

# 식물생장조절물질과 배지첨가물질이 켄터키 블루그래스의 식물체 재분화에 미치는 영향

이상훈 · 이기원 · 김도현 · 이동기 · 원성혜 · 김기용\* · 이병환

## Effect of Plant Growth Regulators and Medium Supplements on Plant Regeneration of Kentucky Bluegrass

Sang-Hoon Lee, Ki-Won Lee, Do-Hyun Kim, Dong-Gi Lee, Sung-Hye Won, Ki Yong Kim\* and Byung-Hyun Lee

### ABSTRACT

To optimize tissue culture responses for genetic transformation of Kentucky bluegrass, the effects of culture medium supplements on tissue culture responses were investigated with mature seeds of a cultivar 'Newport' as explant tissues. The optimal concentration of 2,4-D (2,4-dichloro phenoxy acetic acid) for the induction of embryogenic callus from mature seed was 3 mg/L. Plant regeneration frequency was 54% when embryogenic callus was cultured on the regeneration medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 3 mg/L of BA (6-benzyladenine). Addition of 1 g/L of casein hydrolysate and 500 mg/L of L-proline improved frequencies of embryogenic callus induction and plant regeneration up to 60.8% and 58.3%, respectively. Regenerated plants were grown normally when shoots transplanted to the soil. A rapid and efficient plant regeneration system established in this study. We suggest that the results may be useful for molecular breeding of Kentucky bluegrass through genetic transformation.

(Key words : Callus, Plant regeneration, Kentucky bluegrass, Casein hydrolysate, L-proline)

### I. 서 론

켄터키 블루그래스 (*Poa pratensis* L.)는 다년생의 화본과 목초로서 추위에 강하여 겨울철 목초용으로 많이 이용되고 있다. 또한 내음성이 비교적 우수하여 음지에서 잘 자라며, 엽질이 부드럽고 재생속도가 빨라 최근에는 토양 침식 방지용이나 골프장 등의 잔디용으로도 널리 재배되고 있다. 그러나 생육온도가 15~20℃

의 한지형 목초인 켄터키 블루그래스는 더위에 약하여 우리나라에서 재배할 경우 고온 건조한 여름철에는 하고현상을 나타내어 생육이 나쁘고 병충해의 발생이 급격히 증가하여 수량이 감소하는 단점이 있다.

이러한 단점을 보완하기 위해 지금까지 자연계에 존재하는 우수형질을 가진 품종을 선발하고 교잡에 의해 유용한 유전형질을 고정시키는 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되

경상대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부 낙농학전공

\* 축산연구소 조사료지원과

Corresponding author : Byung-Hyun Lee, Major of Dairy Science, Division of Applied Life Science, College of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Tel: +82-55-751-5418, Fax: +82-55-751-5410, E-mail: hyun@gsnu.ac.kr

어 왔다(Van Wijk 등, 1993). 그러나 켄터키 블루그래스는 번식에 있어 단위생식도 하기 때문에 이수체가 고정되어 염색체수가  $2n=28-154$ 로 변이가 큰 점 등으로 인하여 전통적인 육종법을 이용한 유전적 개량에 어려움이 있다(Ke와 Lee, 1996). 최근에는 유용유전자 도입을 통한 사료작물의 신품종 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다(McKersie, 1997; Spangenberg 등, 1998). 이러한 유용유전자의 형질전환에 의한 신품종 사료작물의 분자육종을 위해서는 먼저 단기간 내에 높은 재분화율을 나타내는 효율적인 조직배양 기술체계가 확립되어야 한다(Forster와 Spangenberg, 1999).

지금까지 켄터키 블루그래스의 조직배양은 미숙화서를 이용한 식물체 재분화(Van der Valk 등, 1989)와 현탁배양세포로부터 식물체 재분화에 관한 연구(Nielson과 Knudsen, 1993) 성숙종자를 이용한 식물체의 재분화에 관한 연구(McDonnell와 Conger, 1984; Boyd와 Dale, 1986; Griffin와 Dibble, 1995; Van der Valk 등, 1995) 등이 보고되었다. 그러나 식물체의 재분화율이 비교적 낮고 체계적인 재분화 조건이 확립되어 있지 않아 식물체 재분화에 장기간의 배양기간이 소요되는 등의 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 켄터키 블루그래스의 조직배양 효율 향상에 있어 여러 가지 물리적이고 화학적인 요인에 의해 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 성장조절물질, 탄소원의 종류 및 배지 내 첨가물질의 조성 등에 대한 일련의 연구를 통해 성숙종자로부터 캘러스를 유도하여 단기간 내에 완전한 식물체로 재분화시킬 수 있는 효율적인 재분화 시스템을 확립하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자소득

식물재료로는 켄터키 블루그래스의 Newport 품종을 사용하였다. 캘러스 유도를 위한 종자

의 살균은 Lee 등(2004)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 30초간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 5% sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 완전히 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

### 2. 배발생 캘러스 유도 및 식물체의 재분화

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본배지는 MS(Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 3 mg/L 2,4-D (2,4-dichloro phenoxy acetic acid), 0.1 mg/L BA (6-benzyladenine), 1 mg/L thiamine-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose와 3 g/L Gelrite를 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음,  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 생장실에서 약광조건으로 4주간 배양하였다. 캘러스 형성능은 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었고 1개의 종자로부터 형성된 캘러스의 생체중을 3반복으로 조사하여 비교하였다.

식물체 재분화를 위한 기본배지는 N6(Chu 등, 1975) 기본배지에 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 mg/L thiamine-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose와 3 g/L Gelrite를 첨가한 배지를 사용하였다. 8주령의 배발생 캘러스를 재분화 배지에 옮겨  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 배지에 1회 계대배양한 후, 총 6주간 배양하여 형성된 2 cm 이상으로 자란 shoot을 재분화개체로 조사하였다. 식물체 재분화율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다. 재분화 된 shoot은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

### 3. 성장조절제의 종류에 따른 배발생 캘러스 유도효율

캘러스 유도시의 성장조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도효율을 조사하기 위하여 캘러스 유도배지에 성장조절물질로는 auxin류로 2,4-D, dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid), NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid) 및 IAA (indole acetic acid)와 cytokinin류로 BA를 단독 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C의 성장실에서 약광조건으로 4주간 배양하였다.

### 4. 탄소원 종류에 따른 배양효과

성숙종자로부터 캘러스 유도배지와 식물체 재분화 배지에 에너지원으로 첨가되는 탄소원의 종류별 배양효과를 조사하기 위하여 캘러스 유도배지 및 재분화 배지에 sucrose, maltose, glucose 및 sorbitol을 각각 30 g/L 농도로 배지에 첨가하여 배양한 후, 상기와 동일한 방법으로 캘러스의 유도효율과 식물체의 재분화율을 각각 조사하였다.

### 5. 첨가물질에 따른 배양효과

배지첨가물질의 효과를 조사하기 위하여 casein hydrolysate 및 L-proline을 각각 캘러스 유도배지와 재분화배지에 농도별로 첨가하여 첨가물질에 따른 배양효과를 조사하였다. 캘러스 유도배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 상기와 동일한 방법으로 캘러스의 유도효율과 식물체의 재분화율을 각각 조사하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양 효율

기내배양을 통한 캘러스 유도는 식물의 종에 따라 또는 식물체내에서도 배양에 이용되는 성장조절물질 및 배양조건과 방법 등에 따라 그 양상이 달라진다. 켄터키 블루그래스 Newport 품종의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 최적의 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 조사하기 위하여 여러 가지 auxin을 종류별로 다양한 농도로 첨가한 배지에서 캘러스 유도효율을 조사한 결과 Table 1과 같이 나타났다.

배발생 캘러스의 유도율은 2,4-D와 dicamba 처리구가 NAA 또는 IAA 첨가구보다 전체적으로 높은 효율을 보였으며 캘러스의 증식속도도 비교적 우수하였다. 2,4-D 처리구의 경우 3 mg/L 농도로 첨가해 주었을 때 58.3%의 가장 높은 캘러스 유도율을 나타내었으며 종자 한 개당 형성된 캘러스의 생체중도 약 74 mg으로 가장 높게 나타났다. 한편, 2,4-D 첨가농도가 낮아질수록 캘러스 유도효율이 조금씩 감소하였으며 shoot가 형성되는 경향을 보였으며, 이 보다 높은 농도에서는 캘러스가 갈변하면서 고사하는 현상을 보였다. Dicamba 처리구의 경우도 캘러스 유도율은 3 mg/L에서 56.6%로 가장 높았으며 캘러스 생체중은 dicamba 농도가 증가할수록 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. NAA와 IAA 처리구에서는 전체적으로 캘러스 유도율이 낮았고 종자 한 개당 유도된 캘러스 생체중도 2,4-D와 dicamba 처리구에 비해 낮은 경향을 보였다.

한편 auxin 단독처리구에서 가장 높은 효율을 보였던 2,4-D와 0.1-1 mg/L의 BA를 혼용처리했을 때의 캘러스 유도효율과 식물체 재분화율을 조사한 결과 Table 2와 같다. 배지내에 첨가되는 BA 농도가 증가할수록 캘러스 유도율은 조금씩 감소하였지만 식물체로의 재분화율은 증가하는 경향을 보였다. 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L의 BA를 첨가하여 배양했을 때 3 mg/L의 2,4-D 단독 처리구에 비해 캘러스 유도율은 감소하였으나 형성된 캘러스는 형태적으

Table 1.. Effect of different concentrations of auxins on callus formation from mature seeds of Kentucky bluegrass

Auxins (mg/L)	No. of seeds tested	No. of callus induced	Callus formation (%)	Callus fresh weight (mg)**
2,4-D	0	60	0	0 <sup>e</sup>
	1	120	46	37±2.2 <sup>d</sup>
	2	120	47	39.2
	3	120	70	58.3
	4	120	59	49.1
	5	120	40	33.3
Dicamba	0	60	0	0 <sup>f</sup>
	1	120	43	54±1.5 <sup>e</sup>
	2	120	45	37.5
	3	120	68	56.6
	4	120	57	47.5
	5	120	36	30.0
NAA	0	60	0	0 <sup>f</sup>
	1	120	40	21±1.8 <sup>e</sup>
	2	120	41	34.2
	3	120	36	30.0
	4	120	31	25.8
	5	120	28	23.3
IAA	0	60	0	0 <sup>d</sup>
	1	120	36	22±2.5 <sup>c</sup>
	2	120	31	25.8
	3	120	29	24.2
	4	120	27	22.5
	5	120	20	16.7

\* Mature seeds were cultured on MS medium containing 0-5 mg/L auxins, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose and 3 g/L Gelrite, and cultured for 4 weeks.

\*\* Values represent mean of callus fresh weight formed from one seed.

Different superscripts of same row indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

Table 2. Effect of 2,4-D and BA on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Kentucky bluegrass

Growth regulators (mg/L)		No. of seeds transferred	Callus formation (%)	Plant regeneration (%)
2,4-D	BA			
0	—	60	0	0
1	—	120	40.0±2.3 <sup>b</sup>	42.0±1.3 <sup>a</sup>
3	—	120	59.1±2.1 <sup>a</sup>	38.0±1.2 <sup>b</sup>
5	—	120	34.1±0.9 <sup>c</sup>	26.0±2.0 <sup>c</sup>
3	0.1	120	57.5±1.3 <sup>a</sup>	54.0±2.6 <sup>a</sup>
3	0.5	120	50.8±0.7 <sup>b</sup>	47.0±1.7 <sup>b</sup>
3	1.0	120	28.3±4.0 <sup>c</sup>	37.0±0.8 <sup>c</sup>

로도 우수하였고 조직적으로 치밀하며 유백색을 띤 배양생 캘러스가 가장 많이 형성되었다. 반면, 식물체 재분화율은 3 mg/L의 2,4-D 단용처리구에서는 38%의 재분화율을 보였지만 0.1 mg/L의 BA와 혼용처리구에서는 54%의 재분화율로 1.4배 정도 급격히 증가하였다. 그러나, 1 mg/L 이상의 고농도의 BA가 첨가된 처리구에서는 캘러스 형성능이 급격히 저하하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 켄터키 블루그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와 농도가 캘러스의 증식뿐만 아니라 식물체로의 재분화율에도 많은 영향을 미친다는 것을 의미한다. 최근 화분과 작물에 있어서 BA를 첨가해주는 것이 재분화율을 개선시킨다는 결과가 버뮤다그래스 (Chaudhury와 Rongda, 2000), 밴트그래스 (Zhong과 Sticklen, 1991) 및 보리 (Cho 등, 1998) 등에서도 보고 된 바 있다.

2. 탄소원의 종류에 따른 배양효율

성숙종자로부터 캘러스 유도과 식물체 재분화 배지에 에너지원으로 첨가되는 탄소원의 종류에 따른 배양효과를 조사한 결과 Table 3과 같다. 캘러스 유도에는 3%의 sucrose를 첨가했을 때 58.3%의 가장 높은 캘러스 유도율을 나타내었으며, 다음으로 maltose 첨가구가 57.5%의 유도율을 보였고, glucose와 sorbitol의 경우는 25.0%와 20.8%의 비교적 낮은 캘러스 유도율을 각각 나타내었다. 반면에 식물체 재분화율

은 maltose 첨가구가 54%로 가장 높은 효율을 나타내었으며 sucrose 첨가구가 52%, glucose가 31% 그리고 sorbitol 첨가구가 21%로 가장 낮은 효율을 나타내었다. 특히 maltose 첨가구의 경우 재분화율도 가장 높았을 뿐만 아니라 캘러스당 재분화 식물체의 수도 가장 많은 경향을 나타내었다.

기내배양 된 다양한 식물에서 탄소원은 에너지원으로 역할 뿐만 아니라 삼투압 조절을 통한 세포와 조직, 기관의 성장과 잎과 뿌리 등의 형성에 관여한다고 알려져 있다 (Karhu, 1997). 일반적으로 Sucrose는 식물의 조직배양에서 가장 많이 사용되는 탄소원으로 (Fuentes 등, 2000) 알려져 있으나 회분과 작물의 미성숙 배 또는 성숙종자로부터 캘러스 유도와 식물체 재분화에 maltose 첨가가 효과적이라는 보고가며 (Gabriela, 2002)와 밴트그래스 (Yoshito 등, 1994) 등에서도 보고 된 바 있다. 이러한 결과는 적정 성장 조절제와 배지조건에서 배양하더라도 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류가 재분화 효율에 미치는 영향이 매우 크다는 것을 의미한다.

3. Casein hydrolysate와 L-proline 첨가에 따른 배양효율

켄터키 블루그래스의 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 casein hydrolysate (CH)와 L-proline의 배양효과를 조사한 결과 Table 4와 같다. 식물체 재분화 배지에 CH를 첨가해 주

Table 3. Effect of different carbon sources on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Kentucky bluegrass

Carbon sources	No. of seeds transferred	Callus formation (%)	No. of calli transferred	Plant regeneration (%)
Sucrose	120	58.3±0.8 <sup>a</sup>	100	52.0±1.4 <sup>a</sup>
Maltose	120	57.5±1.2 <sup>a</sup>	100	54.0±1.9 <sup>a</sup>
Glucose	120	25.0±3.0 <sup>b</sup>	100	31.0±2.1 <sup>b</sup>
Sorbitol	120	20.8±3.7 <sup>b</sup>	100	21.0±3.4 <sup>c</sup>

Table 4. Effect of casein hydrolysate and L-proline on mature seed culture of Kentucky bluegrass

Medium supplement	Callus induction (%)	Plant regeneration (%)
None	50.2±1.1 <sup>bc</sup>	46.3±0.8 <sup>d</sup>
Casein hydrolysate 1 g/L	54.3±1.6 <sup>b</sup>	55.2±2.4 <sup>b</sup>
Casein hydrolysate 2 g/L	52.0±1.9 <sup>b</sup>	46.2±1.7 <sup>cd</sup>
L-proline 250 mg/L	49.9±2.1 <sup>c</sup>	48.3±1.5 <sup>c</sup>
L-proline 500 mg/L	55.7±2.3 <sup>b</sup>	56.6±2.2 <sup>ab</sup>
Casein hydrolysate 1 g/L + L-proline 500 mg/L	60.8±4.1 <sup>a</sup>	58.3±2.9 <sup>a</sup>

지 않았을 경우에는 46.3%의 재분화율을 나타낸 반면, 1 g/L CH 첨가구에서 55.2%의 재분화율을 나타내었다. 이보다 높은 농도의 2 g/L CH 첨가구에서는 캘러스가 갈변화 되는 현상이 나타나 재분화율이 오히려 감소하였다. 한편 L-proline의 첨가효과를 조사해본 결과 500 mg/L 첨가구에서 캘러스 유도율이 55.7%를 나타내어 무첨가구에 비해 5.5% 증가하였으며, 재분화율도 56.6%로 약 1.2배 정도 증가되었다. 가장 높은 배양효율을 나타낸 1 g/L CH와 500 mg/L L-proline을 동시에 첨가해준 후의 배양효율을 조사해본 결과 캘러스 유도율은 60.8%로 식물체 재분화율은 58.3%로 각각 월등히 증가되었다. 이와 같이 배지 첨가물질인 CH와 L-proline의 첨가가 화분과 사료작물의 미성숙 배 또는 성숙종자로부터 캘러스 유도도와 식물체 재분화에 효과적이라는 보고가 툴 페스큐(Bai와 Qu, 2001)와 수수(Rao 등, 1995; Hagio, 2002) 등에서도 보고 된 바 있다.

CH는 식물의 조직 배양에서 유기질소원으로 많이 이용되고 있으며, 무기질소원 보다 조직에 쉽게 흡수될 수 있어 조직의 발달과 분화에 매우 중요한 역할을 한다(Schuller 등, 2000). 식물의 조직배양에서 CH와 L-proline의 첨가는 배발생 캘러스 형성에 좋은 효과를 나타내어 식물체의 재분화율에도 상당한 영향을 주고 있음을 알 수 있다.

본 실험을 통하여 생장조절물질의 종류와 농

도, 탄소원의 종류, 배지 첨가물질의 종류와 농도 등의 최적조건을 확립함으로써 종자유래의 캘러스로부터 고효율 재분화 체계를 확립할 수 있었다. 이러한 최적조건에서 켄터키 블루그래스의 성숙종자를 배양했을 때 배 발생능이 높은 캘러스는 캘러스 유도배지에서 배양 4일째부터 형성되기 시작하여 6주 후에는 50% 이상 형성되었으며, 재분화 배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 높은 빈도로 신태가 재분화되었다.

#### IV. 요약

켄터키 블루그래스의 최적 조직 배양조건을 확립하기 위하여 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 배지 첨가물질의 영향을 조사하였다. 배발생 캘러스 유도시 첨가되는 auxin으로는 3 mg/L 2,4-D 처리구에서 58.3%로 캘러스 유도율이 가장 높았으며, 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L의 BA를 첨가하여 배양했을 때 형성된 캘러스는 형태적으로도 우수하였고 조직적으로 치밀하며 유백색을 띤 배발생 캘러스가 가장 많이 형성되었으며 54%의 재분화율을 나타내었다. 성숙종자를 배양함에 있어 탄소원으로는 캘러스 유도배지 30 g/L sucrose, 재분화배지에 30 g/L maltose를 첨가해 주었을 때 효율이 증가되었다. 성숙종자를 배양함에 있어 첨가물질로 캘러스 유도배지와 재

분화 배지에 1 g/L의 casein hydrolysate와 500 mg/L의 L-proline을 동시에 첨가해주었을 때 캘러스 유도율과 재분화율이 각각 60.8%와 58.3%로 증가되었다. 본 연구를 통하여 확립된 효율적인 배발생 캘러스의 유도 및 식물체 재분화 체계의 확립은 *Agrobacterium*을 이용한 켄터키 블루그래스의 형질전환에 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 사 사

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

## VI. 인용 문헌

- Bai, Y. and R. Qu. 2000. An evaluation on callus induction and plant regeneration of 25 turf-type tall fescue(*Festuca arundinacea* Schreb.) cultivars. Grass Forage Sci. 55:326-330.
- Boyd, L.A., P.J. Dale. 1986. Callus production and plant regeneration from mature embryo of *Poa pratensis* L. Plant Breeding. 97:246-254.
- 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: 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 Sinic. 18:659-668.
- Gabriela T.T., M.A. Uriel, S.M. Guadalupe, D.J.S. Antonia, M.B. Blanca, R.M. Mario and J.A. Antonio. 2002. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 68:65-72.
- 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. Adevetitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 68:65-72.
- Ke, S. and C.W. Lee. 1996. Plant regeneration in Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.) via coleoptile tissue cultures. Plant Cell Rep. 15:882-887.
- Karhu, S.T. 1997. Sugar use in relation to shoot induced by sorbitol and cytokinin in apple. J Am Soc Hort Sci. 122:476-480.
- Lee, S.-H., D.-G. Lee, H.-S. Woo and B.-H. Lee. 2004. Development of transgenic tall fescue plants from mature seed-derived callus via *Agrobacterium*-mediated transformation, Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17:1390-1394.
- McDonnell, R.E. and B.V. Conger. 1984. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass. Crop Sci. 24:573-578.
- McKersie, B.D. 1997. Improving forage production systems using biotechnology In: McKersie, B. D. and Brown, D. C. W. (Eds), Biotechnology in Agriculture Series, No. 17, CAB International, Wallingford, p. 3.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473-497.
- Nielsen, K.A. and E. Knudsen. 1993. Regeneration of green plants from embryogenic suspension culture of kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Plant Cell Rep. 12:537-540.
- 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.
- Schuller A, Kirchner-NeB. R and G. Reuther. 2000. Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult. 60:23-31.
- Spangenberg, G., Z.Y. Wang and I. 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, p. 192.
19. 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.
  20. Van der Valk P, Zaal MACM, J. Creemers-Molenaar. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus cultures of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass). *Plant Cell Rep.* 7:644 - 647.
  21. 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. (Eds), *Grasslands for our world*, SIR, Wellington, p. 116.
  22. Yoshito, A., I. Yasuyuki, O. Mad, S. Kiyoyuki and F. Azusa. 1994. Improved regeneration response of creeping bentgrass and japonica rice by maltose and lactose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 39:101-103.
  23. Zhong, H. and M.B. Sticklen. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds). *Plant Cell Rep.* 10:453-456.