

# 국내개발 이탈리아 라이그라스 품종 성숙종자의 식물체 재분화

김경희 · 김용구 · 허성현 · 이기원<sup>1</sup> · 이병현

## Plant Regeneration From Mature Seed of Domestic Italian Ryegrass Cultivar

Kyung-Hee Kim, Yong-Goo Kim, Sung Hyun Heo, Ki-Won Lee<sup>1</sup> and Byung-Hyun Lee

### ABSTRACT

In order to improve forage characteristics of Italian ryegrass by genetic transformation, an efficient callus induction from mature seed and optimal plant regeneration system were established using a domestic cultivar 'Kospeed'. Addition of 5 mg/L of 2,4-D showed highest frequency of embryogenic callus induction from mature seeds. N6 medium showed higher frequency of both callus induction and plant regeneration as compared with MS and SH medium. The highest plant regeneration frequency 67% was obtained when embryogenic calli were transferred to N6 medium containing 1 mg/L 2,4-D and 5 mg/L BA. Supplementation of regeneration medium with sucrose at 30 g/L level maximized regeneration frequency as compared to the other concentrations. These data would be very helpful for molecular breeding of domestic Italian ryegrass cultivar through genetic transformation.

(Key words : Forage crop, Italian ryegrass, Kospeed, Plant regeneration)

### I. 서 론

최근 국내에 많이 보급되어 재배되기 시작한 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum*)는 원래 유럽 및 아시아의 온대지역에 널리 분포하는 일년생 또는 월년생 사료작물로서 전 세계적으로도 널리 재배되고 있는 목초 중의 하나이다 (Hides 등, 1993; Isselstein, 1993). 국내에서는 중남부 이남 지역에서 많이 재배되고 있으며, 사료가치가 높고 가축의 기호성과 소화율이 좋아서 가축에게 급여하면 생산성이 좋아진다. 특히 당분함량이 높아서 청예이용, 방목

이용, 건초조제, 사일리지 조제이용 등 다양한 형태로 급여할 수 있는 재배가치가 높은 사료작물 중에 하나이며 최근에는 바이오에너지 작물로도 활용되고 있다 (Park 등, 1987). 그러나 이러한 장점에도 불구하고 이탈리아 라이그라스는 추위와 같은 환경재해에 견디는 힘이 약하고 도복에 약한 단점을 가지고 있다 (Choi 등, 2000). 최근 이러한 단점을 보완하기 위해 국내의 경우 국립축산과학원을 중심으로 겨울철 기온이 낮아 월동이 어려웠던 중북부지방에서도 재배가 가능한 내한성 품종들이 전통육종법인 선발 및 합성품종육종법에 의해 개발되기

경상대학교 응용생명과학부 동물생명과학과 (Dept. of Animal Biosciences, IALS, PMBBRC, Division of Applied Life Sciences (BK21), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 331-801, Korea)

Corresponding author : Byung-Hyun Lee, IALS, PMBBRC, Division of Applied Life Science (BK21), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. Tel: 055-772-1882, E-mail: hyun@gnu.ac.kr

시작하여, 화산, 코윈어리, 코윈마스터, 코그린, 코스피드 등과 같은 신품종이 개발되어 왔다 (최 등, 2008). 한편 이러한 전통육종법과 더불어 유용유전자의 도입을 통한 분자육종법을 이용하여 환경재해내성이나 기능성이 부가된 신품종 목초를 개발하기 위한 연구가 많이 시도되고 있다 (Spangenberg 등, 1998). 이러한 형질 전환기술을 이용한 신품종 목초를 개발하기 위해서는 먼저 단기간 내에 재현성이 높은 안정적인 조직배양 기술체계가 선행되어야 한다 (Forster와 Spangenberg, 1999). 대부분의 모든 화본과 식물의 조직배양법과 마찬가지로 지금까지의 이탈리아 라이그라스의 재분화에 관한 연구도 배주배양을 통한 식물체 재분화 (Kumlehn과 Nitzsche, 1995), 미성숙 배 (Dale, 1980) 및 미성숙 화서 (Creemers-Molenaar 등, 1988) 등을 이용한 배발생 및 식물체 재분화에 관한 연구 등과 같이 식물생장기의 특정시기에만 얻을 수 있는 시료조직을 이용함으로써 많은 시간적 제약이 있었다.

따라서 연중 어느 때나 활용할 수 있는 성숙종자로부터 캘러스를 유도하고 식물체를 재분화시킬 수 있는 시스템을 확립하는 것은 급후 신품종 분자육종을 위해서는 필수적이라 할 수 있다. 국내에서 중남부 지역에 널리 재배 가능한 코스피드와 같은 국내개발 품종에 형질전환 기술을 이용하여 다양한 재해내성 유전자 또는 가축생산성 향상관련 기능성 유전자 도입 등을 통해 신품종을 개발한다면 국내 자급조사료 확보에도 크게 기여할 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서는 유용유전자의 형질전환을 통한 실용화 가능한 형질전환 이탈리아 라이그라스를 개발할 목적으로 국내에서 개발되고 농가에 많이 재배되고 있는 이탈리아 라이그라스 품종을 이용하여 우선 연중 안정적인 시료확보가 가능한 성숙종자로부터의 효율적인 캘러스 배양 및 식물체 재분화 체계를 확립하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자살균

식물재료로는 국내에서 개발되어 농가에 보급되고 있는 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.) 품종 중 코스피드 (Kospeed) 품종을 사용하였다. 종자 살균은 Lee 등 (2003)의 방법에 준하여 실시하였으며, 살균한 종자는 멸균수로 3회 세정한 후 멸균된 filter paper에 옮겨 물기를 제거하고 캘러스 유도배지에 옮겨 치상하였다.

### 2. 성숙종자로부터 캘러스 배양

캘러스 유도배지는 5 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 함유된 N6 배지 (Chu 등, 1975)를 사용하였다. 캘러스 유도시의 성장 조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도 효율을 조사하기 위하여 상기의 캘러스 유도배지에 auxins과 cytokinin을 단용 또는 혼용하여 첨가한 배지를 사용하였다. 최초 2주간 배양한 후 형성된 캘러스 조직만을 취하여 새 배지로 계대하여 4주간 배양하여 형성된 캘러스의 생체중을 3반복으로 조사하였다. 성숙종자로부터 캘러스유도 및 식물체 재분화에 미치는 기본배지의 종류에 따른 배양효과는 MS (Murashige와 Skoog, 1962), SH (Schenk와 Hildebrandt, 1972) 및 N6 기본배지를 사용하여 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 비교하였다.

### 3. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에 있어서 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 배발생 캘러스를 auxin과 cytokinin이 각각 조합처리된 재분화배지 (N6배

지, 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite)에 치상하여 조사하였다. 치상한 조직은 24±2℃ 및 16시간 광조건 8시간 암조건에서 4주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대하여 4주간 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 싹(shoot)을 재분화개체로 조사하였다. 재분화된 싹은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 재배하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 성숙종자로부터 캘러스 배양시 성장조절 물질의 배양효과

국내 개발 재배 품종 이탈리아 라이그라스에 있어서 최적 조직배양체계를 확립하고자 ‘코스피드’의 종자로부터 캘러스 배양효과를 규명하

였다. 우선 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장 조절물질의 종류와 농도에 따른 효과를 규명하기 위하여 코스피드 품종의 종자를 대표적인 auxin 종류인 2,4-D와 NAA를 각각 다양한 농도로 캘러스 유도배지에 첨가한 후 배양하여 그 효율을 조사하였다. 그 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 캘러스 유도배지에 첨가한 auxin의 종류에 따른 캘러스 유도율과 각 캘러스당 생체중에 있어서 각각 차이를 나타내어 전체적으로 2,4-D 처리구가 NAA 처리구에 비해 높은 효율을 보였다(표 1). 2,4-D의 처리구의 경우 성숙종자로부터 캘러스 유도율과 캘러스 생체중은 5 mg/L의 2,4-D 처리구에서 각각 62.8%와 36 mg으로 나타났으며, 7 mg/L 처리구의 경우 61.4%와 38 mg을 나타내어 이보다 낮거나 높은 농도에 비해 월등히 높은 캘러스 배양효율을 나타내었다. 또한 5 mg/L 2,4-D 처리구에서 형성된 캘러스의 경우 7 mg/L 처리구에 비해 생체중은 다소 낮았으나, 조직이 치밀하고 유백색을 띤 전형적인 배발생 가능성이 높

Table 1. Effect of 2,4-D on callus induction from mature seeds Italian ryegrass, cv. Kospeed

Growth regulators	(mg/L)	No. of seeds cultured <sup>1)</sup>	Callus formation (%)	Callus fresh weight (mg) <sup>2)</sup>
2,4-D	0	70	0	0
	3	70	30.0±2.2	25±1.2
	5	70	62.8±3.2	36±2.2
	7	70	61.4±2.8	38±1.7
	9	70	32.8±3.1	29±1.5
NAA	0	70	0	0
	3	70	21.4±1.8	17±1.1
	5	70	42.9±2.5	19±2.4
	7	70	45.7±1.7	25±1.8
	9	70	35.8±3.2	20±2.5

<sup>1)</sup> Dehusked mature seeds were placed on N6 medium containing 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite, and cultured for 4 weeks.

<sup>2)</sup> Data represent mean of callus fresh weight formed from one seed.

은 캘러스가 높은 비율로 관찰 되었다.

한편 NAA 처리구의 경우 7 mg/L의 농도로 배지에 첨가한 배지에서 캘러스 유도율과 형성된 캘러스 당 평균 생체중이 각각 45.7%와 25 mg으로서 가장 높게 나타났으나, 전체적으로 2,4-D 처리구에 비해 낮은 캘러스 배양 효율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 이탈리아 라이그라스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 생장조절제의 종류와 농도가 캘러스의 유도와 증식에 많은 영향을 미친다는 것을 의미한다. 본 연구결과와 유사하게 이탈리아 라이그라스의 캘러스 배양에 있어서 2,4-D의 첨가가 다른 종류의 auxin에 비해 효과적이라는 결과가 종자(Lee 등, 2001), 화서(Creemers-Molenaar 등, 1988), 배주(Kumlehn와 Nitzsche, 1995) 등의 배양에서도 보고된 바 있다.

## 2. 기본배지 종류별 배양효과

성숙종자로부터 캘러스유도 및 식물체 재분화에 미치는 기본배지의 종류에 따른 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 비교해 보았다 (Table 2). 성숙종자로부터 캘러스 유도에는 기본배지의 종류에 따른 배양효율이 57.5~63.2%로 큰 차이는 관찰되지 않았으나, N6 배지와 MS 배지가 SH 배지에 비해 높은 효율을 나타

내었다. 한편 캘러스로부터 식물체 재분화에는 N6 배지가 63.2%의 가장 높은 효율을 나타내었으며 MS 배지도 62.5%로서 높은 효율을 나타낸 반면 SH 배지는 이에 비해 낮은 57.5%의 재분화율을 나타내어 N6 배지가 가장 효과적인 것으로 판단되었다 (Table 2). 지금까지의 보고에 의하면 화분과 작물의 캘러스배양 및 식물체 재분화에는 N6 배지가 효율적인 것으로 알려져 있으나, 톨페스큐 (Bai와 Qu 2000), 켄터키 블루그래스 (Griffin와 Dibble 1995) 등의 경우에는 MS 배지가 더 효과적인 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서도 코스피드 품종의 경우 캘러스 배양의 경우 MS 배지와 N6 배지 간에는 유의적인 차이가 없었으나 재분화 시에는 N6 배지가 다소 높게 남으로서 캘러스 유도와 재분화시 기본배지로는 N6가 효과적인 것으로 판단된다.

## 3. 식물체 재분화시 식물생장조절제 배양 효과

캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 생장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 조사하기 위하여 캘러스 유도배지에서 배양한 캘러스를 이용하여 2,4-D와 BA의 첨가효과를 조사하였다 (Table 3). BA 단용처리구의 경우 BA 첨가 농도가 증가할수록 식물체

Table 2. Effect of basal medium on callus induction from mature seed of Italian ryegrass cv. Kospeed

Culture media	No. of seeds cultured	Callus formation (%) <sup>1)</sup>	Plant regeneration (%) <sup>2)</sup>
MS	70	62.5±2.8	60.8±5.3
N6	70	63.2±3.3	68.2±4.3
SH	70	57.5±2.1	50 ±2.3

<sup>1)</sup> Calli cultured on the callus induction medium (basal medium, 5 mg/L 2,4-D, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite) were used.

<sup>2)</sup> Calli were transferred to the regeneration medium with each basal medium containing 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose and 5 g/L Gelrite, and cultured for 6 weeks.

Table 3. Effect of growth regulators on plant regeneration from mature seed-derived callus of Italian ryegrass cv. Kospeed

2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	No. of calli cultured <sup>1)</sup>	Plant regeneration (%) <sup>2)</sup>
0	0	70	2.0±2.0
	3	70	38.0±1.7
	5	70	58.0±2.3
	8	70	51.0±1.9
1	0	70	1.8±3.2
	3	70	45.0±3.5
	5	70	67.0±4.1
	8	70	55.0±3.6

<sup>1)</sup>Calli cultured on the callus induction medium (N6 medium, 5 mg/L 2,4-D, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite) were used. <sup>2)</sup>Calli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite), and cultured for 6 weeks.

재분화율이 증가하는 경향을 나타내어 5 mg/L 처리구에서 58%의 가장 높은 재분화율을 나타내었으며 이보다 높은 농도에서는 오히려 감소하였다. 한편 1 mg/L의 2,4-D와 BA를 혼용처리했을 경우에는 5 mg/L BA를 첨가했을 때 재분화율이 67%로서 가장 높은 효율을 보였으며, BA 단독처리구에 비해 월등히 높은 재분화율을 나타내었다. Kumlehn와 Nitzsche 등 (1995)은 이탈리아 라이그라스 배주유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에는 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L zeatin을 혼용처리했을 때 43% 정도의 재분화율을 나타내었다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 코스피드 이탈리아 라이그라스의 경우 재분화율이 67%로서 Kumlehn와 Nitzsche 등의 효율보다 훨씬 더 높은 재분화 효율을 나타내는 성장조절제 종류와 적정 첨가농도를 규명할 수 있었다.

#### 4. 탄소원에 따른 배양효과

코스피드 품종에 있어서 재분화 배지에 첨가

Table 4. Effect of sucrose concentrations on plant regeneration from mature seed-derived callus of Italian ryegrass cv. Kospeed

Sucrose (g/L)	No. of callus cultured	Plant regeneration (%) <sup>1)</sup>
20	70	63.3±1.5
30	70	68.1±2.3
40	70	58.8±3.1

<sup>1)</sup>Calli were transferred to the regeneration medium (see the footnote in Table 3) containing different concentrations of sucrose, and cultured for 6 weeks.

되는 탄소원으로 sucrose의 첨가 농도별 식물체 재분화 효율을 조사해 본 결과 표 4와 같이 나타났다. 재분화배지의 sucrose 농도를 20~40 g/L까지 첨가하여 각각의 농도로 첨가했을 때 20 또는 30 g/L 농도로 첨가한 처리구에서 각각 63.3%와 68.2%의 높은 재분화율을 나타내었다 (Table 4). 한편 예비실험 결과 다른 탄소

원인 glucose나 sorbitol을 첨가했을 때는 sucrose에 비해 훨씬 낮은 재분화 효율을 나타내었다 (결과 미제시). 대부분의 식물세포의 기내배양에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 인자 중에 하나는 세포의 삼투퍼텐셜과 에너지를 제공하는 역할을 하는 탄소원의 종류와 농도이다 (De Neto와 Otoni, 2003). 기내배양시 특히 식물체 재분화 단계에서는 아직까지 재분화 중인 유식물체가 에너지 발생기관인 엽록체가 정상적인 기능을 못할 뿐만 아니라, 계속적인 지상부와 뿌리의 형성을 위해서는 막대한 에너지를 필요로 하는 단계이며, 식물에서 에너지원으로서 많이 이용되는 탄소원에는 sucrose, glucose, fructose, sorbitol 등으로 알려져 있다 (De Klerk와 Calamar, 2002). 본 코스피드 품종의 경우

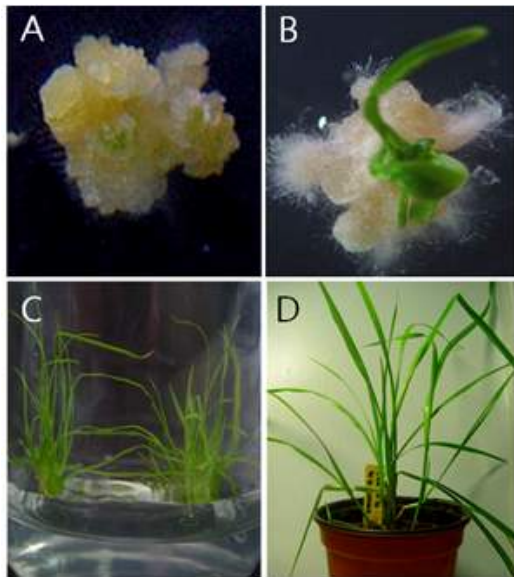


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of Italian ryegrass cv. Kospeed.

A, Embryogenic callus induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; B, Shoot regeneration from embryogenic calli in the regeneration medium; C, Root formation of plantlets cultured in the rooting medium; F, Whole plants grown in pot.

기내배양시 탄수화물 에너지원으로서 sucrose를 가장 효율적인 것으로 추측된다.

본 실험을 통하여 국내개발 품종인 코스피드 이탈리아인 라이그라스의 성숙종자로부터 단기간 내에 재분화 식물체를 획득할 수 있는 효율적인 조직배양체계를 확립하였다. 성숙종자를 캘러스 유도배지에서 배양한 결과 배발생 캘러스가 높은 빈도로 형성되었으며 (Fig. 1A), 재분화 배지에 이식 후 약 2주부터 신초가 재분화되었다 (Fig. 1B). 재분화된 신초는 rooting 배지 (식물생장조절제가 첨가되지않은 캘러스 유도배지)에서 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 화분에 이식하여 재배할 수 있었다 (Fig. 1C; Fig. 1D). 이와 같은 국내에서 개발되고 농가에 보급 재배되고 있는 품종에 대한 재분화 체계 확립 연구는 앞으로 사료품질 향상 또는 환경재해 저항성 유전자 등의 도입을 통해 신품종 형질전환 이탈리아인 라이그라스 개발하는 실용화 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### IV. 요약

국내 개발 재배품종인 코스피드 이탈리아인 라이그라스의 최적 배양조건을 확립하기 위하여 성숙종자로부터 캘러스 유도조건 및 식물체 재분화 조건을 조사하였다. 캘러스 유도시 첨가되는 auxin으로는 2,4-D가 NAA 보다 효율적이었으며, 5 mg/L 2,4-D가 첨가된 N6 배지에서 캘러스가 가장 높은 빈도로 유도되었다. 캘러스로부터 식물체 재분화는 1 mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA가 첨가된 N6 배지에서 배양했을 때 67% 이상의 재분화율을 나타내었다. 기본배지의 종류에 따른 배양효율의 차이는 캘러스 유도와 식물체 재분화에는 N6배지가 효과적이었으며, 재분화배지에 첨가되는 탄소원에는 30 g/L의 sucrose가 가장 높은 재분화 효율을 나타

내었다. 본 연구를 통하여 확립된 고효율 재분화 시스템은 분자육종을 통한 신품종 이탈리아 라이그라스의 실용화 연구에 큰 도움이 될 것으로 추측된다.

## V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린21 사업(과제번호: PJ008139)의 지원, KRIBB 기관 고유사업의 연구비 지원(과제번호: KGM0531113) 및 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2008-313-F00065)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 김경희, 김용구, 허성현은 경상대학교 BK21 장학금 지원을 받아 연구를 수행하였습니다.

## IV. 인 용 문 헌

1. 최기준, 김원호, 서 성. 2008. 한국에서 동계작물생산과 이용. 한국초지조사료학회 학술발표회. pp. 17-48.
2. Bai, Y. and R. Qu. 2000. An evaluation on callus induction and plant regeneration of 25 turf-type tall fescue cultivars. Grass Forage Sci. 55:326-330.
3. Choi, G.J., Y.W. Rim, K.Y. Kim, S.H. Choi, B.R. Sung, W.H. Kim and Y.C. Lim. 2000. A cold-tolerant and high-yielding Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety 'Hwasan 101'. J. Kor. Grassl. Sci. 20:1-6.
4. Chu, C.C., C.S. Wang, C.C. Sun 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.
5. Creemers-Molenaar J., J.P.M. Loeffen, P. Van der Valk. 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.
6. Dale P.J. 1980. Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. Pflanzen Physiol. 100:73-77.
7. De K., G.J.M. and A. Calamar. 2002. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 70:207-212.
8. De N., V.B.P. and W.C. Otoni. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? Scient. Hort. 97:193-202.
9. Forster, J.W. and G. Spangenberg. 1999. Forage and turf grass biotechnology: principles, methods and prospects. In: Setlow JK (eds), Genetic engineering: principles and methods, Vol 21, Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 191-237.
10. 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.
11. Hides D.H., C.A. Kute and A.H. Marshall. 1993. Seed development and seed yield potential of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations. Grass and Forage Sci. 48:181-188.
12. Isselstein, J. 1993. Influence of slight shading, sward density and nitrogen fertilization on yield and nutritive value of *Lolium multiflorum* Lam. J. Agro and Crop Sci. 170:341-347.
13. Kumlehn, J. and W. Nitzsche. 1995. Plant regeneration from isolated ovules of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.): effect of 2,4-D and different cytokinins supplemented to the ovule culture medium. Plant Sci. 111:107-116.
14. Lee, H.S., K.M. Kang and J. Jo. 2001. Factors affecting plant regeneration from seed-derived calli in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam). Kor. J. Plant Tiss. Cult. 28:323-328.
15. Lee, S.H., Lee, D.G., Kim, J.S. and B.H. Lee. 2003. High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. Kor. J. Plant Biotechnology 30:341-346.
16. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise

- medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
17. Park, B.H., B.S. Park and J.H. Kang. 1987. A comparison between diploid and tetraploid cultivars of *Lolium multiflorum* Lam. *J. Kor. Grassland Sci.* 7:135-139.
18. Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
19. Spangenberg, G., Z.Y. Wang and P. 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.
- (접수일: 2011년 8월 10일, 수정일 1차: 2011년 9월 9일, 수정일 2차: 2011년 9월 14일, 게재확정일: 2011년 9월 16일)