

오차드그래스의 종자유래 캘러스배양 및 재분화에 미치는 배지첨가물질의 영향

이상훈 · 이동기 · 이병현†

경상대학교 응용생명과학부

Effects of Medium Supplements on Seed-Derived Callus Culture and Regeneration of Orchardgrass

Sang-Hoon Lee, Dong-Gi Lee, and Byung-Hyun Lee†

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT : In order to optimize tissue culture conditions for genetic transformation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), the effects of culture medium supplements on tissue culture responses were investigated with mature seeds of a cultivar, 'Roughrider', as explant tissues. The optimal concentration of 2,4-D for the induction of embryogenic callus from mature seeds was 3 mg/L. Plant regeneration frequency was 36.3% when embryogenic calli were cultured on the regeneration medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 3 mg/L BA. Addition of 1 g/L casein hydrolysate and 300 mg/L L-proline improved frequencies of embryogenic callus induction and plant regeneration up to 57.3 and 60.7%, respectively. Supplementation of the media with 10 mg/L AgNO₃ and 40 mg/L cysteine enhanced frequencies of callus induction and plant regeneration. Efficient regeneration system established in this study will be useful for molecular breeding of orchardgrass through genetic transformation.

Keywords : Callus, forage crop, orchardgrass, regeneration

오차드그래스(*Dactylis glomerata* L.)는 전 세계적으로도 널리 재배되고 있는 다년생의 북방형 화본과 목초로서 우리나라에서도 가장 많이 재배되고 있어서 전체 도입 목초종자의 90% 이상을 차지하고 있는 중요한 목초종 중의 하나이다. 이 초종은 주로 방목초지용으로 많이 재배되고 있으나, 건초 또는 사일리지 조제를 위한 채초용 사료작물로도 많이 재배되고 있어서 그 이용도가 가장 넓은 초종 중의 하나이다(Miller, 1984). 그러나 평균기온이 15~21°C의 서늘한 기후에서 가장 잘 자라는 오차드그래스의 생육특성 때문에 우리나라의 평야 지대에서 재배할 경우 여름철 고온다습한 기후조건으로 인해

생육이 극도로 저하되는 하고현상을 나타내어 적절한 재배관리를 해주지 못하면 고사되기 쉽고, 내건성과 월동성이 다소 약하며 출수기 이후에는 사료가치가 급격히 저하되는 등의 단점이 있다(Van Santen & Sleper, 1996). 이러한 단점을 보완하기 위해 지금까지 자연계에 존재하는 우수형질을 가진 품종을 선발하고 이들 간의 교잡에 의해 유용한 유전형질을 고정시키는 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Van Wijk *et al.*, 1993). 최근에는 유용유전자의 직접도입을 통하여 사료작물을 분자육종하고자하는 많은 연구가 시도되고 있다(McKersie, 1997; Spangenberg *et al.*, 1998). 이러한 유용유전자의 형질전환을 통한 신품종 육종을 위해서는 우선 효율적인 세포배양기술과 식물체 재분화기술 등의 체계적인 조직배양기술이 확립되어야 한다. 지금까지 보고된 오차드그래스의 조직배양을 통한 식물체 재분화에 관한 연구는 Horn *et al.*(1988)에 의한 현탁배양세포 유래의 원형질체로부터 식물체 재분화, 생육중인 잎 조직으로부터 직접 배발생을 통한 재분화에 관한 연구(Conger *et al.*, 1983; Trigiano *et al.*, 1989; Vasilenko *et al.*, 2000) 등이 보고된 바 있다. 그러나 이러한 재분화 체계는 배양기간이 장기간 소요되고 세포분열이 완성한 특수한 식물체 조직을 유지해야하는 등의 번거로움이 있어서 가장 효율적이고 안정적인 유전자 도입기술인 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 재료로 이용하기에는 비효율적인 점이 많다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에서 재배되고 있는 가장 대표적인 화본과 목초인 오차드그래스의 유용유전자 형질전환을 통한 신품종 개발을 목적으로 우선 연중 안정적으로 실험재료로 공급될 수 있는 성숙종자로부터 높은 재분화 효율을 나타내는 효율적인 캘러스유도와 식물체 재분화 체계를 확립하고자 실시하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-55-751-5418 (E-mail) hyun@nongae.gsnu.ac.kr

<Received March 1, 2004>

재료 및 방법

식물재료 및 종자살균

식물재료로는 오차드그래스의 품종 중 널리 재배되고 있는 품종인 'Roughrider' 품종을 사용하였다. 종피를 제거한 성숙 종자를 70% 에탄올에서 30초간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정 후, 5% sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

종자로부터 캘러스의 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 3 mg/L 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 첨가된 MS기본배지(Murashige & Skoog, 1962)를 사용하였다. 캘러스 유도시의 성장조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도효율을 조사하기 위하여 상기의 캘러스 유도배지에 성장조절물질로는 auxin류로 dicamba(3,6-dichloro-o-anisic acid), NAA(α -naphthalene acetic acid) 및 IAA(indole acetic acid)와 cytokinin류로 BA(6-benzyladenine)와 kinetin을 단용 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하였다. 배지첨가물질의 효과를 조사하기 위하여 casein hydrolysate, L-proline, AgNO₃ 및 cysteine을 캘러스 유도배지에 농도별로 첨가하여 배양효과를 조사하였다. 캘러스 유도배지에 살균된 종자를 100개씩 치상한 다음, 24±2°C의 성장실에서 암 조건으로 4주간 배양한 후, 종자로부터 형성된 캘러스의 비율을 조사하여 비교하였다. 종자로부터 유도된 캘러스는 상기와 동일한 캘러스 유도배지에서 2주 간격으로 계대배양하여 유지하였다.

캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위한 기본적인 재분화배지로는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 첨가된 N6 기본배지(Chu *et al.*, 1975)를 사용하였다. 식물체 재분화를 위한 적정 성장조절 물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 100개의 캘러스를 성장조절물질과 배지첨가물질이 각각 조합처리 된 재분화배지에 옮겨 24±2°C, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대배양한 후, 총 6주 동안 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 2 cm 이상으로 자란 shoot를 재분화개체로 조사하였다. 재분화된 shoot는 1/2 MS배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

결과 및 고찰

성장조절물질의 배양효과

오차드그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류에 따른 효과를 규명하기 위하여 예비실험으로 살균된 'Roughrider' 품종의 종자를 2,4-D, dicamba, NAA 및 IAA 등의 auxin류가 각각 1~5 mg/L의 농도로 첨가된 캘러스 유도배지에서 배양해 본 결과, 종자로부터의 캘러스 유도율은 각각의 auxin류에서 3 mg/L에서 가장 높게 나타났다. 가장 좋은 캘러스 유도효율을 보였던 3 mg/L 농도에서의 4종류의 auxin에 대한 캘러스 유도효율을 조사해 본 결과는 Table 1과 같았다. 종자로부터 캘러스 유도율은 2,4-D와 dicamba 처리구에서 각각 47.3%와 48.7%로 NAA와 IAA처리구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 또한 각각의 auxin 처리구에서 유도된 캘러스를 식물체 재분화배지에 옮겨주었을 때의 재분화율을 비교해 본 결과 2,4-D 처리구에서 유도된 캘러스의 식물체 재분화율이 35%로 가장 높게 나타났으며, dicamba 처리구가 30.7%의 재분화율을 나타내었다. 반면에 NAA와 IAA 처리구 유래의 캘러스의 경우 20% 전후의 낮은 재분화율을 나타내었다. 2,4-D 처리구에서 유도된 캘러스의 경우 육안으로 관찰하여도 유백색의 치밀한 조직의 배발생능이 높은 캘러스의 비율이 dicamba 처리구에 비해 많이 관찰되었다. 따라서 오차드그래스의 성숙종자로부터 캘러스유도에는 3 mg/L의 2,4-D가 첨가된 MS배지가 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 지금까지 보고된 오차드그래스 'Potomac' 품종의 세포배양의 경우에는 주로 30 µM의 dicamba가 가장 효과적인 것으로 보고되었으나(Conger *et al.*, 1983; 1989), 본 실험에 있어서 'Roughrider' 품종의 경우 캘러스배양에는 2,4-D와 dicamba 간의 배양효과는 동일하였으나 식물체 재분화율은 2,4-D가 dicamba에 비해 유의적인 차이는 없었으나 다소 높은 재분화율을 나타내었다. 이러한 배양효율의 차이는 이들 두 품종간의 genotype 차이에 따른 배양효율의 차이 때문일 것으로 추측된다.

한편 재분화배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도가 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 예비실험 결과 재분화배지에 첨

Table 1. Effect of different auxins on callus induction from mature seeds of orchardgrass.

Growth regulators	Callus induction (%) [†]	Plant regeneration (%) [‡]
2,4-D 3 mg/L	47.3±3.5 ^a	35.0±3.0 ^a
Dicamba 3 mg/L	48.7±2.1 ^a	30.7±3.1 ^a
NAA 3 mg/L	39.3±4.5 ^b	23.7±2.5 ^b
IAA 3 mg/L	29.0±2.6 ^c	20.0±4.6 ^b

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at P<0.05.

[†]Dehusked mature seeds were cultured on MS basal medium containing each growth regulators.

[‡]Calli were cultured on the plant regeneration medium (N6 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA).

가되는 auxin으로는 1 mg/L 2,4-D가 가장 효율적인 것으로 나타났다. 따라서 1 mg/L 2,4-D와 cytokinin과의 혼용첨가효과를 조사하기 위하여 BA와 kinetin을 농도별로 조합 첨가하여 식물체 재분화율을 조사하였다. 배발생 캘러스 유도율이 가장 좋았던 3 mg/L 2,4-D가 첨가된 캘러스 유도배지에서 형성된 캘러스를 각각의 BA 또는 kinetin이 첨가된 재분화배지에서 식물체 재분화율을 비교해 본 결과, 3 mg/L의 BA 또는 kinetin이 첨가된 재분화배지에서 각각 36.3%와 32%의 재분화율을 나타내어 3 mg/L BA처리구가 3 mg/L kinetin 처리구에 비해 유의적인 차이는 없었으나 가장 높은 재분화율을 나타내었다. 그러나 이보다 낮거나 높은 BA와 kinetin 농도 처리구에서는 재분화율이 저하되는 것으로 나타났다. 따라서 오차드그래스 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에는 3 mg/L BA와 1 mg/L 2,4-D를 생장조절물질로 첨가해준 재분화배지를 이용하는 것이 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 최근 화분과 작물의 식물체 재분화에 있어서 BA를 재분화배지에 첨가해주는 것이 재분화율을 개선시킨다는 결과가 화분과 사료작물인 캔터키 블루그래스(Griffin & Dibble, 1995; Van der Valk *et al.*, 1995), 버뮤다그래스(Chaudhury & Rongda, 2000) 밴트그래스(Zhong & Sticklen, 1991) 및 보리(Cho *et al.*, 1998), 등에서도 보고되어 본 실험의 오차드그래스와 유사한 경향을 나타내었다.

Casein hydrolysate와 proline의 첨가효과

오차드그래스의 성숙종자로부터 캘러스유도와 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 casein hydrolysate(CH)와 L-proline의 배양효과를 조사하였다(Table 3). 캘러스유도배지에 CH를 첨가했을 경우의 캘러스 유도율은 무첨가구와 비교했을 때 첨가농도와 상관없이 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 식물체 재분화배지에 첨가해 주었을 경우에는 무첨가구가

36.3%의 재분화율을 나타낸 반면 1 g/L CH 첨가구에서 51.3%의 재분화율을 나타내어 1.4배 정도 증가하였다. 이보다 높은 농도의 3 g/L CH 첨가구에서는 재분화율이 오히려 감소하였다. 한편 proline의 첨가효과를 조사해본 결과 300 mg/L 첨가구에서 캘러스 유도율이 55.7%를 나타내어 무첨가구에 비해 약간 증가하였으며, 재분화율도 52.7%로 약 1.5배 정도 증가되었다. 가장 높은 배양효율을 나타낸 1 g/L CH와 300 mg/L L-proline을 동시에 첨가해준 후의 배양효율을 조사해본 결과 캘러스 유도율은 57.3%로, 식물체 재분화율은 60.7%로 각각 월등히 증가되었다. 이와 같이 배지첨가물질인 CH와 L-proline의 첨가가 화분과 사료작물의 미숙배 또는 성숙종자로부터 캘러스유도와 식물체 재분화에 효과적이라는 보고가 톨페스큐(Bai & Qu, 2001), 수수(Rao *et al.*, 1995; Hagio, 2002)와 캔터키 블루그래스(Griffin & Dibble, 1995) 등에서도 보고된 바 있다.

AgNO₃와 cysteine의 첨가효과

오차드그래스의 종자배양에 있어서 항산화물질의 첨가효과를 조사하기 위하여 silver nitrate(AgNO₃)와 cysteine을 농도별로 단용 또는 혼용첨가한 후의 캘러스 유도율과 재분화율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 캘러스 유도배지에 AgNO₃ 첨가해준 경우의 캘러스 유도율은 무첨가구에 비해 유의적인 증가효과가 관찰되지 않았다. 반면에 식물체 재분화율은 10 mg/L AgNO₃ 첨가구의 경우 69.7%로 무첨가구에 비해 8%정도 증가하였다. Cysteine의 경우 캘러스 유도율은 40 mg/L 첨가구에서 70.7%로 증가되었으나 식물체 재분화율은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이들을 동시에 첨가해 준 경우 캘러스 유도율과 식물체 재분화율이 무첨가구에 비해 10%정도씩 높은 효율을 나타내어 가장 높은 배양 효율을 나타내었다. AgNO₃의 경우 일반적으로 식물체 재분화에 있어서 억제작용

Table 2. Effect of BA and kinetin concentrations on plant regeneration from mature seed-derived calli of orchardgrass.

Growth regulators (mg/L)	Number of calli cultured	Plant regeneration (%) [†]
BA	0	18.7±4.6 ^c
	1	27.7±6.4 ^b
	3	36.3±2.1 ^a
	5	31.7±3.1 ^{ab}
Kinetin	1	28.3±6.1 ^{ab}
	3	32.0±3.6 ^{ab}
	5	16.7±2.5 ^c

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at P<0.05.

[†]Calli were cultured on the plant regeneration medium (N6 basal medium, 1 mg/L 2,4-D) with different concentrations of BA or kinetin.

Table 3. Effect of casein hydrolysate and L-proline on mature seed culture of orchardgrass.

Medium supplement	Callus induction (%)	Plant regeneration (%)
None	47.7±3.8 ^c	36.3±4.2 ^c
Casein hydrolysate 1 g/L	51.3±4.2 ^{abc}	51.3±2.1 ^b
Casein hydrolysate 3 g/L	49.3±3.2 ^{bc}	47.3±5.1 ^b
L-proline 100 mg/L	51.0±2.6 ^{abc}	46.3±4.2 ^b
L-proline 300 mg/L	55.7±4.7 ^{ab}	52.7±2.5 ^b
Casein hydrolysate 1 g/L + L-proline 300 mg/L	57.3±3.1 ^a	60.7±2.5 ^a

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at P<0.05.

[†]Mature seeds were cultured on the callus induction medium (MS basal medium, 3 mg/L 2,4-D) with CH or L-proline.

[‡]Calli were cultured on the plant regeneration medium (N6 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA) with CH or L-proline.

Table 4. Effect of antinecrotic compounds on mature seed culture of orchardgrass.

Antinecrotic compounds	Callus induction (%)	Plant regeneration (%)
None	57.0±2.6 ^c	61.3±3.2 ^c
AgNO ₃ 5 mg/L	58.3±3.5 ^c	62.3±4.0 ^c
AgNO ₃ 10 mg/L	63.3±4.7 ^{bc}	69.7±4.2 ^{ab}
Cysteine 20 mg/L	67.3±2.3 ^{ab}	61.7±3.8 ^c
Cysteine 40 mg/L	70.7±3.8 ^a	64.7±2.1 ^{bc}
AgNO ₃ 10 mg/L+ Cysteine 40 mg/L	68.7±3.1 ^{ab}	71.7±3.8 ^a

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at P<0.05.

[†]Mature seeds were cultured on the callus induction medium (MS basal medium, 3 mg/L 2,4-D, 1 g/L CH, 300 mg/L L-proline) with AgNO₃ or cysteine.

[‡]Calli were cultured on the plant regeneration medium (N6 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L CH, 300 mg/L L-proline) with AgNO₃ or cysteine.

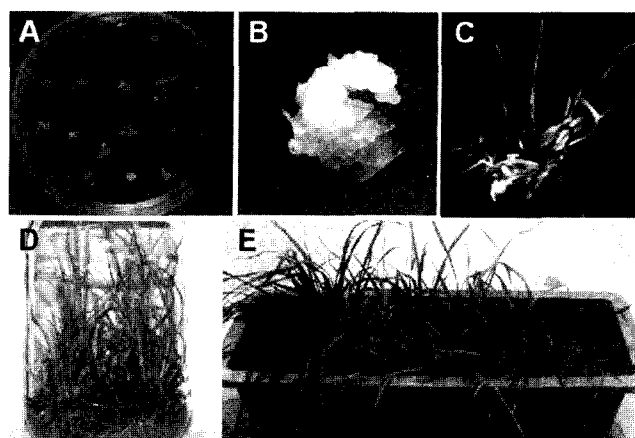


Fig. 1. Plant regeneration from mature seed-derived callus of orchardgrass. A, Calli induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; B, Embryogenic callus formed from a seed; C, Development of shoots cultured in the regeneration medium; D, Regenerated plants on the rooting medium; E, Whole plants grown in pots under green house.

을 나타내는 ethylene의 생리활성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Eapan & George, 1997). Cysteine의 경우 캘러스 배양에 있어서 항산화물질로 작용하여 세포사멸을 방지함으로써 재분화능을 높이는 것으로 알려져 있다(Enriquez-Obregon *et al.*, 1999). 이러한 항산화물질의 첨가에 따른 배양효율의 증가가 조(Vikrant & Rashid, 2002), 옥수수(Songstad *et al.*, 1988) 등에서도 보고된 바 있어서 본 실험의 결과도 이들과 유사한 결과를 나타내었다.

본 실험을 통하여 배지 첨가물질의 종류와 농도 등의 최적 조건을 확립함으로써 종자유래의 캘러스로부터 70% 이상의 재분화율을 나타내는 재분화체계를 확립할 수 있었다. 이러한 최적조건에서 오차드그래스의 성숙종자를 배양했을 때 배발생 능이 높은 캘러스는 캘러스 유도배지에서 배양 3일째부터 형성되기 시작하여 4주 후에는 70% 이상 형성되었으며(Fig. 1A, B), 재분화배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 높은 빈도로 싹이 재분화되었다(Fig. 1C). 재분화된 싹은 1/2 MS로 구성된 rooting 배지에서 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다(Fig. 1D, E). 화분과 사료작물인 오차드그래스는 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 중요한 초종이나 여름철 고온다습과 겨울철 극심한 저온 등의 환경스트레스에 약한 단점이 있어서 환경 스트레스에 강한 품종의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서 개발한 효율적인 식물체 재분화체계는 환경 스트레스 내성 형질 전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

적 요

오차드그래스의 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여

‘Roughrider’ 품종의 성숙종자로부터 최적 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 배지첨가물질의 영향을 조사하였다. 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도시 첨가되는 성장조절 물질로는 3 mg/L 2,4-D가 가장 효율적이었으며, 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 배지에 캘러스를 배양했을 때 36.3%의 재분화율을 나타내었다. 캘러스 유도배지와 재분화배지에 1 g/L의 casein hydrolysate와 300 mg/L의 proline을 동시에 첨가해주었을 때 캘러스 유도율과 재분화율이 각각 57.3%와 60.7%로 증가되었다. 또한 항산화물질로서 10 mg/L의 AgNO₃와 40 mg/L의cysteine을 첨가해준 결과 캘러스 유도율과 재분화율이 각각 68.7%와 71.7%까지 증가되었다. 본 연구를 통하여 확립된 성숙종자로부터 효율적인 배발생 캘러스의 유도 및 식물체 재분화체계는 유전자 형질전환을 통한 신품종 오차드그래스 개발에 유용하게 응용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Bai, Y. and R. Qu. 2001. An evaluation on callus induction and plant regeneration of 25 turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) cultivars. Grass Forage Sci. 55 : 326-330.
- Chaudhury, A. and Q. Rongda. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzy-

- adenine in callus induction medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60(2) : 113-120.
- Cho, M. J., W. Jiang, and P. G. Laumaux. 1998. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci.* 138 : 229-244.
- Chu, C. C., C. S. Wang, C. C. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica.* 18 : 659-668.
- Conger, B. V., G. E. Hanning, D. J. Gray, and J. K. McDaniel. 1983. Direct embryogenesis from methophyll cells of orchardgrass. *Science* 221 : 850-851.
- Conger, B. V., J. C. Hovanesian, R. Trigiano, and D. J. Gray. 1989. Somatic embryo ontogeny insuspension cultures of orchardgrass. *Crop Sci.* 29 : 448-452.
- Eapan, S. and L. Gocorge. 1997. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica species*: Influence of silver nitrate and silver thiosulfate. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51 : 229-232.
- Enriquez-Obregon, G. A., D. L. Prieto-Samsonov, G. A. de la Riva, and R. I. Vanquez-Padron. 1999. Agrobacterium-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 59 : 159-168.
- Griffin, J. D. and M. S. Dibble. 1995. High frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep.* 14 : 721-724.
- Hagio, T. 2002. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 68 : 65-72.
- Horn, M. E., R. D. Shillito, B. V. Conger, and C. T. Harms. 1988. Transgenic plants of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7 : 469-472.
- McKersie, B. D. 1997. Improving forage production systems using biotechnology. In: McKersie BD and Brown DCW (eds), *Biotechnology in Agriculture Series*, No. 17, CAB International, Wallingford, pp. 3-21.
- Miller, D. A. 1984. *Forage crops*. McGraw-Hill, New York, pp. 396-409.
- Murashige T and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473-497.
- Rao, A. M., S. K. Padma, and P. B. Kavi Kishor. 1995. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. *Plant Cell Rep.* 15 : 72-75.
- Songstad, D., D. Duncan, and I. Witholm. 1988. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep.* 7 : 262-265.
- Spangenberg, G., Z. Y. Wang, and Potrykus. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Frankel et al (eds), *Monographs on theoretical and applied genetics*, Vol. 23, Springer Verlag, Heidelberg, pp. 192-210.
- Trigiano, R. N., D. J. Gray, B. V. Conger, and J. K. McDaniel. 1989. Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Botanical Gazette* 150 : 72-77.
- Van der Valk, P., F. Ruis, A. M. Tettelaar-Schrier, and C. M. van der Velde. 1995. Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass, the effect of benzyladenine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40 : 101-103.
- Van Santen, E. and D. A. Sleper. 1996. Orchardgrass. In: Moser LE et al (eds), *Cool-season forage grasses*. Vol 34, ASA, CSSA, and SSSA, Madison WI, pp. 503-534.
- Van Wijk, A. J. P., J. G. Boonman, and W. Rumball. 1993. Achievements and perspectives in the breeding of forage grasses and legumes. In: Baker MJ (eds), *Grasslands for our world*, SIR, Wellington, pp. 116-120.
- Vasilenko, A., J. K. McDaniel, and B. V. Conger 2000. Ultrastructural analyses of somatic embryo initiation, development and polarity establishment from mesophyll cells of *Dactylis glomerata*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 36 : 51-56.
- Vikrant and A. Rashid. 2002. Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69 : 71-77.
- Zhong, H. and M. B. Sticklenn. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds). *Plant Cell Rep.* 10 : 453-456.