

# Acetosyringone을 이용한 효율적인 White Clover의 형질전환

권 태 호

전북대학교 유전공학연구소

## Efficient Transformation of *Trifolium repens* L. Using Acetosyringone

Tae-Ho Kwon

Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University,  
Chonbuk, Chonju, 560-756, Korea.

### ABSTRACT

Transformants of White Clover(*Trifolium repens* L.) were efficiently produced from immature seed derived callus cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring plant binary vector, pBI121, using acetosyringone. The mean frequencies of transformants on the two kanamycin-containing media were 16 to 19% when the immature seed-derived calli were infected with bacteria cultured in the presence of 100 $\mu$ M acetosyringone compared with 7% in media without acetosyringone. Transgenic white clover was subject to molecular analysis for integration into plant nuclear genome and expression of  $\beta$ -glucuronidase(GUS) gene. PCR and Northern blot analyses demonstrated that GUS gene was integrated into white clover nuclear genome and expressed into its mRNA. The expression of GUS gene into its protein was confirmed by spectrophotometric assay of GUS activity.

**Key words** : somatic embryo, transformant, *Trifolium repens* L.

### 서 언

최근 식물의 형질전환은 단자엽 식물에 적용하기에는 여러가지 어려움이 있다는 결집에도 불구하고 높은 형질전환 비율과 도입된 유전자의 안정성 때문에 *Agrobacterium*을 이용하는 방법이 가장 널리 사용되고 있다 (Puont-Kaerlas 등, 1989).

화이트 클로버는 알팔파와 이탈리아 라이글래스와 더불어 널리 재배되고 있는 주요 사료작물로, 화이트 클로버의 조직배양은 켈러스에서의 재분화 (Oswald 등, 1977) 현탁배양세포를 이용한 재분화(White, 1984), 자엽에서의 직접 재분화(White와 Voisey, 1994) 및 체세포배의 유도(Maheswaran과 Williams, 1984; Weissinger II와 Parrott, 1993)에 대한 연구결과가 보고되었다. 화이트 클로버의 형질전환은 White와 Greenwood(1987)에 의하여 시도되었으나 목초로서의

재배가치가 없는 WR8계통에서만 성공하였고, Voisey 등(1994a)도 일부의 한정된 재배종에서만 형질전환이 가능하여 화이트 클로버의 형질전환은 품종에 따라서 매우 큰 차이를 보였고 형질전환이 된 품종의 형질전환율도 1%로 매우 낮았다. 지금까지의 화이트 클로버에 대한 조직배양의 연구결과를 종합하여 볼 때 화이트 클로버의 재분화 및 형질전환은 품종에 따라서 매우 큰 차이를 보이고 있으므로 효율적으로 모든 주요 재배품종에 적용시킬 수 있는 방법의 체계화가 시급하다. 또한, 국외에서는 형질전환을 통한 신품종 화이트클로버의 육성(Voisey 등, 1994b)이 시도되는 등의 적극적인 연구활동이 이루어지고 있으나 국내의 연구는 매우 미비하여 이 분야에 대한 활발한 연구활동이 요구된다.

본 연구에서는 주요 재배품종을 pBI121(Jefferson 등, 1987)을 포함하고 있는 *Agrobacterium*을 이용하여 형질

전환시킨 후 재분화 시켰다.

pBI121은 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S를 promoter로 하여 *E. coli*의  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 유전자를 report 유전자로, neomycin phosphotransferase (NPTII) 유전자를 selection marker로 포함하고 있다. 화이트 클로버의 형질전환체는 kanamycin을 포함하는 배지에서 선발하여 PCR 및 Northern 분석과 GUS 활성을 측정함으로써 확인하였다.

## 재료 및 방법

### Plasmide 및 공시균주

본 실험에서는 식물 vector인 pBI121(Jefferson 등, 1987)을 사용하였으며 pBI121은 *E. coli* HB101을 이용하여 증식하였다. 형질전환에 사용한 균주는 pBI121로 형질전환되어진 *A. tumefaciens* LBA4404를 사용하였다.

### 화이트 클로버 형질전환 및 식물체 재분화

본 실험에서는 주요 재배품종인 Osceola와 Grasslands Tahora를 사용하였고 형질전환 및 배양을 위한 배지는 표1에 나타내었다.

먼저 종자를 2-3방울의 Tween-20을 포함하는 2% NaOCl 용액에서 20분간 표면 소독을 한 후 멸균수로 3회 세척하고 성장조절물질이 포함되어 있지 않은 MS(Murashige와 Skoog, 1962) 배지에서 암조건으로 발아시켰으며 발아 7-10일 후의 유식물의 엽, 배축을

형질전환을 위한 재료로 사용하였다. 또한, 수정후 8-10일이 경과한 미숙배로부터 Wessinger II와 Parrott (1993)의 방법에 준하여 EC6(Maheswaran과 Williams, 1984)배지에 2,4-D 40mg/L를 첨가한 EC6D-40배지에서 embryogenic callus를 유도하였으며 3주 간격으로 2회 계대배양한 후 형성된 embryogenic callus를 동일배지에 계대배양을 하여 1주일 후에 형질전환에 사용하였다. 형질전환을 위한 *A. tumefaciens*는 50mg/L kanamycin을 포함한 AB고체배지(Chilton 등, 1974)를 사용하여 27°C, 암조건에서 3일간 배양하였다.

형질전환에 사용할 *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121)는 균수가 3-5X10<sup>9</sup>/ml 정도가 되도록 3, 5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (acetosyringone, dimethyl sulfoxide에 용해하여 4°C에 보관) 100 $\mu$ M을 함유한 EC6D-40ASL 배지에 현탁시켰다. 여기에 엽, 배축 및 미숙배 유래의 embryogenic callus(약 2-3mm)를 2분 정도 공조배양을 하고 멸균 처리한 여과지 위에서 여분의 토양균을 제거시킨 후에 100 $\mu$ M acetosyringone을 함유한 EC6D-40AS배지 위에 치상하여 25°C 암조건에서 3일간 배양하였다. 3일 후 켈러스에 묻어 있는 토양균을 EC6D-40 액체배지를 이용하여 일부 제거한 후에 carbenicillin 500 $\mu$ g/mL이 함유된 EC6D-40MKC 고체배지에 치상하고 3주간 배양하여 형질전환된 embryogenic callus를 선발하였다. 선발된 카나마이신 내성 embryogenic callus를 MSO-M배지에 옮긴 후에 embryogenic callus로부터 식물체의 재분화를 유도하였다.

Table 1. Media used in this study.

Medium	Composition
AB	3g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1g/L NH <sub>4</sub> Cl, 0.3g/L MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, 0.15g/L KCl, 0.01g/L CaCl <sub>2</sub> , 2.5mg/L FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, 5g/L glucose, 15g/L agar, pH 7.2
EC6D-40	EC6 salts and vitamins, 1g/L yeast extract, 6% sucrose, 40mg/L 2,4-D, 3g/L Gelrite, pH 5.8
EC6D-40ASL	EC6 salts and vitamins, 1g/L yeast extract, 6% sucrose, 40mg/L 2,4-D, 100 $\mu$ M acetosyringone, pH 5.2
EC6D-40AS	EC6 salts and vitamins, 1g/L yeast extract, 6% sucrose, 40mg/L 2,4-D, 3g/L Gelrite, 100 $\mu$ M acetosyringone, pH 5.8
EC6D-40MKC	EC6 salts and vitamins, 1g/L yeast extract, 6% maltose, 40mg/L 2,4-D, 3g/L Gelrite, 100mg/L kanamycin, 500mg/L carbenicillin, 100 $\mu$ M acetosyringone, pH 5.8
MSO-M	MS salts and B5 vitamins(Gamborg et al., 1968), 6% maltose, pH 5.8

## Polymerase Chain Reaction(PCR) 분석

PCR 수행을 위한 genomic DNA 추출은 형질전환된 카나마이신 저항성 재분화 white clover에서 cetyltrimethyl ammonium bromide(CTAB)를 이용한 방법(Murray와 Thompson, 1980)을 이용하여 수행하였다. DNA 증폭을 위한 Primer로서는 GUS 유전자의 양쪽 말단에 상보적인 oligomers(Hamill 등, 1991) 5'-GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG-3' 과 5'-GTT TAC GCG TTG CTT CCG CCA-3' 를 합성하여 사용하였다. PCR은 0.5 unit Taq polymerase, 0.2mM dNTP, 94°C 1분간 변성, 60°C 1분 30초간 annealing, 72°C 2분간 extension하여 30 cycle을 반복하였다. PCR을 수행하여 합성된 DNA를 1.0% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후에 UV를 이용하여 증폭된 DNA(1.2kb)를 확인하였다.

## Northern 분석

재분화된 white clover의 잎으로부터 Logemann 등(1987)의 방법을 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA를 formaldehyde-agarose를 이용하여 전기영동을 한 후에 nylon membrane에 전이하였다. Northern hybridization은 pBII21을 BamHI과 SacI으로 처리하여 얻은 GUS 유전자를 probe로 하여 DIG-ELISA Labeling and Detection kit(Boehringer Mannheim, F.R.G.)의 설명서에 따라서 행하였다.

## GUS 활성분석

Kanamycin과 PCR분석을 통하여 형질전환이 확인된 white clover의 잎으로부터 Jefferson 등(1987)의 방법에 의하여 GUS활성을 분석하였다. 먼저 시료를 lysis 완충액(50mM sodium phosphate pH 7.0, 10mM -mercaptoethanol, 10mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sarkosyl)과 1:5의 비율로 막자사발에서 갈아 원심분리하고 그 상등액을 GUS의 활성도를 측정하는데 사용하였다. 시료 10 $\mu$ L를 1mL 반응액(50mM sodium phosphate pH 7.0, 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM 4-methyl umbelliferyl glucuronide(4-MUG), 0.1% Triton X-100)에 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 0.4mL의 2.5M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol를 첨가하여 반응을 종결시키고 반응액을 분광계로( $\lambda=415\text{nm}$ ) 측정

하여 GUS의 활성을 확인하였다. 총 단백질 함량의 측정은 Bradford(1976)의 방법에 따라 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### White Clover 형질전환 및 식물체 재분화

식물에 외래유전자를 도입시키는 형질전환 방법 중에서 *Agrobacterium*을 이용하는 방법은 높은 형질전환 효율과 상대적으로 긴 DNA단편을 매우 안정적으로 식물의 염색체내로 도입할 수 있으며, 복잡한 원형질체배양을 필요로 하지 않는 장점을 지니고 있다. *A. tumefaciens*를 이용하여 화이트 클로버에 형질전환을 실시한 결과는 표2와 같다.

모든 처리구에서 품종간의 차이는 보이지 않고 있으나, 형질전환에 사용한 화이트 클로버의 조직에 따라서 많은 차이를 보여 acetosyringone을 처리하지 않았을 경우 배측은 1.06%의 효율을 보인 반면 미숙배 유래의 embryogenic callus는 이보다 약 7배정도 높은 7.21%의 형질전환 효율을 보였다. 한편, acetosyringone을 처리하였을 경우에는 품종간의 차이는 보이지 않고 배측 4-5%, 잎 3.5-5%, 미숙배 유래의 배형성 캘러스는 16-19%의 형질전환 효율을 보여 acetosyringone을 처리하지 않았을 때보다 모든 조직에서 형질전환 효율이 약 3배정도 향상됨을 보여 acetosyringone의 처리가 화이트 클로버의 형질전환에 매우 효과적임을 보였다. *Arabidopsis thaliana*의 형질전환에서도 acetosyringone의 사용에 의하여 기존의 2-3%의 형질전환 효율이 55-63%로 증가함을 보였으며(Sheikholeslam과 Weeks, 1987) *Atropa belladonna*(Mathews 등, 1990)에서도 2%의 효율이 71%로 증가함을 보였다. 일반적으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 힘든 것으로 알려져 있던 단자엽 식물에서도 acetosyringone을 사용함으로써 비(Hiei 등, 1994), 옥수수(Ishida 등, 1996)등에서도 *Agrobacterium*을 이용하여 20-30%의 매우 높은 형질전환효율로 효과적으로 단자엽 식물체의 형질전환도 가능하게 되었다.

일반적으로 *Agrobacterium*이 식물에 감염하면 *Agrobacterium*의 plasmid에 존재하여 평상시에는 발현되지 않는 vir(virulence)유전자가 식물세포로부터 세포외로 방출되어지는 acetosyringone에 의하여 유도적으로 발현된다(Jefferson 등, 1987; Shimoda 등, 1990;

Table 2. Efficiency of white clover transformation by *A. tumefaciens* LBA4404 on the media with and without acetosyringone.

White clover (cultiva)	Tissue	Treatment of AS*	Inoculated calli <sup>(a)**</sup>	Transformant <sup>(b)</sup>	Frequency(%) (b/a)
Osceola	stem	-	187	2	1.06
		+	143	5	3.49
	leaf	-	154	3	1.94
		+	172	9	5.23
	immature seed	-	97	7	7.21
		+	131	21	16.03
Gardner Tahora	stem	-	151	2	1.32
		+	134	7	5.22
	leaf	-	121	2	1.65
		+	143	5	3.50
	immature seed	-	104	8	7.69
		+	125	24	19.20

\* 100 $\mu$ M 3, 5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (acetosyringone)

\*\* Cluster of 2-3mm in diameter was counted as a piece of tissue

Chen과 Winans, 1991; Banta 등, 1994). *Acetosyringone*은 쌍자엽식물에는 넓게 분포하고 있으나 단자엽 식물에는 이러한 유도물질이 존재하지 않아 *Agrobacterium*의 단자엽 식물에의 감염의 제한요인이 되고 있다 (Usami 등, 1987; Ashby 등, 1988; Messens 등, 1990). 이 밖에도 acetosyringone을 사용할 때에 효과를 높일 수 있는 방법으로 배지에 AS만을 단독으로 처리하였을 때보다는 glucose를 함께 첨가하여 줌으로써 vir 유전자의 발현이 10배 이상 높아짐이 확인되었다 (Shimoda 등, 1990).

#### PCR에 의한 White Clover의 형질전환의 확인

100mg/L kanamycin이 첨가된 EC6D-40MK 배지에서 형성된 체세포배를 MSO-M배지에서 식물체로 발아시켜 획득한 kanamycin 내성 화이트 클로버로부터 전체 DNA를 추출한 후에 PCR분석을 실시하여 외래 유전자가 화이트 클로버의 염색체내로 안정하게 도입되었는지의 여부를 확인하였다. GUS유전자에 특이적으로 상보적인 2종류의 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 증폭되어진 DNA를 1.0% agarose gel에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 염색을 하고 UV로 증폭된 DNA의 밴드를 확인한 결과, kanamycin 내성 화이트 클로버와 positive control에서는 primer

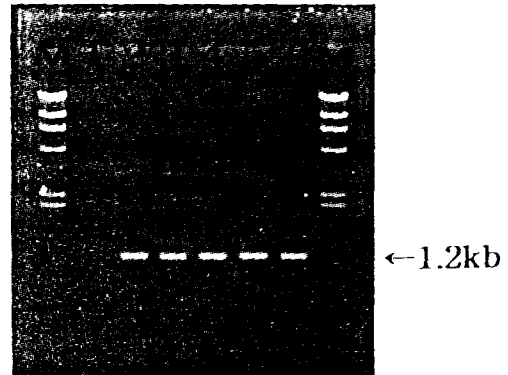


Fig. 1. Amplification of GUS gene(about 1.2kb) transgenic white clover plants by PCR: M, DNA size marker (DNA/HindIII); 1, normal plant; 2-5, putative transgenic plants.

에 의하여 증폭된 약 1.2kb의 GUS 유전자의 DNA밴드를 확인하였으나, 형질전환을 시키지 않은 화이트 클로버에서는 밴드가 확인되지 않았다(그림1).

이상의 결과로서 재분화된 kanamycin 내성 화이트 클로버는 *A. tumefaciens*에 의하여 외래 유전자가 화이트 클로버의 염색체내로 안정하게 도입되어진 형질전환체임을 확인하였다.

#### Northern 분석

화이트 클로버의 nuclear genome으로 도입된 GUS

유전자가 정상적으로 mRNA로 발현됨을 확인하기 위하여 형질전환체임이 확인된 화이트 클로버의 잎으로부터 전체 RNA를 분리한 후 Northern 분석을 실시하였다. 그림2에서 나타난 바와 같이 GUS의 mRNA와 같은 약 2.4kb에 해당하는 부위에서 강력한 band를 확인하였다. 따라서 reporter로 사용한 GUS 유전자는 화이트 클로버의 nuclear genome안으로 삽입되어 mRNA로 정상적으로 전사됨을 확인하였다.



Fig. 2. Northern blot hybridization of total RNA from leaves of nontransformed and transgenic plants: N, nontransformed plant; 1, OTW-7 line; 2, OTW-12 line; 3, GTW-6 line; 4, GTW-14 line.

#### GUS 활성의 분석

*A. tumefaciens*에 의하여 화이트 클로버에 도입된 GUS유전자가 정상적으로 발현하여 효소활성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위하여, 형질전환체의 잎으로부터 단백질을 추출하고 Bradford(1976) 방법에 의하여 단백질을 정량한 후 일정량의 단백질을 이용하여 4-methyl umbelliferyl glucuronide를 기질로 한 분

광분석법을 이용 GUS활성을 측정하였다. 표 3에서와 같이 형질전환체에 따라서는 각각의 GUS활성에 차이는 있으나, 모든 형질전환체에서 GUS활성을 확인하여 GUS유전자가 안정되게 발현됨을 확인할 수 있었다.

위와 같은 일련의 실험으로 *A. tumefaciens*를 이용하여 벼를 형질전환시킬 수 있는 시스템을 개발하였으며 도입된 유전자가 화이트 클로버의 nuclear genome으로 안정하게 도입, 유지될 뿐만 아니라 식물체내에서 mRNA와 단백질로 발현됨을 확인하였다.

본 연구의 결과는 기존의 화이트 클로버를 형질전환시킨 방법(White와 Greenwood, 1987; Voisey 등, 1994a; Voisey 등, 1994b)과 비교하여 품종에 따른 차이가 없이 높은 효율로 간편하게 외래 유전자 도입을 가능하게 하였으며, 유전자 도입을 통한 새로운 형질을 가진 화이트 클로버의 육성에 매우 효과적으로 이용될 것이다.

#### 적 요

화이트 클로버의 배축, 잎, 미숙배 유래의 embryogenic callus에 식물 binary vector인 pBI121을 포함하는 *A. tumefaciens* LBA4404를 접종하여 효과적으로 화이트 클로버를 형질전환시켰다. *A. tumefaciens*를 이용한 화이트 클로버의 형질전환은 acetosyringone을 사용함으로써 품종간의 차이가 없이 배발생 캘러

Table 3. Beta-glucuronidase activities in leaf extracts from transgenic white clover.

White clover cultiva	Transgenic plant	GUS activity*
Osceola	Non-transgenic	41
	OTW-3	3,263
	OTW-7	8,385
	OTW-12	4,453
	OTW-15	1,847
Gardner Tahora	Non-transgenic	12
	GTW-1	5,397
	GTW-6	1,545
	GTW-9	9,592
	GTW-14	6,882

\*pmoles 4-MU/min/mg protein

스에서 16-19%를 보였다. 재분화 식물체의 PCR 및 Northern 분석을 통하여 형질 전환된 화이트 클로버의 염색체내에 GUS 유전자가 안정되게 도입되었고 식물체내에서 mRNA로 발현됨을 확인하였다. 또한, GUS 유전자가 식물체내에서 단백질로 발현됨을 확인하기 위하여 형질 전환되어진 화이트 클로버로부터 단백질을 추출하고 분광분석법에 의하여 GUS의 활성을 측정하였으며, 시료간에 약간의 차이는 있으나 유의적인 GUS 활성을 확인하였다.

## 인 용 문 헌

- Ashby, A. M., Watson, M. D., Loake, G. J., Shaw, C. H. 1988. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58 super(1) toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J. Bacteriol.* 170:4181-4187
- Banta, L. M., Joerger, R. D., Howtitz, V.R., Campbell, A. M., Binns, A. N. 1994. Glu-255 outside the predicted ChvE binding site in *VirA* is crucial for sugar enhancement of acetosyringone perception by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 176:3242-3249
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantatization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Chen, C. Y., Winans, S. C. 1991. Controlled expression of the transcriptional activator gene *virG* in *Agrobacterium tumefaciens* by the *Escherichia coli* lac promoter. *J. Bacteriol.* 173:1139-1144
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P., Nester, E. W. 1974. *A. tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3672-3676
- Engstroem, P., Zambryski, P., van-Montagu, M., Stachel, S. 1987. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone. *J. Mol. Biol.* 197:635-645
- Hamil, J. D., Rounsley, S., Spencer, A., Rhodes, T. G. 1991. The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Reports* 10:221-224
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.* 14:745-750
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. 1987. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant. *EMBO J.* 6:3901-3907
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163:16-20
- Maheswaran, G., Williams, E. G. 1984. Direct somatic embryoid formation on immature embryos of *Trifolium repens*, *T. pretense* and *Medicago sativa*, and rapid clonal propagation of *T. repens*. *Ann. Bot.* 54:201-211
- Mathews, H., Bharathan, N., Litz, R. E., Narayanan, K. R., Rao, P. S., Bhatia, C. R. 1990. The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Atropa belladonna* L. by acetosyringone. *J. Plant Physiol.* 136:404-409
- Messens, E., Dekeyser, R., Stachel, S. E. 1990. A nontransformable *Triticum monococcum* monocotyledonous culture produces the potent *Agrobacterium vir*-inducing compound ethyl ferulate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4368-4372
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Murray, H. G., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucl. Acids. Res.* 8:4321-4325
- Oswald, T. H., Smith, A. E., Phillips, D. V. 1977. Callus and plantlet regeneration from cell culture of ladino clover and soybean. *Physiol. Plant.* 39:129-134
- Puonti-Kaerlas, J., Stable, P., Erickson, R. J. 1989. Transformation of Pea by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 8:321-324

- Sheikholeslam, S. N., Weeks, D. P. 1987 Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. 8:291-298
- Shimoda, N., Yamamoto, T., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y., Machida, Y. 1990. Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6684-6688
- Usami, S., Morikawa, S., Takebe, I., Machida, Y. 1987. Absence in monocotyledonous plants of the diffusible plant factors inducing T-DNA circularization and *vir* gene expression in *Agrobacterium*. Mol. Gen. Genet. 209:221-226
- Voisey, C. R., White, D. W. R., Dudas, B., Appleby, R. D., Ealing, P. M., Scott, A. G. 1994a. *Agrobacterium*-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. Plant Cell Reports 13:309-314
- Voisey, C. R., White, D. W. R., Wigley, P. J., Chilcott, C. N., McGregor, P. G. 1994b. Release of transgenic white clover plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes: An ecological perspective. Biocontrol. Sci. Technol. 4:475-481
- WeissingerII, A., Parrott, W. A. 1993. Repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in white clover. Plant Cell Reports 12:125-128
- White, D. W. R. 1984. Plant regeneration from long-term suspension cultures of white clover. Planta. 162:1-7
- White, D. W. R., Greenwood, D. 1987 Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. Plant Mol. Biol. 8: 461-469
- White, D. W. R., Voisey, C. 1994. Prolific direct plant regeneration from cotyledons of white clover. Plant Cell Reports. 13:303-308

(접수일 : 1997년 5월 30일)