

## 테프그라스 조직배양을 통한 캘러스 형성 및 식물체 재분화 효율

이기원 · 문진용 · 박형수 · 최기준 · 김기용 · 지희정 · 황태영 · 이상훈\*

농촌진흥청 국립축산과학원 초지사료과

## Callus Induction and Plant Regeneration Efficiency According to Tissue Culture Conditions in Teff grass (*Eragrostis*)

Ki-Won Lee, Jin Young Moon, Hyung Soo Park, Gi Jun Choi, Ki-Yong Kim,

Hee Chung Ji, Tae young Hwang, Sang-Hoon Lee\*

Grassland & Forages Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Seonghwan, Cheonan, Chungnam, 330-801, Korea

### ABSTRACT

Teff grass is a warm season C4 annual grass that is used for dry hay, silage and haylage. We have developed a high-frequency plant regeneration system for teff grass via callus culture using mature seeds. It was revealed that mature seeds cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 0.5 g/L proline, 0.5 g/L casamino acid and 3 g/L Gelrite under light condition produced the highest percentage of callus formation (91.9%). Addition of cytokinins (BA) at 0.0~0.5 mg/L to media containing 2 mg/l 2,4-D enhanced callus growth. The most suitable medium for plant regeneration from dehydrated calli was MS agar medium supplemented with 0.1 mg/l NAA, 1 mg/l BA, 0.5 g/L proline, 0.5 g/L casamino acid 3 g/L Gelrite which induced the highest percentage of calli forming shoots (47.0%). The shoots were rooted at the highest rate (100%) when transferred onto 1/2 MS medium and acclimated in greenhouse conditions.

(Key words : Callus, Regeneration, Teff grass, Tissue culture)

### 서 론

테프그라스 (teff grass)는 에라그로스티스 (*Eragrostis*) 속에 속하는 난지형 목초로서 초기생육이 빠르고 사료가치가 우수하여 건초, 사일리지 및 방목용 등으로 그 이용범위가 우수한 초종중의 하나이다 (Smale et al., 1996).

테프그라스는 원산지인 에티오피아에서는 teff grass의 작은 낱알은 곡식으로도 이용되

고 있으며 또한 다양한 기후 조건 및 토양에서 생육할 수 있다는 장점이 있어 특히 가뭄이나 척박한 환경에 비교적 잘 적응하기 때문에 사막화가 진전되고 있는 지역의 토양 유실 및 황사 발생을 억제할 수 있는 지표면의 피복효과뿐만 아니라 높은 수준의 필수 아미노산을 함유하고 있어 양질의 건초로도 이용될 수 있는 중요한 초종이다 (Ketema et al., 1997).

Corresponding author : Sang-Hoon Lee, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea. Tel: +82-41-580-6754, E-mail: sanghoon@korea.kr

2013년 8월 25일 투고, 2013년 9월 12일 심사완료, 2013년 9월 25일 게재확정

최근 기후 온난화로 인해 난지지역 확대로 난지형 목초 재배지역이 북상하고 있으며 한지형 목초의 수량이 봄철에 편중되고 여름철 하고현상으로 한지형 목초의 생산성 저하를 보완해 줄 대안으로서 난지형 목초의 중요성이 점차 증대되고 있다. 따라서 척박한 토양과 건조지역에 잘 적응하는 테프그라스의 우수한 환경적응성을 분자수준에서 규명하고, 다양한 환경 스트레스에 보다 잘 견디는 새로운 테프그라스의 품종 개발은 조사료 신자원 개발을 위해 매우 중요한 일이다.

지금까지 분자유종 기법을 적용한 난지형 화본과 목초의 경우 조직배양 효율이 매우 낮아 버뮤다그라스, 바히아그라스를 비롯한 소수의 작물에서만 형질전환 성공이 보고되었다 (Li et al., 2005; Smith et al., 2002). 식물의 조직배양 효율은 식물 성장 조절물질을 포함한 배지의 조성물 및 다양한 배양 조건에 의해 영향을 받는다. 지금까지 테프그라스의 조직배양에 관한 연구는 뿌리와 잎 (Bekele, 1985)과 성숙종자와 미성숙 종자 (Assefa et al., 1998; Gugsu et al., 2006)를 이용한 보고가 일부 있으나 그 효율이 미미한 실정이며 이를 이용한 형질전환의 관한 보고는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 분자유종 기술을 적용한 신품종 테프그라스를 개발하기 위하여 분자유종의 기술적용을 위한 원천기술을 개발하기 위하여 테프그라스의 효율적인 캘러스유도와 식물체 재분화 체계를 확립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자살균

식물재료로는 국외에서 수집한 테프그라스 (*Eragrostis*)의 Titany 품종을 사용하였다. 테프그라스의 성숙종자를 고무패드를 이용하여 가볍게 종피를 제거한 후 70% (v/v) ethanol에

1분간 살균하고, 멸균수로 3회 세정한 다음 다시 5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 30분간 침지시켜 표면살균 하였다. 살균된 종자는 clean banch내에서 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 종자의 물기를 완전히 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다 (Lee et al., 2008).

### 2. 성숙종자로부터 캘러스의 유도

테프그라스 성숙 종자로부터 캘러스를 유도하기 위하여 캘러스 유도 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962), N6 (Chu et al., 1975) 또는 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 배지를 기본 배지로 사용하여 1~5 mg/L 2,4-D (2,4-dichloro phenoxy acetic acid) 또는 1~5 mg/L NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid)를 단용 처리하거나, 1~5 mg/L 2,4-D 또는 1~5 mg/L NAA와 0.1~1.0 mg/L BA를 혼용 처리하고, 30 g/L Soucrose, 0.5 g/L L-proline, 0.5 g/L casamino acid 및 3 g/L Gelrite를 첨가하여 제조하였다. 제조된 캘러스 유도용 배지에 테프그라스 성숙 종자를 치상하여 24±2℃의 성장실에서 4주간 암 배양한 후 동일한 조성의 새로운 배지에 옮겨 3주 동안 배양하였다. 실험에 사용한 모든 배지와 기구는 121℃, 1.5기압으로 17분간 autoclave에서 고온고압 멸균하여 사용하였다.

### 3. 캘러스로부터 식물체 재분화

캘러스 유도배지에서 6주 동안 배양한 캘러스만을 취하여 MS, N6 및 SH 기본 배지에 0.1~1.0 mg/L BA 및 0.1~1.0 mg/L Kinetin을 단용 처리하거나 0.1 mg/L 2,4-D 또는 0.1 mg/L NAA와 0.1~1 mg/L BA 또는 0.1~1 mg/L Kinetin을 혼용 처리하고, 30 g/L sucrose, 0.5 g/L L-proline, 1 mg/L thiamin-HCl 및 3 g/L gelrite를 첨가하여 제조한 배지에 캘러스

를 이식하였다. 이식한 테프그라스 캘러스는 24±2℃, 16시간 명배양/8시간 암배양 조건으로 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대 배양하여, 총 7주 동안 배양하였다. 사이토키닌 단용 처리 및 옥신과 사이토키닌을 혼용 처리하여 제조한 배지 각각의 처리구에서 1 cm 이상으로 자란 싌초를 재분화 개체로 조사하였다.

#### 4. 식물체 뿌리유도 및 식물체의 순화

기내 뿌리유도 후 효과적인 식물체 생장 및 순화를 위해 초장이 5 cm 이상 자란 싌초를 분리 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하였다. 발근이 정상적으로 된 재분화 식물체는 토양에 이식하여 일주일 동안 순화시킨 후 온실에서 재배하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 생장조절물질에 따른 캘러스 배양효과

기내 조직배양 시스템을 이용한 재분화 체

계의 확립은 초기 배양재료의 선택이 중요하다. 테프그라스의 성숙종자를 이용하여 효과적인 재분화 시스템을 확립하기 위해 식물생장조절물질인 옥신류의 종류 및 농도에 따른 캘러스 유도율을 조사하였다.

테프그라스 성숙종자를 2,4-D 및 NAA가 각각 0, 1, 2, 3, 4 및 5 mg/L의 농도로 첨가된 캘러스 유도배지에서 4주간 배양한 결과, 종자로부터의 캘러스 유도율은 2 mg/L의 2,4-D가 91.9%로 가장 높게 나타났고 1 mg/L의 2,4-D가 86.7%로 두 번째로 효율이 높았다. 또한, NAA 단용 처리시에는 2 mg/L의 NAA 처리가 81.4%로 캘러스 유도 효율이 가장 높았다. 따라서 테프그라스 성숙종자의 캘러스 유도에는 1~2 mg/L 농도의 2,4-D 또는 NAA 첨가가 적절한 것으로 판단되었다. 동일한 농도의 식물생장 호르몬 처리시 2,4-D가 NAA에 비해 더 높은 캘러스 유도율을 보였으며, 캘러스 생체중도 더 높게 나타나 2,4-D 처리가 테프그라스 캘러스 유도에 더 효율적임을 확인할 수 있었다 (Table 1). 따라서 테프그라스를 조직배양함에 있어 캘러스 유도와 생장에는 세포의 생장과 분열을 촉진하는 식물생

Table 1. Effect of different concentrations of auxins on callus formation from mature seeds of Teff grass (cv. Titany).

| Auxins | Concentration (mg/L) | Number of seeds tested <sup>a</sup> | Number of callus induced | Callus formation (%) |
|--------|----------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| 2,4-D  | 0                    | 60                                  | 0                        | 0                    |
|        | 1                    | 120                                 | 104.0 ± 1.7              | 86.7 ± 1.4           |
|        | 2                    | 120                                 | 110.3 ± 3.1              | 91.9 ± 2.5           |
|        | 3                    | 120                                 | 98.7 ± 4.2               | 81.1 ± 2.5           |
|        | 4                    | 120                                 | 93.3 ± 4.2               | 77.8 ± 3.5           |
|        | 5                    | 120                                 | 94.7 ± 4.5               | 78.9 ± 3.8           |
| NAA    | 0                    | 60                                  | 0                        | 0                    |
|        | 1                    | 120                                 | 99.7 ± 2.3               | 80.5 ± 6.3           |
|        | 2                    | 120                                 | 101.0 ± 1.0              | 81.4 ± 4.1           |
|        | 3                    | 120                                 | 88.7 ± 3.2               | 73.6 ± 3.2           |
|        | 4                    | 120                                 | 80.7 ± 2.1               | 64.4 ± 3.2           |
|        | 5                    | 120                                 | 79.7 ± 1.5               | 63.1 ± 5.7           |

<sup>a</sup> Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 4 weeks.

장조절 물질의 첨가가 필수적이며, 옥신류의 종류와 적정 농도를 구명하는 것이 초기배양의 효율성을 좌우하는 중요한 인자로 작용하는 것으로 사료된다.

2. 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 캘러스 생체중에 대한 옥신 및 사이토키닌 혼용 처리의 영향

Auxin 단용처리와 Cytokinin 혼용 처리에 따른 캘러스의 증식을 속도를 확인하기 위해 2,4-D와 NAA를 각각 0, 1, 2, 3, 4 및 5 mg/L의 농도로 첨가된 Auxin 단용 처리 배지에서 4주간 배양한 캘러스를 2,4-D와 BA 혼용 처리된 캘러스 유도배지에 옮겨 3주간 배양하였다. 총 7주 동안 배양된 테프그라스 성숙종자의 캘러스 유도율 및 캘러스의 생체중을 조사한 결과, 2 mg/L의 2,4-D 단용 처리구와 2 mg/L의 2,4-D에 0.1 mg/L의 BA를 첨가하여 배양한 처리구에서 각각 90.7%와 90.0%로 가장 높은 캘러스 형성율을 나타내었다. 또한, 2 mg/L의 2,4-D에 0.1 mg/L의 BA를 혼용 처리하였을 경우, 캘러스 생체중이 41.7 mg으로 가장 높게 나타나 캘러스 증식에 가장

효율임을 확인할 수 있었다 (Table 2).

일반적으로 화분과 식물의 캘러스 유도에 사이토키닌류인 BA를 첨가하면 캘러스 유도율과 식물체의 분화에 효과적인 성장조절물질로 보고되고 있고 (Lee et al., 2008; Lee et al., 2009a; Lee et al., 2009b), 본 연구결과와 유사한 연구결과를 보여주고 있다.

3. 성장조절물질에 따른 식물체 재분화

Table 2에서 확인한 2 mg/L의 2,4-D, 0.1 mg/L의 BA가 첨가된 캘러스 유도 배지에서 7주간 배양한 캘러스를 이용하여 BA 또는 Kinetin이 각각 0.1, 0.5, 1 mg/L의 농도로 첨가된 Cytokinin 단용 재분화 배지에서 배양한 결과, 0.5 mg/L의 BA가 첨가된 배지에서 배양한 경우 37.5%로 가장 높은 재분화 효율을 나타내었다. 따라서 테프그라스 식물체 재분화에 대한 Cytokinin 단용 처리는 BA가 Kinetin 보다 더 효율적인 것으로 확인되었다. 한편, 식물체 재분화에 대한 Auxin (2,4-D, NAA)과 Cytokinin (BA, kinetin)을 혼용 처리하였을 경우는 0.1 mg/L의 NAA에 1 mg/L의 BA를 첨가한 배지에서 배양하였을 때 47%로

Table 2. Effect of 2,4-D and BA on callus formation from mature seed culture of teff grass (cv. Titany).

| Growth regulator (mg/L) |     | No. of seed transferred <sup>a</sup> | Callus formation (%) | Callus fresh weight per seed (mg) |
|-------------------------|-----|--------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 2,4-D                   | BA  |                                      |                      |                                   |
| 0                       |     | 50                                   | 0                    | 0                                 |
| 1                       |     | 100                                  | 86.3 ± 2.5           | 30.0 ± 2.6                        |
| 2                       |     | 100                                  | 90.7 ± 2.5           | 35.0 ± 3.0                        |
| 3                       |     | 100                                  | 83.0 ± 3.0           | 28.7 ± 4.7                        |
| 5                       |     | 100                                  | 80.7 ± 3.1           | 24.7 ± 7.6                        |
| 2                       | 0.1 | 100                                  | 90.0 ± 2.0           | 41.7 ± 3.5                        |
|                         | 0.5 | 100                                  | 77.3 ± 3.2           | 37.7 ± 1.5                        |
|                         | 1   | 100                                  | 71.0 ± 2.6           | 29.3 ± 2.5                        |

<sup>a</sup> Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 4 weeks.

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

Table 3. Effect of growth regulators on plant regeneration from mature seed-derived callus culture of teff grass.

| Growth regulator (mg/L) |         | Plant regeneration (%) <sup>a</sup> |
|-------------------------|---------|-------------------------------------|
| BA                      |         |                                     |
|                         | 0.1     | 25.3 ± 1.5                          |
|                         | 0.5     | 37.3 ± 2.1                          |
|                         | 1       | 36.0 ± 2.0                          |
| Kinetin                 |         |                                     |
|                         | 0.1     | 17.3 ± 1.5                          |
|                         | 0.5     | 29.3 ± 2.5                          |
|                         | 1       | 32.7 ± 2.1                          |
| 2,4-D                   | BA      |                                     |
| 0.1                     | 0.1     | 17.7 ± 1.5                          |
|                         | 0.5     | 26.0 ± 2.6                          |
|                         | 1       | 33.7 ± 1.5                          |
|                         | Kinetin |                                     |
|                         | 0.1     | 15.7 ± 2.1                          |
|                         | 0.5     | 26.0 ± 3.0                          |
|                         | 1       | 34.7 ± 2.1                          |
| NAA                     | BA      |                                     |
| 0.1                     | 0.1     | 28.7 ± 2.5                          |
|                         | 0.5     | 36.7 ± 2.1                          |
|                         | 1       | 47.0 ± 2.6                          |
|                         | Kinetin |                                     |
|                         | 0.1     | 30.7 ± 1.5                          |
|                         | 0.5     | 39.7 ± 1.5                          |
|                         | 1       | 38.0 ± 2.6                          |

<sup>a</sup> Values represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

가장 높은 재분화 효율을 나타내었다. 즉, 테프그라스 캘러스로부터 식물체의 재분화에는 Cytokinin 단용 처리보다 Auxin 및 Cytokinin 혼용 처리가 더 높은 재분화 효율을 나타내었다 (Table 3).

#### 4. 식물체 재분화에 대한 배양 배지의 영향

테프그라스 성숙종자 유래의 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 대한 배양 배지의 종류에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 MS, N6 및 SH 배지에 확립된 최적 배지 조성물을 첨가하여 조사한 결과, SH 배지에서 배양한 경우에 비해서 MS 배지 및 N6 배지에서 배양한 경우에 캘러스 형성을 및 식물체 재분화 효율이 더 높게 나타났다. 또한, MS 배지와 N6 배지 간의 캘러스 형성을 및 식물체 재분화 효율에는 큰 차이가 없는 것으로 관찰되었다 (Table 4).

난지형 목초 테프그라스의 식물체 재분화 실험에서 이러한 조건으로 배양했을 때 캘러스는 캘러스 유도배지에서 배양 3일째부터 형성되기 시작하여 4주 후에는 90% 이상 형성되었으며 (Fig. 1A, B, C), 재분화 배지에 이식한 후 배양 6주 부터는 약 50%의 높은 빈도로 신초가 재분화 되었다 (Fig. 1D, E, F, G). 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 rooting 배지에서 2주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Fig. 1H).

Table 4. Effect of basal media on callus formation and plant regeneration from mature seeds cultures of teff grass.

| Media | Number of seeds transferred | Callus formation (%) <sup>a</sup> | Number of calli transferred | Plant regeneration (%) <sup>b</sup> |
|-------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| MS    | 120                         | 91.8 ± 1.3                        | 100                         | 48.3 ± 1.5                          |
| N6    | 120                         | 90.5 ± 2.5                        | 100                         | 48.7 ± 0.6                          |
| SH    | 120                         | 76.4 ± 1.3                        | 100                         | 36.3 ± 2.5                          |

<sup>a</sup> Calli cultured on the callus induction medium were used.

<sup>b</sup> Calli were transferred to the regeneration medium and cultured for 6 weeks.

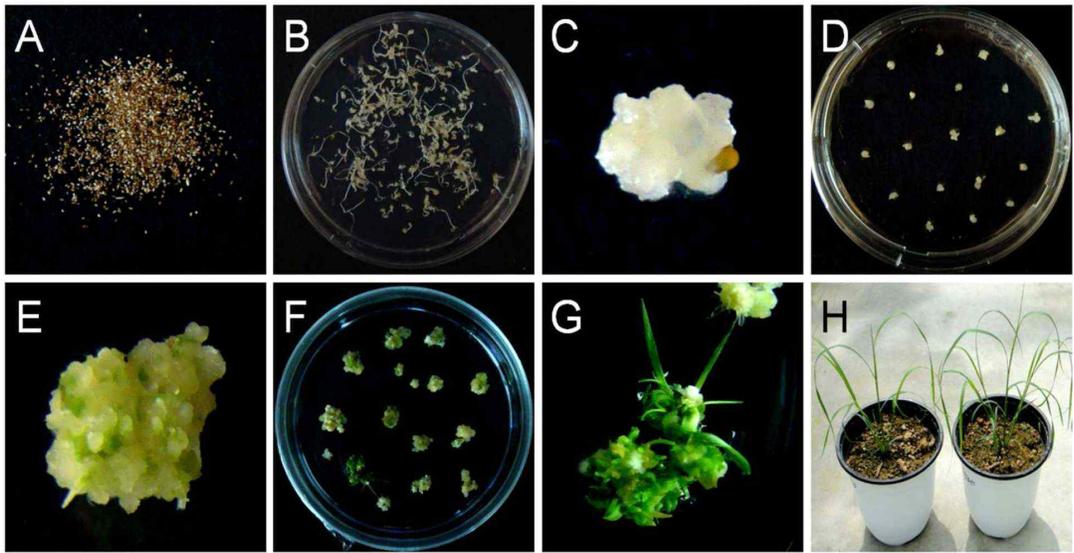


Fig. 1. Plant regeneration from mature seed-derived callus of teff grass (*Eragrostis*).  
 A, Mature seed. B-D, Calli induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; E-G, Development of shoots cultured in the regeneration medium; H, Whole plants grown in pots.

따라서 본 연구결과에서 테프그라스 성숙 종자를 이용하여 옥신종류 및 농도에 따른 최적의 캘러스 유도조건을 조사하였고, 유도된 캘러스를 이용하여 분화에 최적인 사이토키닌 농도를 확인하였다.

## 결 론

테프그라스는 최근 미국에서 난지형 목초로 많이 이용되고 있을 뿐만 아니라, 건초나 사일리지 등으로 그 이용성이 증대되고 있는 초중 중의 하나이다. 게다가 우리나라의 경우 최근 기후 온난화로 인해 난지형 목초 재배지역이 북상하고 있으며 더운 여름철 한지형 목초의 생산성을 보완해 줄 대안으로서 난지형 목초의 중요성이 점차 증대되고 있다. 본 연구에서는 테프그라스의 성숙종자로부터 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 캘러스 유도 및 식물체 재분화 효율을 조사

하였다. 테프그라스의 성숙 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 2mg/L 2,4-D가 첨가된 처리구에서 91.9%로 가장 높게 나타났으며 식물체 재분화에는 0.1 mg/L NAA와 1 mg/L BA가 첨가된 배지에서 배양함으로써 47.0% 이상의 높은 재분화율을 얻을 수 있었다. 또한 캘러스유도와 식물체 재분화 배지에 필요한 배양배지는 MS와 N6 배지에서 효과적인 것으로 확인되었다. 본 연구를 통하여 확립된 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체를 재분화 시스템은 향후 우리나라 기후 환경에서 재배하기에 적합한 테프그라스 신품종 개발에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 2013년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이

루어진 것임.

## 인 용 문 헌

1. Assefa, K., Gaj, D., Maluszynski, M., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in mature seed culture of teff [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. Plant Cell Reports. 18, 156-158.
2. Bekele, E., 1985. A review of research on diseases of barely, tef, and wheat in Ethiopia. pp. 79-108. In: Abate, T. (Ed.). A review of crop protection research in Ethiopia. Proceedings of the First Ethiopian Crop Prod. Symp. Dept. Crop protection, Institute of Agricultural Research, Addis Ababa, Ethiopia.
3. Chu, C.C., Wang, C.S., Sun, C.C., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinic. 18, 659-668.
4. Gugsä, L., Sarial, K., Lorz, H., Kumlehn, J., 2006. Gynogenic plant regeneration from unpollinated flower explants of teff [*Eragrostis tef*(Zuccagni) Trotter]. Journal of Plant Cell Reports. 25, 1287-1293.
5. Ketema, S., 1997. Teff [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 12. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 50pp.
6. Lee, K.-W., Kim, K.-Y., Choi, G.J., Lim, Y.C., Kim, W.H., Jung, M.W., Seo, S., Lee, B.-H., Lee, S.-H., 2008. Callus Induction and plant regeneration from mature seeds of timothy. J. Kor. Grassl. Forage Sci. 28, 165-170.
7. Lee, K.-W., Lee, J.K., Kim, K.-Y., Ji, H.C., Park, H.S., Kim, K.-H., Lee, B.-H., Lee, S.-H., 2009a. Plant regeneration capacity of calluses derived from mature seed of perennial ryegrass cultivars. J. Kor. Grassl. Forage Sci. 29, 285-290.
8. Lee, K.-W., Choi, G.J., Kim, K.-Y., Ji, H.C., Park, H.S., Yoon, S.H., Lee, S.-H., 2009b. High frequency plant regeneration from mature seed derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars. African Journal of Biotechnology. 8(24), 6828-6833.
9. Li, L., Li, R., Fei, S., Qu, R., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of common bermudagrass (*Cynodon dactylon*) Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 83, 223-229.
10. Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15, 473-497.
11. Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot. 50, 199-204.
12. Sheibani, M., Azghandi, A., Nemati, S., 2007. Induction of somatic embryogenesis in Saffron using thidiazuron. Pakistan Journal of Biological Science. 10, 3564-3570.
13. Smale, M., Aquino, P., Crossa, J., del Toro, E., Dubin, J., Fischer, T., Fox, P., Khairallah, M., Mujeeb-Kazi, A., Nightingale, K., Ortiz-Monasterio, I., Rajaram, S., Singh, R., Skovmand, B., van Ginkel, M.,

- Varughese, G., Ward, R., 1996. Understanding global trends in the use of wheat diversity and international flows of wheat genetic resources. Economics Working Paper 96-02. Mexico, D.F.: CIMMYT. 61pp.
14. Smith, R.L., Grando, M.F., Li Y.Y., Seib, J.C., Shatters, R.G., 2002. Transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). Plant Cell Rep. 20, 10-1021.