

이탈리안 라이그래스의 종자배양에 있어서 식물체 재분화에 미치는 몇 가지 요인

이효신 · 강경민 · 조진기*

경북대학교 농과대학

Factors Affecting Plant Regeneration from Seed-Derived Calli in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

LEE, Hyo Shin · KANG, Kyung Min · JO, Jinki*

College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea .

ABSTRACT In order to optimize the conditions of callus induction and plant regeneration in seed culture of Italian ryegrass, the effects of basic medium and carbon sources on seed culturability and genotypic difference of plant regenerability were investigated. MS medium was better than N6 and B5 medium in enhancing callus growth and plant regeneration. Sucrose was superior to maltose in plant regeneration as carbon source in the medium. The genotypic difference in plant regenerability was obvious among four cultivars of Italian ryegrass tested. 'Rio' and 'Jeanne' showed to have higher regenerability with the frequency of 38% and 56%, respectively.

Key words: Callus, plant regeneration, Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

서 론

이탈리안 라이그래스 (Italian ryegrass)는 일년생 또는 월년생의 화분과 사료작물로서 초기 생육이 왕성하고 단위 면적당 수량, 영양 가치 및 가축의 기호성이 우수하여 우리나라의 경우 남부지방에서 답리작으로 많이 재배되고 있다 (Choi et al. 2000a). 그러나 가뭄과 더위에 약하고 특히 추운 동절기를 거치는 지방에서는 월동이 되지 않는 등의 단점을 가지고 있다 (Park et al. 1987). 이러한 단점을 극복하기 위하여 국내에서도 교잡 육종에 의해 '화산 101호' 등과 같은 몇 종의 신품종이 육성되었으나 아직 널리 보급되지는 않고 있는 실정이다 (Choi et al. 2000a). 따라서, '골도 (Gordo)', '바물트라 (Barmutra)', '테트라플로럼 (Tetraflorum)', '플로리다 80 (Florida80)' 등 현재 국내의 축산농가 보급을 위한 장려 품종인 14품종 모두가 외국에서 도입된 품종들이다.

이탈리안 라이그래스의 조직배양은 미성숙 배 (Dale 1980)와 미성숙 화서 (Creemers-Molenaar et al. 1988; Dale et al. 1981; Dale and Dalton 1983)를 이용한 배형성 및 식물체 재

분화에 관한 결과가 보고되었다. 최근 유용 작물의 품종 육성에 있어 전통적인 육종방법과 더불어 분자생물학적인 방법을 이용하여 제초제, 바이러스, 해충 그리고 고온 및 저온 등과 같은 환경 스트레스에 내성을 가지는 유용 농작물이 개발되면서 (Chai and Sticklen 1998; James 1996), 이탈리안 라이그래스의 형질전환을 위한 연구도 수행되었다. 이탈리안 라이그래스의 형질전환을 위한 조직배양계를 확립함에 있어 이탈리안 라이그래스를 포함한 단자엽 식물의 경우 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환이 어렵다는 점으로 인해 direct gene transfer를 위하여 현탁배양세포 및 원형질체로부터의 식물체 재분화에 관한 결과가 보고되었으며 (Dalton 1988; Jones and Dale 1982; Wang et al. 1993), 최근 microprojectile bombardment를 이용한 형질전환 결과가 보고되었다 (Dalton et al. 1999; Wang et al. 1997; Ye et al. 1997).

이탈리안 라이그래스가 우리나라의 목초 종자 수입량의 약 66%를 차지하는 중요성에 비하여, 이탈리안 라이그래스의 조직배양에 의한 식물체 재분화에 대한 국내 연구는 미미한 실정인데, 최근 성숙종자배양에서 캘러스 형성조건과 식물체 재분화에 대한 연구결과가 보고된 바 있다 (Rim et al. 2000). 그러나 식물체 재분화율이 그다지 높지 못할 뿐만 아니라 조

*Corresponding author. Tel 053-950-5756 Fax 053-950-6750
E-mail jkjo@knu.ac.kr

직배양 효율의 품종 간 차이, 배지종류 및 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류 등에 따른 세부적인 연구는 이루어지지 못한 실정이다.

최근, Hiei 등 (1997)이 벼의 형질전환을 보고한 이래로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 단자엽 식물에서도 일반화되어 가고 있으며 이 방법은 전기자극, polyethylene glycol 및 microprojectile bombardment를 이용한 방법에 비하여 형질전환 효율 및 도입된 유전자의 안정성이 높다는 장점이 있다 (Hiei et al. 1997; Horsch et al. 1985). 따라서, *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환 기술을 이탈리아 라이그래스의 개량에 이용함에 있어서 배양재료의 안정적인 공급을 위하여 성숙종자 유래의 캘러스로부터 효율적인 식물체 재분화 체계를 확립하는 것은 무엇보다도 중요한 일이다. 본 연구에서는 이탈리아 라이그래스의 종자배양에서 식물체 재분화 능력을 향상시키기 위하여, 배양효율의 품종 간 차이와 배지 조성 및 탄소원의 종류에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서는 농촌진흥청 축산기술연구소에서 표준재배법으로 재배되어 채종된 이탈리아 라이그래스 (*Lolium multiflorum* Lam.)의 품종 중 'Jeanne', 'Rio', 'Surrey' 및 'Tachi-wase'를 공시품종으로 사용하였다. 성숙종자의 종피를 제거하고 70% ethanol에 30초간 교반한 후 1% sodium hypochlorite 용액에서 50분간 표면살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 5회 세척한 다음 캘러스 유도배지에 치상하였다.

2,4D 농도에 따른 배양효율의 차이

캘러스 유도를 위한 2,4-D의 적정농도를 조사하기 위하여 0~7 mg/L의 2,4-D와 30 g/L maltose, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 25±1°C로 조절되는 항온실에서 암상태로 배양하였다. 배양 14일 후에 발아된 종자로부터 shoot와 root를 제거하고, 유도된 캘러스만을 떼어 새 배지로 계대하여 다시 28일간 배양하였다. 캘러스 생체중은 최초 종자치상 후부터 배양 6주 후에 1 종자로부터 형성된 캘러스의 무게를 20반복으로 조사하였다. 식물체 재분화율을 조사하기 위하여 캘러스를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L maltose, 5 g/L gelrite가 첨가된 MS 배지에 이식한 다음, 25±1°C로 조절되고 2,500 Lux로 조명되는 항온실에서 배양하여 식물체의 재분화를 유도하였다. 총 100개의 캘러스를 재분화배지에 이식하여 6주간 배양한 다음,

shoot가 1 cm 이상 자란 것을 재분화된 식물체로 조사하였다. 식물체 재분화율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다.

기본배지에 따른 배양효율의 차이

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 캘러스 형성을 위한 적정 배지를 선정하기 위하여, 'Jeanne'를 공시품종으로 하여 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L maltose, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite가 첨가된 MS, N6 (Chu et al. 1975) 및 B5 (Gamborg et al. 1968) 배지에 각각 종자를 치상하여 상기와 동일한 방법으로 배양한 다음, 캘러스 생체중을 조사하였다. 또한 식물체 재분화를 위한 적정배지를 선정하기 위하여 유도된 캘러스를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L maltose, 5 g/L gelrite가 첨가된 각각의 배지에 이식하여 상기와 동일한 방법으로 배양한 다음 식물체 재분화율을 조사하였다.

탄소원의 종류에 따른 배양효율의 차이

배지 내에 첨가되는 적정 탄소원을 조사하기 위하여 기본배지로 MS 배지를 사용하여, 탄소원을 제외하고는 상기와 같은 캘러스 유도 및 식물체 재분화 배지조성에 maltose와 sucrose를 각각 30 g/L로 첨가하여 탄소원의 종류에 따른 캘러스 형성 및 식물체 재분화 능력을 상기와 동일한 방법으로 비교하였다.

배양효율의 품종 간 차이

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 식물체 재분화 능력의 품종 간 차이를 조사하기 위하여, 'Jeanne' 외 3품종 ('Rio', 'Surrey', 'Tachi-wase')을 이용하여 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite가 첨가된 MS 배지에 종자를 치상하여 캘러스를 유도시킨 다음, 캘러스를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite가 첨가된 MS 배지에 이식하여 식물체 재분화 능력을 비교하였다.

결과 및 고찰

2,4-D의 적정농도

이탈리안 라이그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 생장조절제의 적정농도를 결정하기 위하여 'Jeanne'의 종자를 0~7 mg/L의 2,4-D가 첨가된 MS배지에 치상하여 암상태에서 6주간 배양하여 캘러스 생체중을 조사

한 다음, 유도된 캘러스를 재분화 배지로 이식하여 식물체 재분화 능력을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 캘러스 유도배지에서 배양 5~10일째부터 캘러스가 유도되기 시작하였으며 배양 6주 후의 캘러스 형성능력을 비교한 결과, 2~5 mg/L의 2,4-D 농도에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 7 mg/L의 2,4-D 농도에서는 감소하는 것으로 나타났다. 유도된 캘러스를 재분화 배지로 이식하였을 때의 식물체 재분화 능력은 2 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스에서 가장 높게 나타났으며, 3 mg/L 이상의 농도에서는 캘러스 유도배지에 첨가된 2,4-D의 농도가 증가할수록 식물체 재분화 능력이 감소하는 것으로 조사되었다 (Table 1). 따라서, 이후의 실험에서 이탈리안 라이그래스의 종자로부터의 캘러스 유도배지에 2 mg/L의 2,4-D를 사용하였다.

이탈리안 라이그래스의 종자 (Rim et al. 2000; Wang et al. 1993; Ye et al. 1997) 및 화서 (Creemers-Molenaar et al. 1988) 배양으로부터 캘러스를 유도하기 위하여 4~5 mg/L의 2,4-D의 첨가가 효과적이라는 것이 대부분의 연구자들의 공통된 견해이다. 본 연구결과와 비교하여 2,4-D 농도에서의 차이는 배양에 이용된 공시품종의 genotype 간 차이이거나 배양방법 및 조건 등이 다른 데서 비롯된 결과로 추정되며, 이에 대한 세밀한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

기본배지의 검토

이탈리안 라이그래스의 품종 중 'Jeanne'의 종자를 2 mg/L의 2,4-D가 첨가된 MS, N6 및 B5 배지에 배양하여 캘

러스 형성 능력과 식물체 재분화율을 비교한 결과 (Table 2), B5 배지에서 형성된 캘러스의 생체중은 12.1 mg, N6 배지에서 형성된 캘러스의 생체중은 13.5 mg, 그리고 MS 배지에서 형성된 캘러스는 16.5 mg이었다. 또한 이들 캘러스를 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin을 첨가한 각각의 재분화 배지에 이식하였을 때, B5 배지와 N6 배지에서 형성된 캘러스로부터의 재분화율은 24%와 30%를 각각 나타내었으나, MS 배지에서 형성된 캘러스는 42%의 높은 재분화 능력을 나타내었다.

일반적으로 화분과 작물의 조직배양에서는 N6 배지가 MS 배지보다 효율적이라고 알려져 있는데 (Vasil and Vasil 1984), 이탈리안 라이그래스의 종자 (Rim et al. 2000; Wang et al. 1993; Ye et al. 1997) 및 화서 (Creemers-Molenaar et al. 1988)로부터 캘러스 유도배지로 MS 배지를 주로 이용하고 있다. 또한 이탈리안 라이그래스와 같은 화분과 사료작물인 켈터키 블루그래스의 종자배양 (Griffin and Dibble 1995) 과 톨 페스큐의 미숙배 배양 (Bai and Qu 2001)에서도 캘러스 유도배지로 MS 배지를 주로 이용하고 있는데, 본 연구에서도 N6 배지보다는 MS 배지가 이탈리안 라이그래스의 종자 배양에 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다.

캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 탄소원의 영향

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류가 캘러스 형성 및 식물체 재분화율에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 3). 그 결과, maltose 첨가구의 경우 캘러스 생체중과 식물체 재분화율은 16.5 mg과 42%를 나

Table 1. Effect of 2,4-D concentrations on callus growth and plant regeneration in seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

2,4-D (mg/L)	No. of seeds transferred ^a	Callus weight of per seed (mg) ^b	No. of calli transferred ^c	% of plant regeneration
0	100	-	-	-
2	100	16.5±2.1	100	42.0
3	100	17.4±2.3	100	38.0
5	100	16.3±2.2	100	33.0
7	100	13.4±2.7	100	24.0

^aSeeds were placed on MS containing 0~7 mg/L 2,4-D, 30 g/L maltose, 2 g/L casein hydrolysate and 5 g/L gelrite for 6 weeks.

^bCallus formed from one seed was weighed for the callus formation capacity and it was replicated 20 times.

^cThe calli were cultured on MS media containing 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L maltose and 5 g/L gelrite for 6 weeks.

Table 2. Effect of basic medium on callus growth and plant regeneration in seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

Basic media	No. of seeds transferred ^a	Callus weight of per seed (mg) ^b	No. of calli transferred ^c	% of plant regeneration
B5	100	12.1±2.4	100	24.0
N6	100	13.5±1.9	100	30.0
MS	100	16.5±2.1	100	42.0

^aSeeds were placed on each media containing 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L maltose, 2 g/L casein hydrolysate and 5 g/L gelrite for 6 weeks.

^bSee foot note of Table 1.

^cThe calli were cultured on each media containing 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L maltose and 5 g/L gelrite for 6 weeks.

Table 3. Effect of carbon sources on callus growth and plant regeneration in seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

Carbon sources	No. of seed transferred ^a	Callus weight of per seed (mg) ^b	No. of calli transferred	% of plant regeneration
Maltose	100	16.5 ± 2.1	100	42.0
Sucrose	100	17.9 ± 2.4	100	56.0

^aSeeds were placed on MS media containing 2 mg/L 2,4-D, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite and 30 g/L maltose or sucrose for 6 weeks.

^bSee foot note of Table 1.

^cThe calli were cultured on MS media containing 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 5 g/L gelrite and 30 g/L maltose or sucrose for 6 weeks.

타낸 반면에 sucrose 첨가구의 경우 17.9 mg과 56%를 나타내어 sucrose가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스가 생체중도 무겁고 식물체 재분화율도 높은 양상을 나타내었다.

식물 조직배양에 있어서 배지 내에 첨가되는 탄소원은 일반적으로 sucrose가 주로 이용되고 있으며 이탈리아 라이그래스의 종자 (Wang et al. 1993; Ye et al. 1997) 및 화서 (Creemers-Molenaar et al. 1988) 배양에서도 sucrose를 이용하고 있다. 그러나 보리, 톨 페스큐 및 귀리의 종자배양에서는 maltose를 이용하고 있으며 (Cho et al. 1998; 2000; Choi et al. 2000b) 벼, 밀 및 creeping bentgrass에서는 sucrose에 비하여 maltose가 캘러스로부터 식물체 재분화를 촉진하는 것으로 보고되었다 (Asano et al. 1994; Ghosh Biswas and Zapata 1993; Last and Brettel 1990). 잔디의 캘러스 증식에 있어서는 sucrose가 효과적이라고 보고되었으나 (Han et al. 1996), 최근 Bae 등 (2001)은 Zoysiagrass의 종자배양에서 신초를 형성한 캘러스의 빈도는 sucrose 첨가배지에서 가장 높았으나 캘러스 당 신초수는 maltose 및 glucose가 첨가된 배지에서 훨씬 높은 빈도로 분화되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 maltose보다는 sucrose를 배지 내에 첨가하면 배양 효율이 향상되는 것으로 나타났는데, 탄소원의 보다 구체적인 효과를 구명하기 위해서는 여러 가지 탄소원의 단용 또는 혼용의 효과에 대한 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

식물체 재분화 능력의 품종 간의 차이

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 30 g/L의 sucrose가 첨가된 MS 배지가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 효과적인 것으로 나타났다. 따라서, 이러한 배지 조성에서 식물체 재분화 능력의 품종간의 차이를 조사하기 위하여 'Jeanne'와 3품종을 비교한 결과 (Figure 1), 식물체 재분화 능력은 품종에 따라 22~56%까지의 큰 차이를 나타내었다. 즉, 'Surrey'와 'Tachi-wase'는 각각 22%와 25%의 비교적 낮은 식물체 재분화 능력을 나타낸 반면에 'Rio'와 'Jeanne'는 각각 38%와 56%의 높은 식물체 재분화 능력을 나타내어 모식물의 genotype에 따라서 큰 차이를 나타내는 것으로 조사되었다. 이탈리아 라이그래스의 조직배양 효율의 품종 간 차이는 Wang 등 (1993)이 현탁배양 세포유래의 캘러스로부터 식물

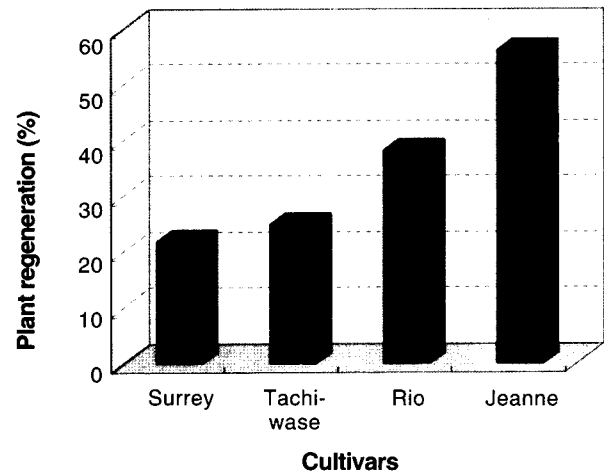


Figure 1. Varietal difference of plant regeneration ability from seed-derived calli of Italian ryegrass. The calli of four cultivars of Italian ryegrass were induced on MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 2 g/L casein hydrolysate and 5 g/L gelrite for 6 weeks in the dark. One hundred calli per cultivar were cultured on MS media containing 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite for 6 weeks in the light.

체 재분화율은 5~25%를 나타내며, 원형질체 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화율은 4~30%까지 다양하게 나타난다고 보고한 바 있고, Rim 등 (2000)은 종자유래의 캘러스로부터 15%의 식물체 재분화율을 보고한 바 있는데 본 연구에서도 식물체 재분화율이 22~56%까지 다양하게 나타나 Wang 등 (1993)과 Rim 등 (2000)의 연구결과를 확인할 수 있었다.

한편 Rim 등 (2000)은 이탈리아 라이그래스의 종자 유래의 캘러스로부터 재분화된 식물체에서 알비노 식물체의 출현율이 생장조절제의 처리농도에 따라서 1~12%로 높게 나타난다고 보고하였는데, 본 연구에서는 알비노 식물체의 발생비율이 1% 미만으로 아주 낮게 나타났다. 이러한 차이는 배양에 이용된 배지 및 생장조절제 의존성 및 품종 간 차이에서 비롯된 결과로 추정되며 이에 대한 구체적인 원인에 대해서는 좀 더 깊이 있는 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

Figure 2는 이탈리아 라이그래스의 종자배양 과정을 나타내는 것으로 2 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지에 종자를 배양하면 배양 5~10일경부터 배반부분에서 캘러스가 형성되며 (Figure 2A), 형성된 캘러스를 재분화 배지에 이식하면 배양 5일 후부터 신초의 분화가 관찰되었다 (Figure 2B). 그리고

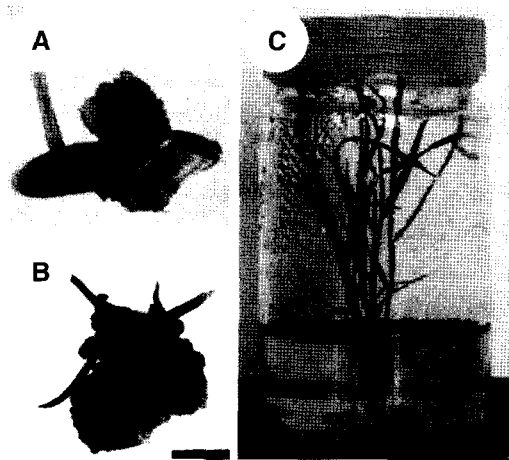


Figure 2. Plant regeneration from seed-derived callus in Italian ryegrass. A, Callus induced from a seed cultured on MS media containing 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 2 g/L casein hydrolysate and 5 g/L gelrite after 2 weeks in culture; B, Shoot formation from the callus cultured on MS medium containing 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite after 2 weeks in culture; C, In vitro plantlets development from seed-derived callus on MS regeneration media for 6 weeks.

재분화된 어린 식물체를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지로 이식하였을 때 정상 식물체로 발육되었으며 (Figure 2C), 이들 식물체를 순화처리 후 포트에서 재배하였다.

이상의 결과로 보아 이탈리아 라이그래스의 종자배양에서는 2 mg/L 2,4-D와 30 g/L의 sucrose가 첨가된 MS 배지에서 배양하여 캘러스를 유도시킨 다음, 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin이 첨가된 MS 배지에 캘러스를 이식하면 식물체 재분화에 적합한 것으로 나타났다. 또한 이탈리아 라이그래스의 품종 중 'Rio'와 'Jeanne' 각각 38%와 56% 이상의 높은 식물체 재분화 능력을 나타내어 이들 품종에서 유래된 캘러스는 유용유전자의 형질전환을 위한 식물 재료로 크게 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

적 요

이탈리안 라이그래스의 종자배양에서 캘러스 형성 및 식물체 재분화 체계를 확립하기 위하여 기본배지와 탄소원의 종류별 식물체 재분화 정도 및 배양효율의 품종 간 차이 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다. 기본배지의 종류에 따른 캘러스 형성 및 식물체 재분화율은 MS 배지가 N6 배지나 B5 배지보다 높게 나타났다. 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류에 따른 식물체 재분화율은 sucrose가 maltose보다 효과적이었다. 이탈리아 라이그래스의 종자배양에 있어서 모식물의 genotype에 따라 식물체 재분화 능력은 큰 차이를 보였으며, 공시품종 중 'Rio'와 'Jeanne'의 재분화 능력이 각각 38%와 56%로 가장 높았다.

사사 - 본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었음.

인용문헌

- Asano Y, Ito Y, Ohara M, Sugiura K, Fujie A (1994) Improved regeneration response of creeping bentgrass and japonic rice by maltose and lactose. *Plant Cell Tiss Org Cult* **39**:101-103
- Bae CH, Tohyama K, Lee SC, Lim YP, Kim HI, Song PS, Lee HY (2001) Efficient plant regeneration using mature seed-derived callus in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Kor J Plant Tiss Cult* **28**:61-67
- Bai Y, Qu R (2001) Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. *Plant Breed* **120**:239-242
- Chai B, Sticklen MB (1998) Applications of biotechnology in turfgrass genetic improvement. *Crop Sci* **38**:1320-1338
- Cho MJ, Jiang W, Lemaux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci* **138**:229-244
- Cho MJ, Ha CD, Lemaux PG (2000) Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. *Plant Cell Rep* **19**:1084-1089
- Choi GJ, Rim YW, Kim KY, Choi SH, Sung BR, Kim WH, Shin DE, Lim YC (2000a) A cold-tolerant and high-yielding Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety "Hwasan 101". *J Kor Grassl Sci* **20**:1-6
- Choi HW, Lemaux PG, Cho MJ (2000b) High frequency of cytogenetic aberration in transgenic oat (*Avena sativa* L.) plant. *Plant Sci* **156**:85-94
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* **18**:659-668
- Creemers-Molenaar J, Loeffen JPM, Van der Valk P (1988) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence-derived callus of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. *Plant Sci* **57**:165-172
- Dale PJ (1980) Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. *Z Pflanzenphysiol* **100**:73-77
- Dale PJ, Thomas E, Brettell RIS, Wernicke W (1981) Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **1**:47-55
- Dale PJ, Dalton SJ (1983) Immature inflorescence culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*. *Z Pflanzenphysiol* **101**:39-45

- Dalton SJ** (1988) Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb., *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. *Plant Cell Tiss Org Cult* **12**:137-140
- Dalton SJ, Bettany AJE, Timms E, Morris P** (1999) Co-transformed, diploid *Lolium perenne* (Perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum* (darnel) plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* **18**:721-726
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**:151-158
- Ghosh Biswas GC, Zapata FJ** (1993) High-frequency plant regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.) using maltose. *J Plant Physiol* **141**:470-475
- Griffin JD, Dibble MS** (1995) High frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep* **14**:721-724
- Han SS, Rim YS, Jeong JH** (1996) Effect of growth regulators, carbon sources and silver nitrate on callus formation and plant regeneration of turfgrass. *Kor J Weed Sci* **16**:221-229
- Hiei Y, Komari T, Kubo T** (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* **35**:205-218
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Wallroth M, Eichholtz D, Rodgers SG, Fraley RT** (1985) A simple and general method for transferring gene into plants. *Science* **227**:1229-1231
- James C** (1996) Progress of genetic engineering in field and horticulture crops. *Asian Seed* **3**(5):18-19
- Jones MGK, Dale PJ** (1982) Reproducible regeneration of callus from suspension culture protoplasts of the grass *Lolium multiflorum*. *Z Pflanzenphysiol* **105**:267-274
- Last DI, Brettel RIS** (1990) Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep* **9**:14-16
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **25**:473-497
- Park BH, Park BS, Kang JH** (1987) A comparison between diploid and tetraploid cultivars of *Lolium multiflorum* Lam. *J Kor Grass Sci* **7**:135-139
- Rim YW, Kim KY, Choi KJ, Sung BR, Shin JS** (2000) Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. *J Kor Grass Sci* **20**:25-30
- Vasil V, Vasil IK** (1984) Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of *Gramineae*. In : Vasil IK, (eds), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol 1, Academic Press, Orlando, pp 36-42
- Wang ZY, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G** (1993) Plants from cell suspension- derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Sci* **94**:179-193
- Wang GR, Binding H, Posselt UK** (1997) Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. *J Plant Physiol* **151**:83-94
- Ye X, Wang ZY, Wu X, Potrykus I, Spangenberg G** (1997) Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep* **16**:379-384

(접수일자 2001년 11월 19일)