

## 당근 (*Daucus carota* L.)의 현탁배양을 통한 체세포배 발생에 미치는 카드뮴의 영향

조덕이\* · 신은경<sup>1</sup> · 소웅영<sup>1</sup>

우석대학교 이공대학 생물학과, <sup>1</sup>전북대학교 자연과학대학 생물과학부

### Effect of Cadmium on Somatic Embryogenesis from Cell Culture of *Daucus carota* L.

CHO, Duck Yee\* · SHIN, Eun Kyong<sup>1</sup> · SOH, Woong Young<sup>1</sup>

Department of Biology, WooSuk University, Chonbuk, 565-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

**ABSTRACT** This study was carried out to elucidate the effect of cadmium on somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured cells of *Daucus carota* L. Embryogenic calli were induced from cotyledon explants of carrot seedlings cultured on MS solid medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. Embryogenic cells proliferated on medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D were also cultured in liquid MS medium containing various concentrations (50, 100, 200, 500, 1000  $\mu$ M) of cadmium for one week and then transferred to MS basal medium. Somatic embryogenesis occurred in suspension culture treated with 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M cadmium or untreated with cadmium. When cadmium was treated in suspension culture, production of two and four cotyledonary somatic embryos was reduced, but that of three cotyledonary somatic embryo was increased. Two cotyledonary embryos showed higher regeneration frequency than abnormal somatic embryo with one, three and four cotyledon. Regardless of cotyledonary variation, germination frequency of somatic embryos treated with cadmium was decreased in compared with that of embryos in basal medium.

**Key words** : cadmium, cotyledonary variation, germination, somatic embryogenesis

## 서 론

체세포배 형성에 관한 Steward 등의 (1958) 연구 이래 많은 식물에서 체세포배 발생이 확인되었고 당근 배양세포에서 체세포배가 접합자배와 형태적으로 동일하다는 관점에서 생화학적, 세포학적 및 분자생물학적 연구가 진행되어 왔다. 배양과정 중에 나타나는 체세포배의 형태적인 변이는 배지의 탄수화물, 삼투압, 탄소원, 생장조절물질, 배양재료 및 배양환경

의 변화에 따라 일어나며 (Ammirato and Steward 1971; Ammirato 1985; Gray et al. 1993), 주로 자엽수와 형태의 변이로서 하나 또는 셋이상의 자엽이 형성되고 (Ammirato 1987; Kageyama et al. 1990; Smith and Krikorian 1990; Soh et al. 1996), 땅두릅 (Lee and Soh 1993a, b), 멜론 (Choi et al. 1994a), 대두 (Choi et al. 1994b), 시호 (Cho and Soh 1995), 당근 (Soh et al. 1996), 당귀 (Cho et al. 1998), 천궁 (Cho et al. 2000)에서 나팔모양의 이상 자엽배 및 1개, 3개, 4개, 5개의 자엽을 갖는 체세포배 등이 2,4-D 첨가배지에서 일어났다. 이와같이 배양과정 중에 형성되는 이상배의 종류는 다양하며 2개의 자엽을 갖는 정상적인 배의 비율은 식물의 종에 따라서 다르게 나타났다 (Cho et al. 1998, 2000).

\*Corresponding author. Tel 063-290-1513

E-mail dycho555@core.woosuk.ac.kr

비정상 형태의 체세포배는 정상적인 체세포배에 비하여 식물체 재생률이 낮으며 (Buchheim et al. 1989; Isabelle et al. 1993), 당근의 다자엽 체세포배는 식물체로 재생되지 않는다는 보고 (Smith and Krikorian 1990)와, 재생률은 낮으나 재생된다는 상반된 보고가 있다 (Cho and Soh 1995). 또한 땅두릅의 경우에서 4개의 다자엽 체세포배의 경우에 2개의 정상자엽을 갖는 체세포배의 재생률보다 높아서 자엽수에 비례하여 재생률이 높다는 상반된 연구도 있다 (Lee and Soh 1993a, b).

현대 산업화로 인한 환경오염은 생태계의 균형을 파괴하므로 오염원이 생태계에 미치는 영향에 관한 다각적인 연구가 이뤄져야 할 것이다 (Jackson et al. 1990). 오염원 중 카드뮴, 수은, 납, 및 아연 등과 같은 중금속에 의한 환경오염은 자연 생태계의 파괴와 인간에게 발암과 기형발생, 돌연변이 등을 유발한다 (Vallee and Ulmer 1972; Sung 1976). 중금속은 적정농도 이상에서는 다양한 대사활동을 저해하여 식물 성장과 발생을 감소시킨다 (Setia and Bala 1994). 카드뮴은 자연의 토양속에 약 0.135 ppm을 함유하고 있으나 고농도의 카드뮴은 식물체의 빠른 흡수를 유도 (Choudhary et al. 1994)하여 식물 조직내에 오랫동안 축적되어 식물의 발생분화를 지연시킨다 (Lee et al. 1990; Somashekaraiah et al. 1992). 특히 뿌리나 배축에 축적되어 광합성, 호흡과정 및 증산작용 등을 저해시켜 (Reese and Roberts 1984) 결과적으로 정상 식물체로 성장되지 못한다 (Setia and Bala 1994).

세포배양계에서 카드뮴 내성에 관한 연구가 여러가지 식물 종에서 연구되었고 (Bennetzen and Adams 1984; Huang et al. 1987; Jackson et al. 1987), 강남콩 자엽절편 배양에서 저농도의 카드뮴이 부정근 형성을 촉진하며 (Soh et al. 1980), 당근의 정단분열조직을 배양할 경우 고농도에서 체세포배 발생이 촉진된다 (Kamada et al. 1989). 이와같이 식물 조직배양에 있어서 카드뮴 스트레스에 대한 연구가 이루어졌으나 카드뮴에 의한 체세포배의 형태변이에 관한 연구사례는 매우 희박하다. 따라서 본 실험에서는 당근의 현탁배양을 이용하여 2,4-D와 카드뮴을 조합 또는 단독 처리하여 배양하였을 때 카드뮴 스트레스에 대한 체세포배의 발생과 자엽수 변이와 식물체 재생에 미치는 영향을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 식물

홍심 5촌 당근 (*Daucus carota* L. cv. Hongshim) 종자를 70% 에탄올에 1분간 침적시킨 후 tween 40이 첨가된 1% 차아염소산나트륨 용액에 15분간 표면살균하여 멸균수로 3회 수세하였다. 표면살균된 종자를 1/2 MS기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 40 ml씩 분주한 100 ml 삼각 플라스크에

파종하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $46 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{S}^{-1}$  16시간 광주기 조건하에서 7일간 무균 발아시켰다. 배지는 0.8% 한천을 첨가하기 전에 pH 5.8로 조정하여  $121^\circ\text{C}$ , 1.2기압에서 15분간 고압 멸균하였다.

### 체세포배 발생 및 자엽의 변이

배발생능 켈러스를 유도하기 위하여 당근 유식물체의 자엽 절편 (3 mm×3 mm)을 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 고형배지에서 배양하였다. 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 고형배지에서 배양 3주 후 배발생능 켈러스를 선별하여 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 액체배지에서 현탁배양하였다. 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml씩 분주한 배지에 배형성능 켈러스를 240  $\mu\text{m}$  스테인레스망으로 걸러 15일간 배양한 후 120  $\mu\text{m}$  스테인레스망으로 걸러 여러가지 농도의 카드뮴 (50, 100, 200, 500, 1000  $\mu\text{M}$ )이 첨가된 MS 액체배지에서 1, 2, 3, 및 4주간 배양한 다음 체세포배의 발생을 위하여 MS 기본배지에 옮겨 4주간 배양하였다. 배양 4주 후 형성된 체세포배의 자엽수 변이를 관찰하였다. 카드뮴 처리를 위하여  $\text{CdCl}_2$ 를 3차 증류수로 용해하여 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter (Millipore Co., Ltd.)로 여과시켜서 polyethylene tube에 저장 보관하며 사용하였다 (Reese and Roberts 1984).

### 식물체 재생

현탁배양에서 유도된 1, 2, 3, 4개의 자엽을 가진 체세포배를 5 g/L 자당이 첨가된 1/2 MS 고형배지에 옮겨 3주간 배양한 후 자엽수 변화에 따른 체세포배의 식물체 재생률을 관찰하였다. 체세포배의 발아에서 제1엽의 생장이 일어나는 개체를 재생 식물체로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 체세포배 발생 및 자엽수 변이

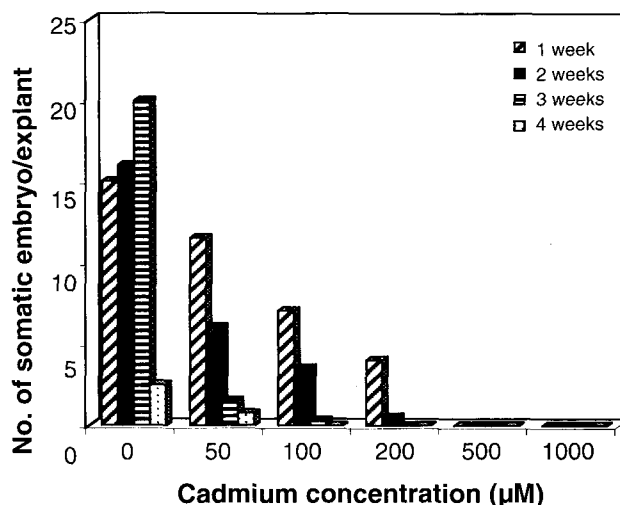
배형성능 켈러스는 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 고형배지에서 형성되었고 배형성능 켈러스는 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 액체배지에서 15일간 배양한 후 여러가지 농도의 카드뮴이 첨가된 액체배지에 이식하였다. 체세포배배발생을 위하여 카드뮴첨가배지에서 1, 2, 3, 및 4주 후 MS 기본배지에 옮겨 배양하여 체세포배 발생을 유도하였다. 2,4-D 배지에서 3주간 배양한 후 MS 기본배지에 계대배양했을 때 가장 높은 체세포배 발생률을 보였다. 현탁배양에서 체세포배 발생은 2,4-D 단독처리에서 더욱 높았으며, 2,4-D와 카드뮴을 조합처리하면 카드뮴 농도가 높아질수록 또한 배양기간이 길어질수록 체세포배 발생이 감소하였다. 대조구에 비하여 카드뮴처리구

에서는 어떠한 농도에서도 체세포배 발생이 낮았으며, 500  $\mu\text{M}$  및 1,000  $\mu\text{M}$ 의 고농도 카드뮴처리구에서는 체세포배가 전혀 형성되지 않았다 (Figure 1). 이와같은 현상은 고농도의 카드뮴이 체세포배 발생을 저해할 뿐이며, 고농도의 자당, 적정농도의 카드뮴, 차아염소산나트륨 등의 스트레스는 체세포배 발생을 유도하며 2,4-D 처리에서보다 체세포배 발생률이 높고 양질의 체세포배가 생산되었다는 보고와 상반된 현상이었다 (Kamada et al. 1989; Kurata et al. 1992). 이러한 현상은 기내 체세포배의 유도는 식물의 종, 품종, 배양절편, 배양 방법 및 배지내 첨가물질 등에 의해서 영향을 받기 때문으로 보여진다 (Ammirato 1985; Jones and Rost 1989).

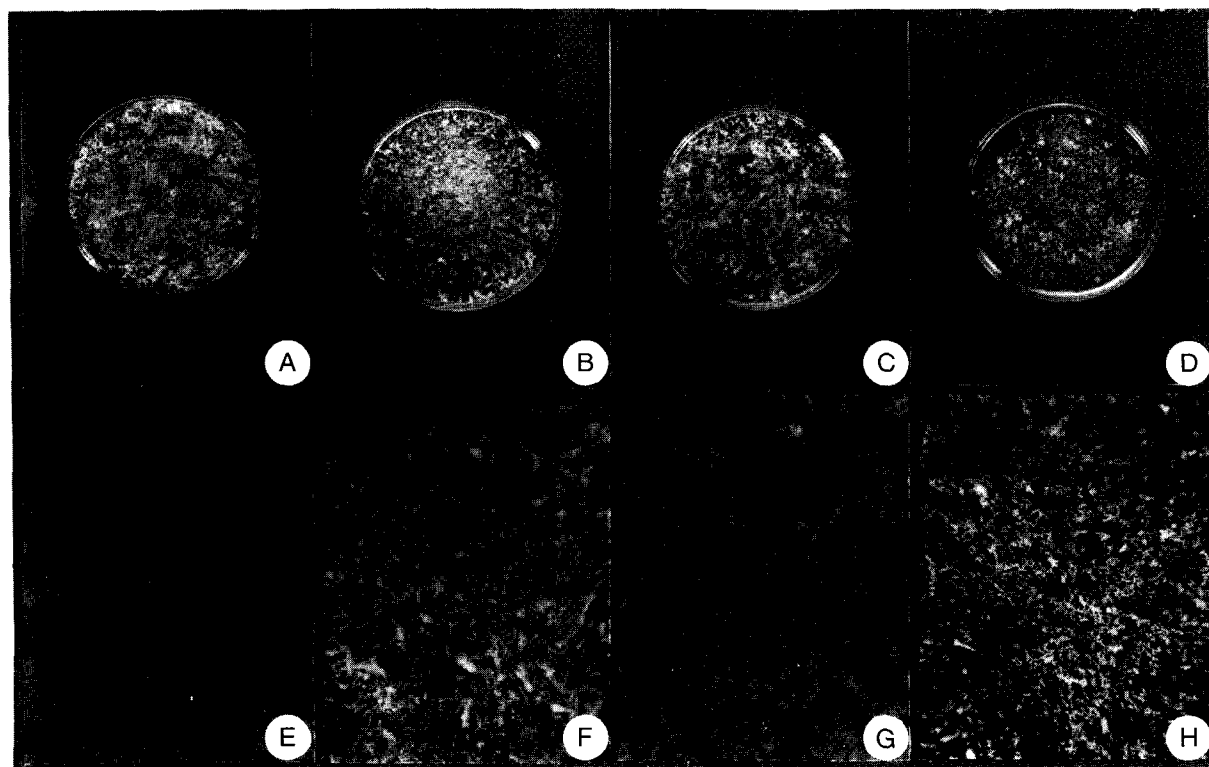
체세포배의 성숙에 미치는 카드뮴의 영향을 알아보기 위하여 배발생능 캘러스를 여러 가지 농도의 (50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) 카드뮴을 1주간 처리한 후 MS 기본배지에서 3주간 배양하였다. 카드뮴을 처리하지 아니한 대조구에서는 자엽단계까지의 성숙이 일어났으나 (Figure 2A, E), 비교적 저농도인 50  $\mu\text{M}$  및 100  $\mu\text{M}$  처리시에도 체세포배 성숙이 대조구보다 저조하였으며 (Figure 2B, C, F, G), 200  $\mu\text{M}$  1주 처리구에서는 많은 체세포배가 심장형배나 어뢰형 단계로 성숙이 저해되었고 자엽시기의 체세포배는 극히 일부 관찰되었다. 그리고 200  $\mu\text{M}$  카드뮴 첨가로 2주 이상 배양하면 체세포배 발생 자체가 저해되었다 (Figure 2D, H). 이와같은 결과는 고농도의 카드뮴은 체세포배의 발생뿐만 아니라 배의 성숙 또한 억제하는 것

으로 사료된다.

배발생능 캘러스를 1 mg/L 2,4-D와 50  $\mu\text{M}$ 의 카드뮴 첨가



**Figure 1.** Effect of cadmium on the formation of somatic embryos from cell culture of *Daucus carota*. L Embryogenic calli were cultured on MS agar medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D for 15-day of culture. Somatic embryos were formed cell culture supplemented with combination of 1 mg/L 2,4-D and various concentrations of  $\text{CdCl}_2$  for 1,2,3 or 4 weeks of culture and then transferred into MS basal medium.



**Figure 2.** Somatic embryos derived from cell suspension cultures of *Daucus carota* treated with  $\text{CdCl}_2$ . The embryogenic calli were cultured in MS liquid basal medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and various concentrations of  $\text{CdCl}_2$  for 1 week of culture. And then they were transferred into MS basal medium for 3 weeks of culture. A, E: control; B, F: 50  $\mu\text{M}$ ; C, G: 100  $\mu\text{M}$ ; D, H: 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ .

한 MS 배지에 1, 2, 3 및 4주간 배양하여 발생된 체세포배의 자엽변이를 관찰하였다. 정상적인 2개의 자엽을 갖는 체세포배의 발생률은 대조구에서 68%이었으며 카드뮴처리에서는 배양기간이 길수록 체세포배 발생률은 감소하였다. (Figure 3). 3개의 자엽을 갖는 비정상적인 체세포배는 대조구에 비하여 1, 2, 3 및 4주간의 카드뮴처리시는 18%, 29%, 31% 및 38% 로서 카드뮴 처리기간이 길수록 더욱 증가하였다 (Figure 3).

일반적으로 쌍자엽 식물의 접합자배들은 두 개의 자엽을 갖지만 기내배양으로 유도된 체세포배의 자엽수의 변이는 매우 큰 것으로 관찰되었다 (Cho and Soh 1995; Cho et al. 2000). 체세포배의 다양한 자엽형태 형성의 직접적인 원인에 대해서는 아직 불분명하지만, 자엽형태의 다양성을 유도하는 몇가지 요인들이 보고된 바 있다. 땅두릅 체세포배는 ABA, 싸이토키닌, 2,4-D 등의 식물생장조절제에 의해 다자엽 발생이 일어나는 것으로 보고되었고 (Lee and Soh. 1993b), 대두에서는 2,4-D 혹은 삼투제의 영향으로 자엽의 형태변이가 일어났다 (Choi et al. 1994b). 본 실험의 결과 식물생장조절제뿐만 아니라 카드뮴 역시 자엽의 형태형성에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

체세포배의 발아 및 식물체 재생

현탁배양으로부터 발생된 체세포배에서 2개의 정상 자엽을 갖는 체세포배는 대조구에서 97%의 높은 재생률을 나타냈으나 카드뮴 처리에서는 재생률이 감소하였으며 (Figure 4). 1,

3 및 4개의 자엽을 갖는 비정상적인 체세포배의 재생률은 대조구보다 낮았으며, 처리 기간이 길면 길수록 감소하였다 (Figure 4). 50 µM의 카드뮴 첨가배지에서 1주간 현탁배양 후 MS 기본배지에서 3주간 배양하면 1개, 3개 및 4개 자엽을 갖는 체세포배는 각각 40%, 53% 및 33%의 재생률을 보이며 2주간 카드뮴 처리 후 MS 기본배지에서 2주간 배양하면 1개 자엽을 갖는 체세포배에서는 20%, 3개 자엽에서는 30% 및 4개 자엽의 체세포배는 20%의 낮은 재생률을 보였다 (Figure 4. 5). 이와 같이 카드뮴 처리기간이 길면 길수록 카드뮴의 독성으로 인하여 식물체 재생률이 감소하였다.

자엽변이는 형태적인 차이뿐 아니라 발아율이라는 기능적인 면에서도 그 차이가 두드러지게 나타난다. 이상자엽을 갖는 체세포배가 2개 자엽을 갖는 체세포배보다 식물체 재생률이 낮은 것은 땅두릅, 시호, 당근, 당귀 등 여러가지 식물에서 이미 밝혀진 바 있으며 (Buchheim et al. 1989; Isabelle et al. 1993; Lee et al. 1997; Cho et al. 1998). 이러한 저조한 체세포배의 발아율은 체세포배의 산업적인 이용에 있어 부정적인 영향을 줄 수 있다. 따라서 체세포배의 발아율 향상을 위하여는 건조처리를 하거나 (Timbert et al. 1996; Lee et al. 1997), 배지 표면에 여과지를 덮어놓는 물리적 변화로 체세포배 발생을 증가시킬 수 있으며 (Soh et al. 1998), 열처리 (Zimmerman et al. 1989)와 4°C의 저온처리에 의해서도 체세포배발생을 향상시킬 수 있다 (Rajasekaran and Mullins 1979). 또한 ABA를 처리하면 정상적인 체세포배 생산에 크게 영향을 주고, 천궁에서 활성탄을 배지에 첨가하여 (Cho et al. 2000) 발아율의 향상을 꾀할 수 있음이 보고되었다.

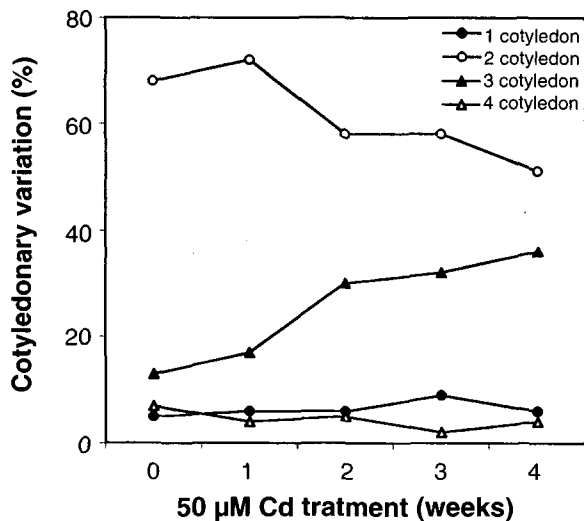


Figure 3. Cotyledonary variation frequency of somatic embryos derived from cell cultures of *Daucus carota* L. Embryogenic callus were treated with 50 µM CdCl<sub>2</sub> for 1,2,3 or 4 weeks of culture.

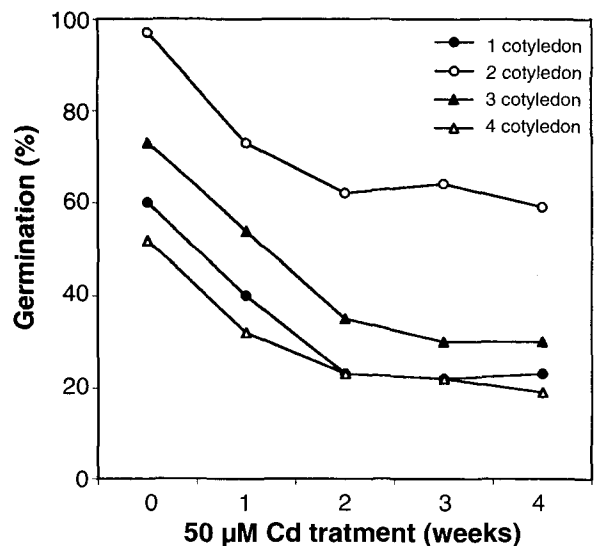
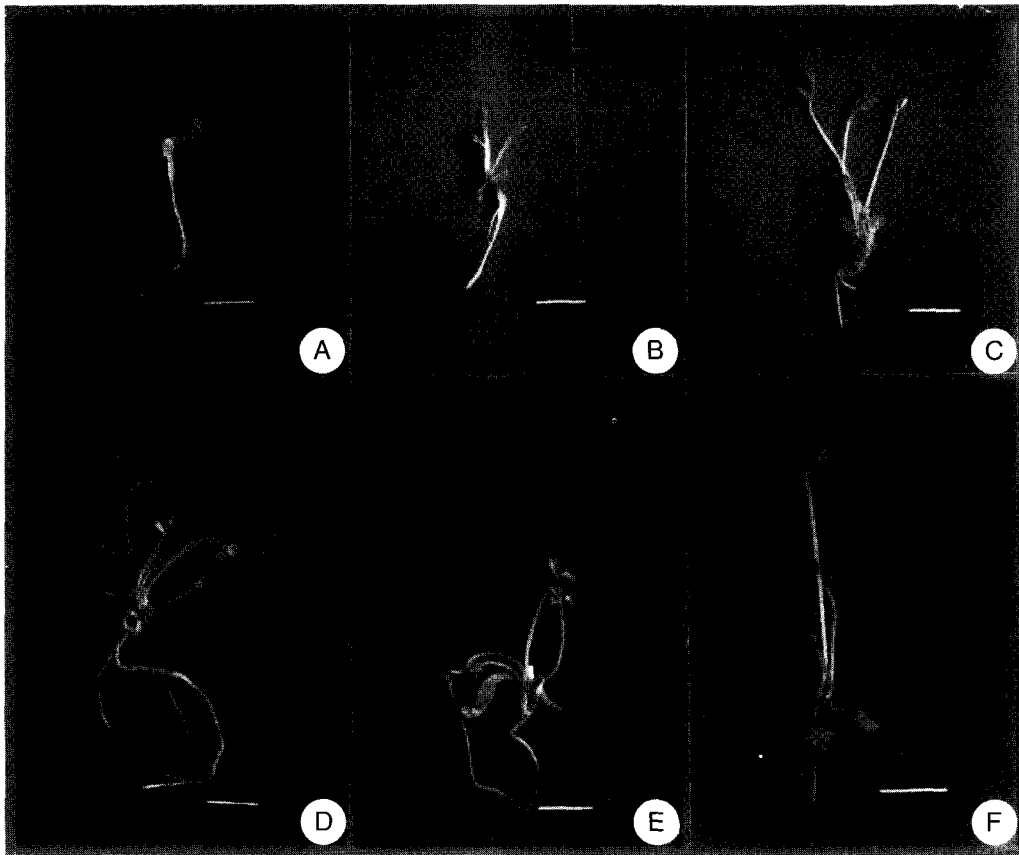


Figure 4. Germination of cotyledonary somatic embryos formed from suspension cultures of *Daucus carota* L. Embryogenic callus were treated with 50 µM CdCl<sub>2</sub> for 1,2,3 or 4 weeks of culture and then transferred into MS basal medium.



**Figure 5.** Plant regeneration of somatic embryos derived from cotyledon explants by suspension cultures of *Daucus carota*. (A) Somatic embryo with trumpet-shaped cotyledon; (B) One cotyledon; (C) Normal somatic embryo with two cotyledon; (D) Three cotyledon; (E) Four cotyledon and (F) Five cotyledon.

**적 요**

당근 유식물체의 자엽을 절편으로 유도된 배형성능 세포를 여러가지 농도의 카드뮴 (0, 50, 100, 200, 500, 1000 μM)이 첨가된 MS 액체배지에 배양한 다음 MS 기본배지에 옮겨서 체세포배 발생을 유도했고 한편 카드뮴 처리구와 카드뮴이 처리되지 않은 대조구에서 체세포배를 얻었다. 현탁배양에서 정상적인 2개의 자엽을 갖는 체세포배 발생은 카드뮴 첨가 배지에서 감소하였으나 비정상적인 3개의 자엽을 갖는 체세포배가 많이 관찰되었다. 또한 비정상적인 1개, 3개 및 4개의 자엽을 갖는 체세포배보다 정상적인 2개의 자엽을 갖는 체세포배의 식물체 재생률이 가장 높았다. 카드뮴 처리구에서 발생된 체세포배의 발아율은 자엽수에 관계없이 대조구에서 발생된 체세포배의 발아율에 비해 감소하였다.

**인용문헌**

Ammirato PV (1985) Patterns of development in culture. In: R.R. Henke, K.W. Hughes, M. P. Constantin, A. Hollander, des., Tissue Culture in Forestry and Agriculture, Plenum

Press Cooperation, New York, pp 9-29  
 Ammirato PV (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. In: CE Green et al., eds, Plant Tissue and Cell Culture. Alan R Liss, Ins., New York. pp 57-81  
 Ammirato PV, Steward FC (1971) Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. Bot Gaz 132 : 149-158  
 Bennetzen JL, Adams TL (1984) Selection and characterization of cadmium-resisiant suspension cultures of the wild tomato. *Lycopersicon peruvianum*. Plant Cell Rep 3: 258-261  
 Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. Plant Physiol 89: 768-775  
 Cho DY, Lee EK, Soh WY (1998) Anomalous structure of somatic embryos developed from leaf explant cultures of *Angelica gigas* Nakai. Kor J Plant Tiss Cult 25: 1-5  
 Cho DY, Lee EK, Soh WY (2000) Cotyledon structure and germinability of somatic embryos formed from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. Kor J Plant Tiss Cult 27: 137-142  
 Cho DY, Soh WY (1995) Morphological observation of somatic embryogenesis in leaf explant cultures of *Bupleurum falcatum* L. Kor J Plant Tiss Cult 22: 241-260

- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994a) High frequency Somatic embryogenesis and plant regeneration in seedling explant cultures of melon (*Cucumis melo* L.). *Kor J Plant Tiss Cult* **21**: 1-6
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR** (1994b) Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid on somatic embryo morphology. *Kor J Plant Tiss Cult* **21**: 7-13
- Choudhary M, Bailey LD, Grant CA** (1994) Effect of zinc on cadmium concentration in the tissue of durum wheat. *Can J Plant Sci* **74**: 549-552
- Gray DJ, McColley DW, Compton ME** (1993) High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* **118**: 425-432
- Huang B, Hatch E, Goldsbrough PB** (1987) Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. *Plant Sci* **52**: 211-221
- Isabelle GT, Mauro MC, Sossountzov L, Miginiac E, Deloire A** (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine : Histological characterization and the effect of ABA, BAP and Zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell Tiss Org Cult* **33**: 91-103
- Jackson PJ, Unkefer CJ, Doolen JA, Robinson NJ** (1990) Mechanisms of trace metal tolerance in plants. *In* : F Katterman, ed, *Environmental Injury to Plants*, Academic Press, Inc pp. 232-255
- Jackson PJ, Unkefer CJ, Doolen JA, Watt K, Robinson NJ** (1987) Poly(r-glutamyl cysteinyl) glycines: Its role in cadmium resistance in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6619-6623
- Jones TD, Rost TL** (1989) Histochemistry and ultrastructure of rice (*Oryza sativa*) zygotic embryogenesis. *Amer J Bot* **76**: 504-520
- Kageyama K, Komatsuda T, Nakajima K** (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. *Plant Tiss Cult Lett* **7**: 108-110
- Kamada H, Kobayashi K, Kiyosue T, Harada H** (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol* **25**: 1163-1166
- Kurata K, Iwabuchi, Futaya Y** (1992) Induction of carrot somatic embryogenesis by high sucrose concentration without changing culture medium. *Acta Horticult* **319**: 195-196
- Lee EK, Cho DY, Soh WY** (1997) Effect of humidity on somatic embryogenesis in cotyledon explant culture of carrot. *J Plant Biol* (**40**): 89-94
- Lee KS, Kang SW, Kim YH, Kim EA, Kim KH, Choi YK** (1990) Cadmium detoxification mechanism of Cd-resistant *Bacillus* sp. Isolated from industrial sewage. *Kor J Limnol* **23**: 115-12
- Lee KS, Soh WY** (1993a) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. *Kor J Plant Tiss Cult* **20**: 77-84
- Lee KS, Soh WY** (1993b) Effects of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. *Kor J Plant Tiss Cult* **20**: 171-175
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Rajasekaran K, Mullins MG** (1979) Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J Exp bot* **30**: 399-407
- Reese RN, Roberts LW** (1984) Cadmium uptake and its effects on growth of tobacco cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* **3**: 91-94
- Setia RC, Bala R** (1994) Anatomical changes in root and stem of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to different heavy metals. *Phytomorphology* **44**: 95-104
- Smith DL, Krikorian AD** (1990) pH control of carrot somatic embryogenesis. *In* ; Hjj Nijkamp, LHW Van der plas, J Van der Plas, J Van Artrijk, eds., *Progress in plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, pp. 449-453
- Soh WY, Cho DY, Lee EK** (1996) Multicotyledonary structure of somatic embryos formed from cell cultures of *Daucus carota* L. *Kor J Bot* **39**: 71-77
- Soh WY, Lee EK, Cho DY** (1998) Enhanced development and germination of carrot somatic embryos on modified surface of medium. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**: 231-236
- Soh WY, Jeon KB, Cho DY** (1980) The effects of cadmium and auxin on the adventitious root formation in hypocotyl segments of *Phaseolus vulgaris* L. *Kor J Plant Tiss Cult* **7**: 43-48
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK** (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant* **85**: 85-89
- Steward FC, Mapes MO, Mears K** (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended. *Amer J Bot* **445**: 705-708
- Sung MW** (1976) Studies on the precipitation of lead ion and the inhibition of plant growth. *Kor J Bot* **19**: 1-6
- Timbert R, Barbotin JN, Thomas D** (1996) Enhancing carrot somatic embryos survival during slow dehydration, by encapsulation and control of dehydration. *Plant Science* **120**: 215-22.
- Vallee BL and Ulmer DD** (1972) Biochemical effects of mercury cadmium and lead. *Ann Rev Biochem* **41**: 91-128
- Wetzstein HY, Baker CM** (1993) The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Science* **92**: 81-89
- Zimmerman JL, Apuya N, Darwish KO, Carroll C** (1989) Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development. *Plant Cell* **12**: 1137-146.