韓草誌 (J. Korean Grassl. Sci.) 25(3) : 191~198, 2005

오차드그래스의 종자배양에 있어서 식물생장조절물질과 항산화제가 캘러스유도와 식물체 재분화에 미치는 영향

이기원 · 이상훈 · 이동기 · 우현숙 · 김도현 · 최명석* · 김기용** · 이효신*** · 이병현

Effect of Plant Growth Regulators and Antioxidants on Callus Induction and Plant Regeneration from Seed Culture of Orchardgrass

Ki-Won Lee, Sang-Hoon Lee, Dong-Gi Lee, Hyun-Sook Woo, Do-Hyun Kim, Myung Suk Choi*, Ki Young Kim**, Hyoshin Lee*** and Byung-Hyun Lee

ABSTRACT

In order to optimize tissue culture conditions for genetic transformation of orchardgrass, the effects of culture medium supplements on tissue culture responses were investigated with mature seeds of 3 cultivars, 'Frode', 'Roughrider' and 'Frontier' as explant tissues. Callus induction medium containing 3 mg/L 2,4-D or 3 mg/L dicamba each with 0.1 mg/L BA was optimal for embryogenic callus formation from mature seed and had a strong effect on successive plant regeneration. The regeneration frequency from embryogenic callus among cultivars were descending order of Roughrider > Frode > Frontier. Supplementation of the regeneration media with 10 mg/L $AgNO_3$ and 40 mg/L cysteine enhanced frequency of plant regeneration. Efficient regeneration system established in this study will be useful for molecular breeding of orchardgrass through genetic transformation.

(**Key words** : Callus, Forage crop, Orchardgrass, Regeneration)

Ⅰ. 서 론

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

경상대학교 응용생명과학부(Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)
* 경상대학교 산림자원과학부(Division of Forest Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)
** 농촌진흥청 축산연구소(National Livestock Research Institute, Seunghwan Cheonan 330-801, Korea)
*** 국립산림과학원(Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350)
Corresponding author : Byung-Hyun Lee, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. Tel: 055-751-5418, Fax: 055-751-5410, E-mail: hyun@nongae.gsnu.ac.kr

도로 저하되는 하고현상을 나타내는 단점이 있다. 따라서 이때에 적절한 재배관리를 해주지 못하면 고사되기 쉽고 수량이 급격히 저하된다. 또 다른 단점으로는 내건성과 월동성이 다소 약하며 출수기 이후에는 사료가치가 급격히 저하되는 등의 단점이 있는 것으로 알려져 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 등, 1993). 최근에는 유용유전자의 직접도입을 통하여 사료작물을 분자 육종하고자 하는 많은 연구가 시도되고 있다(McKersie, 1997; Spangenberg 등, 1998). 이러한 유용유전자의 형질전환을 통한 신품종 육종을 위해서는 우선 효율적인 세포배양기술과 식물체 재분화 기술 등의 체계적인 조직배양기술이 확립되어야 한다.

지금까지 보고된 오차드그래스의 조직배양을 통한 식물체 재분화에 관한 연구는 생육중인 잎 조직으로부터 직접 배발생을 통한 재분화에 관한 연구(Conger 등, 1983; Trigiano 등, 1989; Vasilenko 등, 2000), Horn 등(1988)에 의한 현탁배양세포 유래의 원형질체로부터 식물체 재분화 등이 보고된 바 있다. 그러나 이러한 보고들의 재분화 체계는 배양기간이 장기간 소요되고 세포분열이 왕성한 특수한 식물체 조직을 유지해야 하는 등의 번거로움이 있어서 유전자 형질전환의 재료로 이용하기에는 비효율적인 점이 많다.

일반적으로 화본과 목초류의 조직배양에 있어서 캘러스유도 및 식물체 재분화는 다른 쌍자엽식물이나 작물에 비해 다양한 물리화학적 요인에 의해 더 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 품종, 배양조직, 배양배지의 종류 및 조성, 배양환경, 생장조절 물질의 종류와 농도 및 기타 첨가물질 등의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다(George 등, 1987). 이러한 여러 가지 캘러스유도와 식물체 재분화에 미치는 요인들 중에서도 특히 각각의 배지에 첨가되는 생장조절물질과 각종 첨가물질들의 종류와 농도가 가장 중요한 요인 중에 하나로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 재배되고 있는 가장 대표적인 화본과 목초인 오차드그래스의 분자육종을 통한 신품종 개발을 목적으로 우선 효율적인 오차드그래스의 조직배양 체계를 확립하기 위하여 성숙종자로부터 캘러스 배양과 식물체 재분화에 있어서 가장 효율적인 생장조절물질의 조건을 규명하고 항산화물질의 첨가효과를 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자살균

식물재료로는 오차드그래스의 품종 중 'Roughrider', 'Frontier' 및 'Frode' 품종을 사용하였다. 종피를 제거한 성숙종자를 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.

2. 캘러스의 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 캘러스 유도배지는 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 첨가된 MS 기본배지(Murashige & Skoog, 1962)를 사용하였다. 캘러스 유도시의 생장조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도 효율을 조사하기 위하여 상기의 캘러스 유도배지에 생장조절물질로는 auxin으로서 1~5 mg/L

의 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 또는 1~5 mg/L의 dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid)를 첨가하였으며, cytokinin으로서는 0.1 mg/L의 BA(6-benzyladenine)를 단용 또는 혼용 첨가하여 배양효과를 조사하였다.

캘러스 유도배지에 살균된 종자를 100개씩 치상한 다음, 24±2℃의 생장실에서 암 조건으로 4주간 배양한 후, 종자로부터 형성된 캘러스의 비율을 조사하여 비교하였다. 종자로부터 유도된 캘러스는 상기와 동일한 캘러스 유도배지에서 2주 간격으로 계대배양하여 유지하였다.

3. 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위한 기본적인 재분화배지로는 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite가 첨가된 N6 기본배지(Chu 등, 1975)를 사용하였다. 식물체 재분화를 위한 적정 생장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 100개의 캘러스를 생장조절물질과 배지첨가물질이 각각 조합 첨가 된 재분화배지에 옮겨 24±2℃, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대배양한 후, 총 6주 동안 배양하여 각각의 첨가구에서 형성된 신초를 재분화개체로 조사하였다. 재분화된 신초는 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리 발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 생장조절물질의 캘러스 배양효과

오차드그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 생장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 살균된 'Roughrider' 품종의 종자를 1~5 mg/L의 2,4-D 단용첨가 또는 0.1 mg/L의 BA와 혼용 첨가된 캘러스 유도배지에서 배양하였다. 그 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 2,4-D 단용첨가구의 경우 3 mg/L 2,4-D 첨가구가 49.5%의 가장 높은 캘러스 유도율을 보였으며 이보다 낮거나 높은 농도의 2,4-D 첨가구에서는 배양효율이 오히려 감소하였다(Table 1). 한편 BA와의 혼용첨가시의 배양효율을 조사해 본 결과, 3 mg/L 2,4-D와 혼용첨가 했을 때 가장 높은 배양효율을 나타내었으나, 3 mg/L 2,4-D 단

Table 1. Effect of 2,4-D and BA on callus formation from mature seed of orchardgrass (cv. Roughrider)

Growth regulator	Callus formation (%)[a]
1 mg/L 2,4-D	45.3±0.9
1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA	43.2±1.4
3 mg/L 2,4-D	49.5±0.5
3 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA	47.2±0.7
5 mg/L 2,4-D	40.6±1.1
5 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA	35.8±3.5

Values represent the mean±SD of three independent experiments.

[a] Dehusked mature seeds were cultured for 4 weeks on a callus induction medium (MS medium, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite) containing different growth regulators.

Table 2. Effect of dicamba and BA on callus formation from mature seed of orchardgrass (cv. Roughrider)

Growth regulator	Callus formation (%)[a]
1 mg/L dicamba	48.6±1.2
1 mg/L dicamba + 0.1 mg/L BA	43.8±2.1
3 mg/L dicamba	50.9±2.3
3 mg/L dicamba + 0.1 mg/L BA	45.2±1.4
5 mg/L dicamba	40.9±0.4
5 mg/L dicamba + 0.1 mg/L BA	32.5±3.6

Values represent the mean±SD of three independent experiments.
[a] Dehusked mature seeds were cultured for 4 weeks on the callus induction medium containing different growth regulators.

용첨가구에 비해서는 약간 낮은 47.2%의 캘러스 유도율을 나타내었다. 그러나 3 mg/L 2,4-D 단용첨가구에 비해 0.1 mg/L BA와 혼용첨가해 주었을 때가 육안으로 관찰했을 때 조직이 훨씬 더 치밀하고 유백색을 띠는 배발생 캘러스의 비율이 훨씬 더 많이 관찰되었다.

한편 또 다른 auxin으로서 dicamba의 배양효과를 조사하기 위하여 dicamba를 각각 1~5 mg/L의 농도로 단용첨가 또는 0.1 mg/L의 BA와 혼용 첨가된 캘러스 유도배지에서의 배양효과를 조사한 결과는 Table 2와 같이 나타났다. Dicamba의 경우 1 mg/L 첨가구와 3 mg/L 첨가구에 있어서 캘러스 유도율은 비슷하게 나타났으나, 3 mg/L dicamba 첨가구의 캘러스 유도효율이 50.9%로 다소 높게 나타났다(Table 2). 또한 0.1 mg/L BA와의 혼용첨가구의 배양효율은 3 mg/L dicamba 단용첨가구에 비해 캘러스 유도효율이 45.2%로 다소 낮아지는 경향을 나타내었다. 그러나 형태적으로 관찰했을 때 3 mg/L dicamba와 0.1 mg/L BA의 혼용첨가구에서 유도된 캘러스가 배발생 캘러스의 특성을 많이 나타내었다.

최근 화본과 작물의 식물체 재분화에 있어서 저농도의 BA를 캘러스 유도배지에 첨가해 준 상태에서 캘러스를 유도하는 것이 재분화율을 개선시킨다는 결과가 화본과 사료작물인 캔터키 불루그래스(Van der Valk 등, 1995), 버뮤다그래스(Chaudhury & Rongda, 2000) 밴트그래스(Zhong & Sticklen, 1991) 및 보리(Cho 등, 1998), 등에서도 보고되어 본 실험의 오차드그래스의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 이후의 식물체 재분화 실험에는 2,4-D 또는 dicamba와 BA를 혼용첨가한 배지에서 유래한 배발생 캘러스를 사용하였다.

2. 품종별 배양효과

높은 배발생 캘러스 유도율을 보였던 3 mg/L의 2,4-D와 0.1 mg/L BA 혼용첨가구 또는 3 mg/L dicamba와 0.1 mg/L BA 혼용첨가구에서의 오차드그래스의 품종별 캘러스 배양효과와 캘러스로부터 식물체 재분화율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 'Frontier'와 'Roughrider'의 callus 유도효율은 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA 혼용첨가구가 3 mg/L dicamba와 0.1 mg/L BA 혼용첨가구에 비해 높은 배양효율을 나타내었다. 반면에 'Frode' 품종의 경우는 dicamba 첨가구가 2,4-D 첨가구에 비해 약간 높은 효율을 나타내었다. 한편 각각의 생장조절제가 첨가된 배지에서 유도된 배발생 캘러스를 재분화배지에서 6주간 배양하여 형성된 신초의 수로 식물체 재분화율을 조사한 결과, Frontier와 Rough-

Table 3. Effect of cultivar on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of orchardgrass

Cultivar	Growth regulator	Callus formation (%)[a]	Plant regeneration (%)[b]
Frontier	3 mg/L dicamba + 0.1 mg/L BA	33.1±3.1	40.5±2.4
	3 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA	40.1±2.4	44.7±2.1
Roughrider	3 mg/L dicamba + 0.1 mg/L BA	44.8±1.4	53.7±1.1
	3 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA	47.8±0.7	55.3±1.6
Frode	3 mg/L dicamba + 0.1 mg/L BA	42.3±2.2	47.5±0.5
	3 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA	41.8±1.6	46.8±1.7

Values represent the mean±SD of three independent experiments.

[a] Dehusked mature seeds were cultured for 4 weeks on the callus induction medium containing different growth regulators.

[b] Calli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite), and cultured for 6 weeks.

rider의 경우 식물체 재분화율은 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA 혼용첨가구에서 유래된 캘러스의 경우 각각 44.7%와 55.3%로서 3 mg/L dicamba와 0.1 mg/L BA 혼용첨가구에 비해 높은 재분화율을 나타내었다. 반면에 Frode의 경우 3 mg/L dicamba와 0.1 mg/L BA 혼용첨가구 유래의 캘러스의 재분화율이 47.5%로서 2,4-D와 BA 혼용첨가구에 비해 다소 높은 재분화율을 나타내었다(Table 3). 전체적으로는 식물체 재분화율의 경우 'Roughrider'가 가장 높은 효율을 나타내었으며, 'Frode'가 중간정도의 효율을, 'Frontier'가 세 품종 중에서 가장 낮은 효율을 나타내었다. 지금까지 보고된 오차드그래스 'Potomac' 품종의 세포배양의 경우에는 주로 30

Table 4. Effect of antinecrotic compounds on plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass

Cultivar	Growth regulator	Plant regeneration (%)[a]
Frontier	10 mg/L $AgNO_3$	46.9±1.3
	10 mg/L $AgNO_3$ + 40 mg/L cysteine	47.5±0.9
Roughrider	10 mg/L $AgNO_3$	56.8±0.4
	10 mg/L $AgNO_3$ + 40 mg/L cysteine	60.2±1.8
Frode	10 mg/L $AgNO_3$	48.2±4.1
	10 mg/L $AgNO_3$ + 40 mg/L cysteine	50.1±1.6

Values represent the mean±SD of three independent experiments.

[a] Calli were transferred to the regeneration medium containing each antinecrotic compound, and cultured for 6 weeks.

μM의 dicamba가 가장 효과적인 것으로 보고되어(Conger 등, 1989), 본 실험에 있어서 'Frode' 품종과 유사한 결과를 나타내었으나, 'Roughrider'와 'Frontier' 품종의 경우 캘러스 배양과 식물체 재분화율은 2,4-D가 dicamba에 비해 높은 배양효율을 나타내었다. 이러한 배양효율의 차이는 이들 품종간의 genotype 차이에 따른 배양효율의 차이 때문일 것으로 추측된다.

3. $AgNO_3$와 cysteine의 첨가효과

오차드그래스의 종자배양에 있어서 항산화물질의 첨가효과를 조사하기 위하여 silver nitrate ($AgNO_3$)와 cysteine을 단용 또는 혼용첨가한 후의 캘러스 유도율과 재분화율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 식물체 재분화배지에 10 mg/L $AgNO_3$ 첨가해 준 경우의 식물체 재분화율은 무첨가구에 비해(Table 3) 1~2%씩 증가하였다. 또한 10 mg/L $AgNO_3$와 40 mg/L cysteine를 동시에 첨가해 준 경우 식물체 재분화율이 10 mg/L $AgNO_3$ 단용첨가구에 비해 모든 품종에서 더 높은 재분화 효율을 나타내었다(Table 4). 이러한 결과는 식물조직배양에 있어서 항산화물질로 사용되고 있는 $AgNO_3$와 cysteine이 품종과는 상관없이 재분화효율을 개선시키는 효과가 있음을 나타낸다. 본 실험에 사용된 $AgNO_3$의 경우 일반적으로 식물체 재분화에 있어서 저해작용을 나타내는 ethylene의 생리활성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Eapan과 George, 1997). Cysteine의 경우 캘러스 배양에 있어서 항산화물질로 작용하여 세포사멸을 방지함으로서 재분화능을 높이는 것으로 알려져 있다(Enriquez-Obregon 등, 1999). 이러한 항산화물질의 첨가에 따른 배양효율의 증가가 조(Vikrant & Rashid, 2002), 옥수수(Songstad 등, 1988) 등에서도 보고된 바 있으며 본 실험의 결과도 이들과 유사한 결과를 나타내었다.

본 실험을 통하여 배지 첨가물질인 생장조절물질과 항산화물질의 종류와 농도 등의 최적조건을 확립함으로서 종자유래의 캘러스로부터 높은 재분화율을 나타내는 재분화체계를 확립하였다. 이러한 조건에서 오차드그래스의 성숙종자를 배양했을 때 배발생 캘러스가 높은 빈도로 형성되었으며(Fig. 1A, B), 재분화배지에서 6주 배양한 결과 신초가 재분화 되었다(Fig. 1C, D). 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 rooting 배지에서 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다(Fig. 1E, F). 본 연구에서 개발한 효율적인 식물체 재분화체계는 하고현상 등과 같은 환경

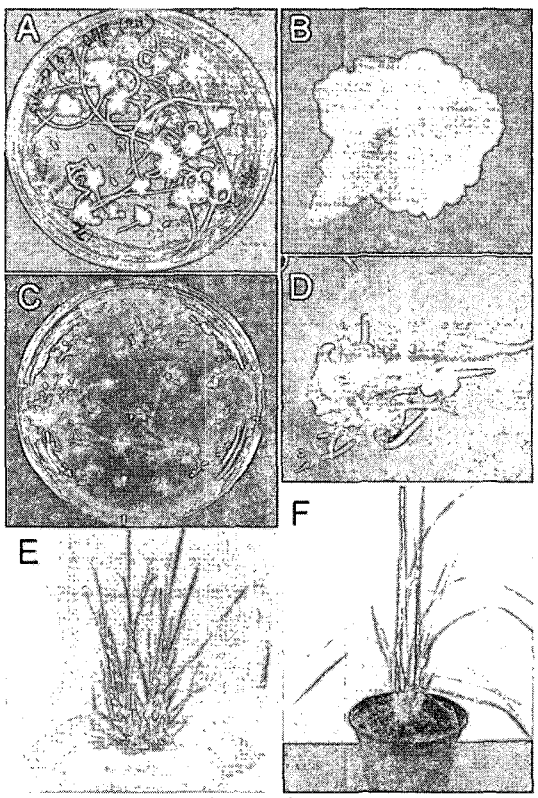

Fig. 1. Plant regeneration from mature seed-derived callus of orchardgrass.

A, Calli induced from mature seeds cultured on the callus induction medium containing 3 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA; B, Embryogenic callus formed from a seed; C and D, Development of shoots cultured in the regeneration medium; E, Regenerated plants on the rooting medium; F, Whole plants grown in pots under green house.

스트레스에 대해 내성을 가지는 오차드그래스 개발 등에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

Ⅳ. 요 약

오차드그래스의 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 3가지 품종의 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 배지첨가물질의 영향을 조사하였다. 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도시 첨가되는 생장조절물질로는 3 mg/L 2,4-D 또는 dicamba와 0.1 mg/L BA를 혼용첨가했을 때가 단용첨가구에 비해 높은 배발생 캘러스 유도효율을 나타내었다. 품종별 식물체 재분화 효율은 'Roughrider'가 가장 높게 나타났으며, 'Frode'가 중간정도, 'Frontier'가 가장 낮은 효율을 나타내었다. 식물체 재분화배지에 항산화물질로서 10 mg/L의 $AgNO_3$와 40 mg/L의 cysteine을 첨가해준 결과 식물체 재분화율이 증가되었다. 본 연구를 통하여 확립된 오차드그래스의 효율적인 조직배양체계는 유전자 형질전환을 통한 신품종 오차드그래스 개발에 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

Ⅴ. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

Ⅵ. 인 용 문 헌

1. Chaudhury, A. and Q. Rongda. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60(2):113-120.
2. 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.
3. Chu, C.C., C.S. Wang, C.C. Sun, C. Hsu, K. 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. Scienta Sinic. 18:659-668.
4. 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.
5. Conger, B.V., J.C. Hovanesian, R. Trigano and D.J. Gray. 1989. Somatic embryo ontogeny in suspension cultures of orchardgrass. Crop Sci. 29: 448-452.
6. Eapan, S. and L. George. 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.
7. Enriquez-Obregon, G.A. Prieto-Samsonov, D.L. 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.
8. George E.F., D.J.M. Puttock and H.J. George. 1987. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plants growing *in vitro*. Plant Cell Tissue Cult. Org. Cult. 30:171-179.
9. 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.
10. McKersie, B.D. 1997. Improving forage production systems using biotechnolgy. In: McKersie B.D. and D.C.W. Brown (eds), Biotechnology in Agriculture Series, No. 17, CAB International, Wallingford, pp. 3-21.
11. Miller, D.A. 1984. Forage crops. McGraw-Hill, New York, pp. 396-409.
12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.
13. Songstad, D., D. Duncan and I. Witholm. 1988. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiane on plant regeneration from maize callus cultures. Plant Cell Rep. 7:262-265.

14. Spangenberg, G., Z.Y. Wang and I. Potrykus. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Frankel et al (eds), Monographs on theoratical and applied genetics, Vol. 23, Springer Verlag, Heidelberg, pp.192-210.
15. 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.
16. 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.
17. Van Santen, E. and D.A. Sleper. 1996. Orchardgrass. In: Moser L.E. et al (eds), Cool-season forage grasses. Vol 34, ASA, CSSA, and SSSA, Madison WI, pp. 503-534.
18. Van Wijk, A.J.P., J.G. Boonman and W. Rumball. 1993. Achievements and prospectives in the breeding of forage grasses and legumes. In: Baker M.J. (ed), Grasslands for our world, SIR, Wellington, pp. 116-120.
19. 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.
20. 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.
21. Zhong, H. and M.B. Sticklenn. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds). Plant Cell Rep. 10:453-456.