.
- Etienne H, Lartaud M, Michaux-Ferriere N, Carron MP, Berthouly M, Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. ARG.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **33**: 81-87.
- Gawel N, Robacker CD (1990) Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **23**: 201-204.
- Hong SS, Soh W-Y (1999) Structural characteristics of shoot apex developed from somatic embryos of *Daucus carota* L. *Korean J. Plant Res.* **12**: 133-138.
- Inoue T, Osatake H (1988) A new drying method of biological specimens for scanning EM : The t-butyl alcohol freeze-drying method. *Arch. Histol. Cytol.* **51**: 53-59.
- Lee EK, Cho DY, Soh W-Y (1997) Effect of humidity on somatic embryogenesis in cotyledon explant culture of carrot. *J. Plant Biol.* **40**: 89-94.
- Liu W, Hildebrand DF, Moore PJ, Collins GB (1994) Expression of desiccation-induced and lipoxygenase genes during the transition from the maturation to the germination phases in soybean somatic embryos. *Planta* **194**: 69-76.
- Merkle SA, Weicko AT, Sotak RJ, Sommer HE (1990) Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **26**: 1086-1093.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-97.
- Nickle TC, Yeung EC (1993) Failure to establish a function shoot meristem may be cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). *Am. J. Bot.* **80**: 1284-1291.
- Nomura K, Komamine A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* **79** : 988-991.
- Padmanabhan K, Cantliffe DJ, Harrell RC (1998) A comparison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L).] using computer vision and histological analyses. *Plant Cell Rep.* **17**: 685-692.
- Saito T, Nishimura S (1994) Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Sci.* **102**: 205-211.
- Saranga Y, Rhodes D, Janick J (1992) Changes in amino acid composition associated with tolerance to partial desiccation of celery somatic embryos. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **117**: 337-341.
- Soh W-Y (1993) Developmental and structural diversity of regenerated plants in cell and tissue cultures. *In* ; Molecular Approach to Plant Cell Differentiation. Proc. 7th Symp. Plant Biotech., Bot. Soc. Korea, pp. 1-35.

Soh W-Y(1996) Germinability and cotyledon structure of somatic embryos in some dicotyledonous plants. Proc. 2nd Asia Pacific Conf. Plant Cell Tis. Cult. Beijing, pp. 51-59.

Soh W-Y, Cho DY, Lee EK (1996) Multicotyledonary structure of somatic embryo formed from cell cultures of *Daucus carota* L. J. Plant Biol. **39**: 71-7.

Soh W-Y, Lee EK, Cho DY (1998) Enhanced development and germination of carrot somatic embryos on modified surface of medium. Korean J. Plant Tis. Cult. **25**: 231-36.

Tulecke W, Mc Granahan GH (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut. *Juglans regia* L. Plant Sci. 40 : 57-63.

(접수일자 2000년 5월 22일)