

根癌农杆菌毒力调节基因在识别寄主植物及 T-DNA 转移的作用

马德钦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

土壤病原菌根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 通过遗传转化植物细胞, 引起许多植物(主要是双子叶)发生冠瘿病。转化实质在于农杆菌 DNA 中的一个特殊片段, T-DNA 从大的 (>200Kb) Ti 质粒转移到植物细胞核中。在转化细胞内 T-DNA 携带的基因(tms, tmr, tml 和 ocs) 的表达, 导致细胞无控制地瘤状增生, 合成正常植物所没有的冠瘿碱类(opines) 化合物。T-DNA 的转移是一系列很复杂的过程, 包括 T-DNA 片段被识别, 从 Ti 质粒上切割, 通过细菌和植物的细胞壁转移, 成为线状非置换的片段整合到植物染色体组。这种过程的分子细节尚不够清楚。目前对于 T-DNA 遗传转移的研究主要集中在三个方面: (1) T-DNA 边界(border) 序列。(2) 染色体毒力 chv 座位。(3) Ti 质粒毒力(vir) 区座位。农杆菌与植物寄主相互作用的研究, 将为阐明致病菌如何发现敏感的寄主, 并对其作出初始侵染反应提供有用模式, 也为利用 Ti 质粒于植物遗传工程载体的研究, 提供重要的理论基础。本文将从上述三方面, 特别是 vir 区对植物信号分子的识别及促进 T-DNA 的转移所起的作用予以介绍。

(一) 细菌对植物细胞的吸附和识别

1. 染色体毒力区 chv 座位的作用: 农杆菌附着在植物寄主细胞特定的位置上与植物细胞结合(binding), 是使 T-DNA 转移及形成冠瘿瘤所必需的初始条件^[4]。细菌表面成分及植物细胞壁的感受器性质对农杆菌吸附和结合到植物细胞表面起重要作用。已经知道, 植物表面感受器是果胶^[4], 细菌的感受器是脂多糖(LPS)^[12,27]。农杆菌附着到植物细胞感受器后, 合成纤维素小纤丝, 把细菌固定在植物细胞壁

上, 并把其他农杆菌聚在一起, 形成大的聚集体在细胞表面, 以利 T-DNA 的转移^[12]。

用 Tn 5 诱变致病的农杆菌, 得到了不能再附着到植物细胞的染色体突变株。遗传分析证明, 章鱼碱菌株 A 6 的染色体毒力区含有两个不同作用但又连锁的座位, 大小分别为 1.5 和 5 Kb, 称 chvA 和 chvB^[3]。这些座位的表达是组成型的。chvB 座位与苜蓿根瘤菌的 ndvA 和 B 基因有同源性, 功能相似。chvB 的突变是多效性的, 主要影响细菌的运动性能, 不能合成胞外多糖 β -1, 2-葡聚糖^[14], 丧失附着植物细胞的能力, 不能致瘤。chvA 座位的突变并不影响细菌合成 β -1, 2-葡聚糖。虽然此座位突变会使农杆菌丧失致病力, 但其基因产物的功能尚不清楚。

最近报道农杆菌染色体毒力区突变株 attC 43 和 attC 69, 其座位在 Hooykaas 的染色体图的 met-6 及 trp-2 区附近, 此突变株不能合成纤维素小纤丝, 也不能附着在植物细胞壁上^[15]。

2. 植物信号分子的作用: 虽然 T-DNA 是 Ti 质粒中唯一能稳定维持在植物染色体组的成份, 但 T-DNA 中所有基因均不能使它自身转移和整合。T-DNA 转移到植物细胞主要靠 Ti 质粒的毒力(vir) 区起作用, 但 vir 区并不转移进植物的染色体。在农杆菌中, 当染色体毒力座位 chvA, chvB 及 Ti 质粒的 vir 座位与 T-DNA 处在反式(trans) 功能构型时, T-DNA 才能转移^[18]。vir 区的 vir 座位是可以诱导的, 它可对植物细胞识别及随后促使 T-DNA 转移。

在植物-细菌相互作用中, vir 诱导及表达的因素需要两方面, 一是植物细胞能合成诱导

vir 表达的信号分子,另一是能促使细菌对信号分子识别和作出反应的调节系统。使用克隆在 cosmid 的 pTiA6 vir 不同片段,用 Tn3-lacZ 转座子插入诱变,得到一系列 vir::lac 突变株,测定其 β -半乳糖苷酶的活性作为 vir 基因表达的证明^[18]。这些菌株和烟草细胞悬浮物共培养时,烟草能产生诱导细菌 vir 基因表达的植物信号分子。经纯化和鉴定,这是一类含酚化合物,主要是乙酰丁香酮(4-乙酰-2,6-二甲基苯酚)(简称 AS)和 α -羟基乙酰丁香酮(简称 OH-AS)^[17],此外尚有其他一些植物分泌的及商品来源的酚类化合物也能起诱导作用,但效果稍差。农杆菌在培养时不需与植物细胞一起,但只要与 AS 或 OH-AS 化合物接触, vir 调节子就能全部活化。在自然界中,农杆菌只侵染受伤植物,AS 及 OH-AS 是由伤口受刺激后所产生,分泌到体外,并为土壤中的农杆菌所利用。AS 的作用分两步,在低浓度时使农杆菌向着受伤的植物细胞移动,在植物细胞附近,高浓度的(比前者高达 100 倍)AS 诱发 vir 调节子功能表达,促使 T-DNA 转移。植物信号分子在植物根际中经常存在,已经知道的根瘤菌的 nod 基因的表达是受类黄酮物质所诱导。

(二) Ti 质粒毒力 (vir) 区的作用

突变分析已经证明,除了 T-DNA 外,邻接在 T-DNA 旁边的长约 35 Kb 的 vir 区对于 Ti 质粒的毒力是不可缺少的。章鱼碱和胭脂碱 Ti 质粒的 vir 均含有 6 个座位,此外还有第 7 个座位,章鱼碱 Ti 质粒是 virF,胭脂碱质粒为 tzs^[22](图 1)。不同 Ti 质粒的 vir 区有极大同源性, Ti 与 Ri 质粒的 vir 区亦有些同源。在 vir 中,四个操纵子 virA, virB, virD 和 virG 对瘤的诱导是绝对不可缺少的,而其余三个, virC, virE 及 virF 只对个别品种才需要。对 vir 的突变可以通过导入野生型 Ti 质粒的 vir,甚至 Ri 质粒的 vir 所互补。各种 Ti 及 Ri 质粒 vir 编码的功能彼此基本相似。现在对大部分 vir 基因的核苷酸序列已分析清楚。vir 基因的活化是农杆菌对敏感植物伤口液汁释放的代谢物识别的结果。

1. virA 和 virG 座位: 利用大肠杆菌 lacZ 基因作为报告基因对 pTiA6 的 vir 启动子研究表明, virA 的表达是组成型的,不能诱导。virG 则既是组成型的,又有少许诱导性^[18]。virB, virC, virD 和 virE 能为植物分泌物活化,诱导表达,属可诱导型。virF 是否可诱导目前尚不清楚。

组成型的 virA 和 virG 基因突变后,能使植物分泌的信号物或 AS 对所有的 vir 基因的诱导作用消失,说明 vir 基因是单个调节子构成的,它们被植物细胞的诱导是由 virA 和 virG 编码的正调节要素所控制^[28]。

2. vir 区表达的调控: 分析 virA 和 virG 的核苷酸序列表明,两者均为单顺反子,编码蛋白分子量分别为 92 Kd 和 27 Kd。virA 蛋白的氨基末端含有“信号”序列和“停止转移”序列。前者位在细胞质膜上,后者在周质上。根据最近发表的对大肠杆菌调节蛋白 NtrB, NtrC 和 OmpR 的研究资料表明,与农杆菌 vir 调节子性能很相似,因而提出 virA 和 virG 调控 vir 基因转录的作用模式^[9,28]: (1) virA 产物是一种结合在细胞膜上的起着化学感受器功能的蛋白质,能传递细胞外的信号。(2) virA 与信号化合物相互作用后,可能通过磷酸化和去磷酸化作用转换 virG 产物由不活化状态为活化状态。(3) virG 活化后,物理结合到它所调节的其他 vir 基因启动子上,从而活化其他启动子(图 1)。许多研究也证明了 virA 起化学感受器的作用。

3. virB 和 virD 座位: virD 是 vir 区中最基本的座位,由四个编码蛋白组成。virD1 和 virD2 操纵子的功能是识别 T-DNA 边界及对 T-DNA 加工(见后文)。

virB 座位较大,由几个不同的蛋白编码顺序组成。virB 蛋白在被诱导的细菌中大量存在,因此它可能在细菌与植物细胞相互作用中起“运输器”作用。

4. virC, virE 和 virF 座位: virC 由两个分子量为 25.7 和 22.7 Kd 编码蛋白顺序组成,称为 virC1 和 virC2。virC 座位的突变会使

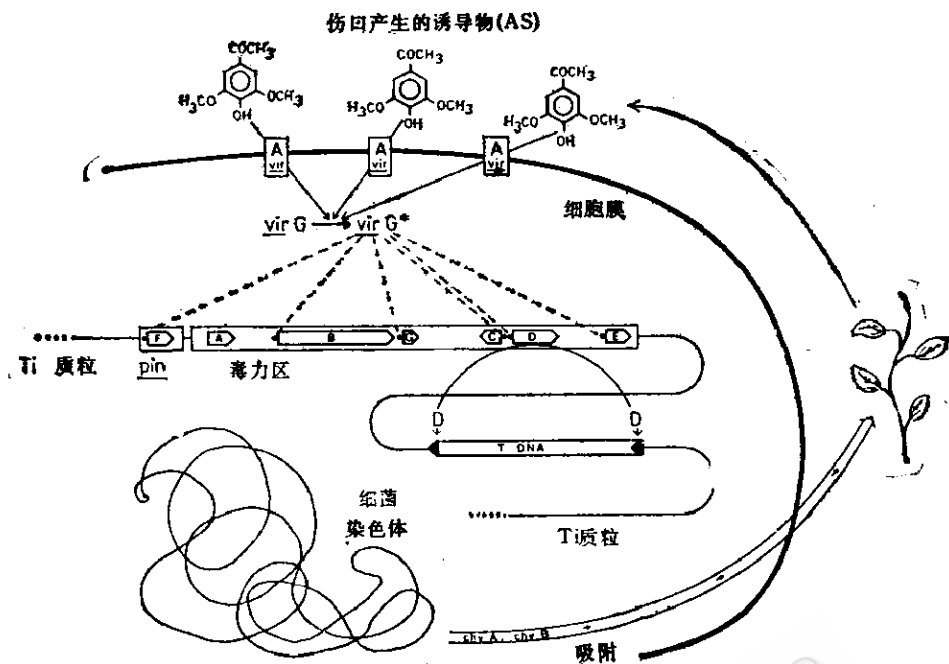


图1 *virA* 和 *virG* 调节 *vir* 基因转录示意图^[7]

农杆菌在染色体 *chvA* 和 *B* 座位的产物作用下附着到植物细胞表面, 诱导物 AS 与处在细胞膜上的 *virA* 产物相互作用, *virA* 起化学反应器作用, *virG* 产物被活化, 继而再结合到其他 *vir* 座位上, 促进其转录。其中 *virD* 产物对 T-DNA 边界起作用

农杆菌寄主范围交互改变: *virC* 突变株对某些植物不能致瘤, 但对另一些植物却可以。 *virC* 座位对某些葡萄品种还能引起超敏反应, 不致病, 而 *virC* 突变株没有此反应, 能使葡萄致瘤^[29]。因此, 此座位对提高 T-DNA 的转移效率起作用, 但有时并不是不可缺少的。 *virC* 的产物是在 T-DNA 转移过程的后期起作用。

胭脂碱 *virE* 座位大小约 2 Kb, 编码蛋白质为 69 Kd。 章鱼碱 *virE* 则为编码 7 Kd 和 66 Kd 的两个多肽。关于 *virE* 的功能尚有许多争论, 主要原因是不同的作者用不同的材料和方法。现在只知道它的突变会影响农杆菌寄主范围^[6]。 *virE* 蛋白对 T-DNA 整合进植物染色体亦起作用。它的基因产物能由细菌分泌出来, 在细胞外起作用。

virF 的功能尚不太清楚, 可能与 T-DNA 的转移效率有关^[9]。

(三) 葡萄农杆菌的窄寄主范围的部分原因是由于 *virA* 基因的缺陷

农杆菌寄主范围的决定因素是在 Ti 质粒

上, 染色体的影响不大。从葡萄上分离到的农杆菌具有很窄的寄主范围, 只能侵染一种或几种寄主植物。对窄寄主范围 (LHR) 的葡萄农杆菌 A 856 菌株 (含 pTiAg 162) 的研究发现, 通过基因互补法补入广寄主范围 (WHR) Ti 质粒 pTiA6 的三个编码座位: (1) T-DNA 中的 *tmr* 座位, (2) *virC* 座位, (3) *virA* 座位, 可以使 A 856 菌株寄主范围扩大^[29]。反之, WHR 菌株 A 348 不能侵染葡萄。如果把 LHR 菌株的 *virA* 基因互补到此菌株, 则可获得使葡萄致瘤能力。可见两类农杆菌的 *virA* 基因功能是不同的, 分子杂交没有见到同源性。通过序列分析比较, 观察到两者编码蛋白质的大小相似。在蛋白质的羧基末端保守, 但氨基末端则变化很大。有关实验结果认为^[28], WHR 和 LHR 菌株的 *virA* 蛋白在细菌的周质区是很不相同的。LHR 菌株的 *virA* 蛋白可以识别葡萄寄主产生的特异诱导分子, 而不能识别葡萄农杆菌所不能侵染的其他寄主所产生的信号分子。LHR 菌株所能侵染的植物, 例如葡萄

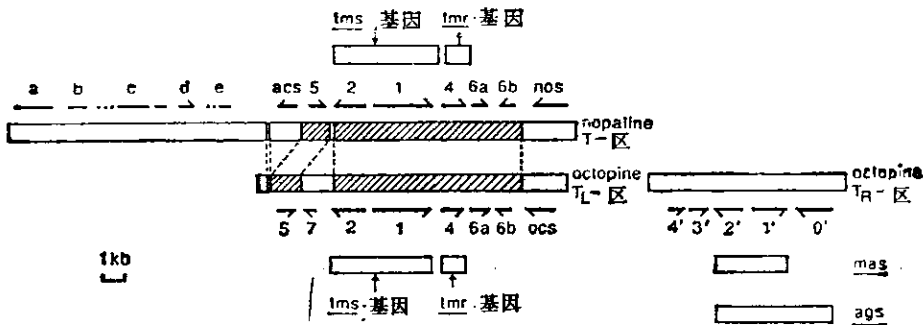


图2 胭脂碱(图上部份)和章鱼碱(图下部份) Ti 质粒的 T-DNA 功能结构图^[7]
 箭头表示各种基因及其在转化植物细胞的转录方向 nos 胭脂碱合成 acs 农杆菌素碱合成
 mas 甘露碱合成 ags 农杆菌素碱合成 ocs 章鱼碱合成 斜线表示两类质粒间的同源区

是否会合成诱导化合物以及该化合物的结构,还待进一步研究。寄主范围也是致瘤的初始阶段的反应,它的研究对了解细菌-植物相互作用很有意义。

从我国葡萄分离到的农杆菌 MI3-2 的寄主范围也曾经过深入研究^[11],这种窄寄主的菌株不能侵染落地生根等植物,但当互补入 WHR 菌株 A 348 (pTiA 6) 的 tmr 或 virA 座位,则可以扩大 MI3-2 菌株的寄主范围。

(四) 超毒力菌株 A 281 的致病能力与 vir 的关系

农杆菌 A 281 菌株含有 pTiBo 542 质粒,与一般农杆菌比较,其寄主范围更宽些,所诱导的冠瘿瘤更大些,且瘤的发生也早。它还能在普通农杆菌不易侵染的植物(如大豆等)上致瘤,称为超毒力菌株^[7]。通过对 pTiBo 542 毒力区的分析试验,用基因互补法把 pTiBo 542 vir 区的各片段 DNA 分别接合到农杆菌 A348 (pTiA6) 菌株中,观察到 vir 能使 A 348 对植物的毒力提高到 A 281 菌株的表型水平,表明 A281 的超毒力表型的部分原因是由 Ti 质粒的 vir 座位所决定。进一步 vir 区各座位再用转座子插入诱变,以及亚克隆每个座位,试验每个座位的致瘤能力,证明 pTiBo 542 的 virG 座位对提高 A 348 菌株的毒力起主要作用。pTiBo 542 的 vir 区用来作为转化植物的两元载体系统,提高对植物的转化效率有很大潜力。

(五) T-DNA 边界在转移中的作用

章鱼碱和胭脂碱型 T-DNA 的功能结构

由图 2 表示。胭脂碱型 T-DNA 大小约 24Kb。在章鱼碱的 T-DNA 中,则有左侧 (T_L) 和右侧 (T_R) (长度各为 14 Kb 和 9 Kb) 之分,两者之间由中间区(T_C-区)隔开。因此,T_L-DNA 和 T_R-DNA 各具有左右两个 25 bp 重复序列。

Ti 质粒的 T-DNA 含有三个致瘤基因(章鱼碱 Ti 质粒在 T_L-DNA 上): 基因 1 和 2 (tms1 和 tms2 座位) 在转化细胞内合成生长素,基因 4 (tmr 座位) 合成细胞分裂素。另有一个(或多个)基因编码合成瘤的特异性产物冠瘿碱 (opines)。T-DNA 的两端分别联接着 25 个碱基对顺向重复序列,称 T-DNA 边界 (border)。T-区内致瘤基因的突变能改变植物瘤的形态,甚至丧失致瘤能力,但不会影响 T-DNA 的转移能力^[9]。影响 T-DNA 转移有关的两个因素是 vir 区和边界重复序列^[2,6]。细菌染色体毒力 (chv) 座位也起一定作用。经过许多研究知道,左右两边界重复序列的功能不同。左边界重复序列缺失,对 T-DNA 转移到植物细胞影响不大^[5,8],而右边界重复的缺失,则几乎丧失转移能力^[26]。因此,右边界比左边界重要,缺一不可。

左侧和右侧 25 bp 重复在其序列水平上几乎完全同源(图 3),例如胭脂碱 Ti 质粒 pTiT37 和 pTiC 58 的 T-区,左边界与右边界 25 bp 中有 21bp 是保守的。相同情况在章鱼碱 Ti 质粒的 T_L 和 T_R-DNA 边界末端也重复出现。这样,推想不太可能由于它们在边界重复上的

相同碱基 : GGCAGGATATATxxxxTCTAAxx

LB oct. TL-DNA: GGCAGGATATATTCAATTGTAAAC

RB oct. TL-DNA: GGCAGGATATATACCGTTGTAATT

LB oct. TR-DNA: GGCAGGATATATCGAGGTGTAATA

RB oct. TR-DNA: GGCAGGATATATCGCGTTGTAATT

LB nop. T-DNA: GGCAGGATATATTGTGGTGTAAAC

RB nop. T-DNA: GGCAGGATATATTGGCGGTGTAAC

LB Ri TL-DNA: GGCAGGATATATTGTGATGTAAAC

RB Ri TL-DNA: GGCAGGATATATTGTCTGTCTATG

图3 25 bp 边界重复顺序比较^[22]

oct 章鱼碱 LB 左侧边界序列 nop 胭脂碱 RB 右侧边界序列 Ri 发根诱发质粒 TL-左侧 DNA TR-右侧 DNA ××××表示碱基不同处

微小不同而引起功能不同。最近发现在章鱼碱 Ti 质粒的 TL-DNA 右边界重复序列的右侧存在一个 24 bp 的序列,称“强化因子”^[21]或“超驱动子”^[23](overdrive)。它能增强边界对 T-DNA 的转移而本身并不起转移作用。左侧则没有增强因子。增强因子的核心序列 5'TGTTGTGTT3' 在不同 Ti 质粒中互相同源。

边界重复序列与 T-区连接的方向对 T-DNA 的转移过程很重要。当右边界倒转过来接在 onc 基因时,T-区的转移效果极低^[26,23,26],此结果也表明,T-DNA 向植物细胞的转移是极性的。此外,右边界如果由左边界代替,也影响转移效率,但左边界旁接增强因子时,则左右边界的功能相同^[23]。

利用两元运载体系统转化植物细胞的研究,进一步揭示边界序列的重要功能:即(1)DNA 只要连接到一个边界就可使之转移。(2)一般右边界比左边界转移更有效。(3)对于小的两元载体,边界与选择性标记的连接方向对转化效率影响不大。(4)含有两个边界的两元载体,不仅位于两边界间的而且位于边界两侧的 DNA 都能转移。

(六) 农杆菌-植物的接合转移

已经知道农杆菌自身不能进入植物细胞内,因此 T-DNA 转移进细胞的可能性有两

种,一是整个 Ti 质粒穿过细菌和植物细胞膜,然后 T-DNA 稳定整合进植物染色体组,Ti 质粒其余部分丧失,另一可能是在细菌细胞内 T-DNA 从 Ti 质粒上被切下来,称为 T-DNA 加工 (processing)。只有 T-DNA 才能进入植物细胞。

最初的研究认为,T-DNA 在转移时首先形成中间结构物 (intermediate),而且呈环状形式^[2,3,31]。其起因可能是因左右两边界间的重组或切割-连接反应的结果。最近有许多试验表明,这种中间物是单链线状 T-DNA 分子,称 T-链^[29,30]。这是由于在 T-DNA 底链左右边界重复处均发生切口所引起的。进一步测定出在章鱼碱 Ti 质粒中这种切口的精确位置是在 TL-DNA 的底链,左边界及右边界 25 bp 重复处左边第三个或第四个碱基中间^[1,3,25,30](图4),亦发现在少数 TL-DNA 的顶链 25 bp 处也可产生切口,因而出现双链 T-DNA 被切下的情况^[23]。

综合 T-DNA 加工研究的遗传和物理分析资料,可以认为由 vir 基因表达所诱导的 T-DNA 中间物的结构呈多种形式:在边界产生缺口和双链切下的双链 Ti 质粒 DNA; 双链线状 T-DNA; 单链线状 T-DNA, 环状 T-DNA。由于不同研究者使用的材料和方法不同,很难估计每种中间物所产生的频率。但共价闭合的 T-DNA 环状分子出现频率却很低^[29]。目前尚难把上述 T-DNA 不同的加工现象统一为一种明确的模式。尽管如此,有人建议^[9],双链切割,底链或顶链产生切口,含粘性末端的线状双链 T-DNA 分子的产生,可能由于 T-DNA 边界受到交替切口而被切下,产生线状双链 T-DNA,此结果称切割模式(图5)。而底链和 T 链在边界序列切口,则形成线状单链 T-DNA,称接合模式或复制模式(图6)。单链 DNA 向植物的转移是从左到右,即从 5' 到 3' 方向进行,类似大肠杆菌间 DNA 的接合转移现象。

两元运载体系统(即把 T-DNA 和毒力区处在农杆菌细胞内不同的复制子中)实际上是模

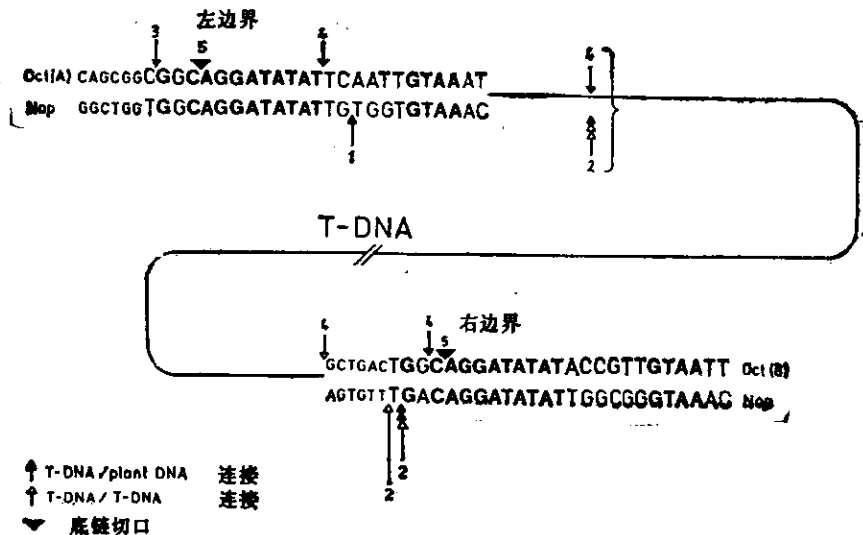


图4 植物 DNA 与 T-DNA 的交界序列^[2]

(A) 和 (B) 表示章鱼碱边界重复序列，大字母为 25 bp 边界序列，粗字母为保守序列，各箭头分别指示 T-DNA 和植物 DNA 或 T-DNA 和 T-DNA 的连接位置，图中亦指出章鱼碱 Ti 质粒底链切口的位置

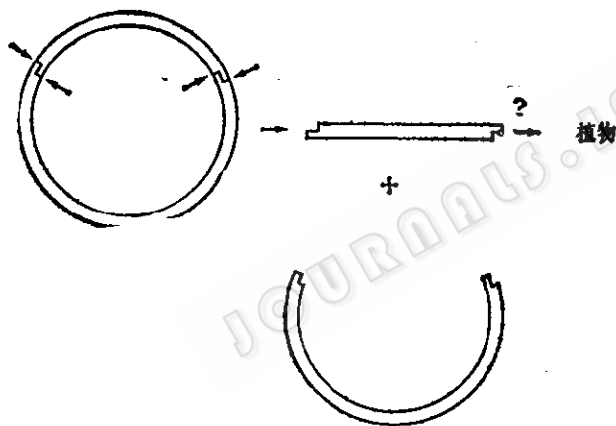


图5 T-DNA 转移的切割模式^[2]

在 *virD* 蛋白的诱导下，在左侧和右侧 25 bp 序列的特定位点上发生交叉双链切口，把 T-DNA 从 Ti 质粒上切下。产生的双链线状 T-DNA 能够进入植物细胞，Ti 质粒其余部分最后被降解掉

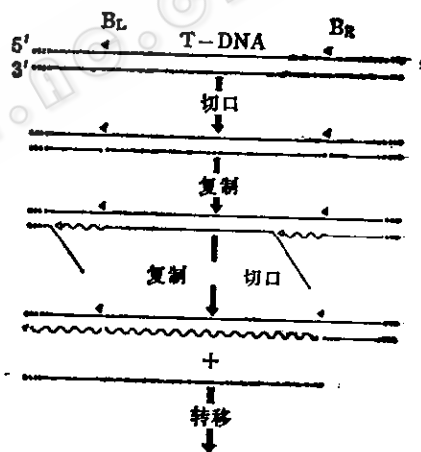


图6 T-DNA 转移的接合模式图^[2]

在 *vir* 的诱导下，T-DNA 底链的左侧 (B_L) 和右侧 (B_R) 边界序列单链核苷酸内产生切口，切割产生游离的 3'OH 基，引导合成 DNA，以顶链为样板，DNA 的合成从右边界开始一直到左边，代替 5'→3' 的底链。这样产生的线状单链分子，从细菌细胞中转移出来

仿 T-DNA 的自然转移过程，表明 T-DNA 无需与 Ti 质粒其余部分进行物理连接。

vir 座位对 T-DNA 的转移起重要作用。*virD* 座位 5' 末端蛋白产物可能在 T-DNA 的 25 bp 顺向重复处结合，在特定位点上切口，产生单链或双链，或环状 T-DNA 中间物。*virD*

的作用是必不可少的。另外，*virE* 及 *virC* 座位亦起一定作用。

参 考 文 献

- [1] Albright, M. et al.: *J. Bacteriol.*, 169: 1046—1055, 1987.
- [2] Alt-Moerbe, J. et al.: *EMBO J.*, 5: 1129—1135,

- 1986.
- [3] Douglas, C. J. et al.: *J. Bacteriol.*, **161**: 850—860, 1985.
- [4] Halverson, L. J. and G. Stacey: *Microbiological Reviews*, **50**: 193—225, 1986.
- [5] Hille, J. et al.: *Plant Mol. Biol.*, **2**: 155, 1983.
- [6] Hooykaas, P. J. J. et al.: *Plasmid*, **11**: 195—205, 1984.
- [7] Jin, S. et al.: *J. Bacteriol.*, **169**: 4417—4425, 1987.
- [8] Joos, H. et al.: *EMBO J.*, **2**: 2151—2160, 1983.
- [9] Koukolikova-Nicola, Z. et al.: In: Hohn, Th. and J. Schell (ed.), *Plant DNA Infectious Agents* pp. 110—148, Springer: Verlag Wien-New York, 1987.
- [10] Leroux, B. et al.: *EMBO J.*, **6**: 849—856, 1987.
- [11] Ma, D. Q. et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **53**: 1338—1343, 1987.
- [12] Matthyse, A. G.: *CRC Critical Reviews in Microbiology*, **13**: 281—287, 1986.
- [13] Peralta, E. G. et al.: *EMBO J.* **5**: 1137—1142, 1986.
- [14] Puvanesarajah, V. et al.: *J. Bacteriol.*, **164**: 102—106, 1985.
- [15] Robertson, J. L. et al.: *J. Bacteriol.*, **170**: 1408—1411, 1988.
- [16] Rubin, R. A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **202**: 312—320, 1986.
- [17] Stachel, S. E. et al.: *Nature*, **318**: 624—629, 1985.
- [18] Stachel, S. E. and E. W. Nester: *EMBO J.*, **5**: 1445—1454, 1986.
- [19] Stachel, S. E. et al.: *Nature*, **322**: 706—712, 1986.
- [20] Stachel, S. E. et al.: *EMBO J.*, **6**: 857, 1987.
- [21] Van Haaren, M. J. J. et al.: *Cell Biology*, **4**: 203, 1986.
- [22] Van Haaren, M. J. J. et al.: In: Diter von Wettstein (ed.), *Plant Molecular Biology*, Plenum Press. pp. 541—564, 1987.
- [23] Van Haaren, M. J. J. et al.: *Plant Mol. Biol.*, **8**: 95, 1987.
- [24] Veluthambi, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**: 1881—1885, 1987.
- [25] Wang, K.: *Science*, **235**: 587, 1987.
- [26] Wang, K. et al.: *Cell*, **38**: 455—462, 1984.
- [27] Whatley, M. H. et al.: *Infect. Immun.*, **13**: 1080—1083, 1970.
- [28] Winans, S. C. et al.: In: Diter von Wettstein (ed.), *Plant Molecular Biology*, Plenum Press. pp. 541—564, 1987.
- [29] Yanofsky, M. et al., *Mol. Gen. Genet.*, **201**: 237—246, 1985.
- [30] Yanofsky, M. et al.: *Cell*, **47**: 471—477, 1986.
- [31] Yamamoto, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **206**: 174—177, 1987.