

# 形質轉換에 의한 *Ti Plasmid*의 *Bradyrhizobium japonicum*에의 導入

尹漢大 · 趙武濟 · 朴贊英 · 李啓瑚\*

慶尙大學校 農科大學 農化學科, \*서울大學校 農科大學

(1987년 3월 24일 수리)

## Introduction of *Ti Plasmid* into *Bradyrhizobium japonicum* by Spheroplast Transformation

Han-Dae Yun, Moo-Je Cho, Chan-Young Park and Ke-Ho Lee\*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Gyeongsang National University, Jinju,\* College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

### Abstract

*Bradyrhizobium japonicum* spheroplasts were prepared by culturing cells in the presence of glycine, followed by treatment with lysozyme. The cells were examined by electron microscopy during the formation of spheroplast. Then *Ti plasmid* from *Agrobacterium tumefaciens* 15955 was introduced into *Bradyrhizobium japonicum* by glycine-lysozyme induced spheroplast transformation. After cell wall regeneration, transformants were selected by the ability of utilization of octopine. Transformation were received at a frequency of  $1 \times 10^{-7}$ . The transformants obtained from spheroplast transformation harbored the introduced *Ti plasmid*, which was identified by agarose gel electrophoresis. Furthermore, the differences in their gene products were observed between the transformant and the recipient cell by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. The transformants which still possessed the same ability nodulate soybean (*Glycine max.*) as that of the original host strain, acquired the ability to induce tumor on *Petunia hybrida* like *Agrobacterium*, but formed the small crown galls in size compared to those of *Agrobacterium tumefaciens*.

### 서 론

최근의 새로운 분류법<sup>1,2)</sup>에 의하여 *Rhizobiaceae*에서는 *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*속 등으로 나누고 있으며 이들중에서 fast group *Rhizobium*속과 slow group인 *Bradyrhizobium*속의 근류군은 두과 작물과 공생하여 호혜적인 관계가 있으나 *Agrobacterium*속은 쌍자엽 식물에 암을 유발시킨다. 특히 *Agrobacterium tumefaciens*에서 분리한 *Ti plasmid*는 식물에 gall을 형성시키는 능력을 확인하고 이를 이용하여 식

물체내로 어떤 유용한 유전자 도입을 위한 vector로써 개발되고 있다<sup>3,4)</sup>.

한편 근류군의 유전자 교환에 관한 연구는 대부분 fast group에 집중되어 있으며 slow group에 대한 연구는 적은 편이다. 현재로써 유전자의 교환에 관한 연구로 형질전환이나 접합에 의한 방법이 주로 시도되었는데 Khmel'nitsky<sup>5)</sup> 등은 P-1 group의 plasmid를 *Rhizobium*에 전이시킨 보고가 있으며 *Rhizobium*과 *Agrobacterium*속 간의 유전자 교환으로 HooKaas등<sup>6,7)</sup>이 *Agrobacterium tumefaciens*의 *Ti plasmid*를 *Rhizobium trifolii*에 접합법에 의해 conjugant를 얻은 바가 있으나

*Bradyrhizobium* 속 균은 유전자 교환의 연구가 잘 되지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 실험에서는 *Bradyrhizobium japonicum*의 유전자 도입을 위한 수단으로 spheroplast를 사용하여 그 가능성을 조사하였다. 이에 따른 실험 방법으로 전보<sup>8,9)</sup>에서 분리 확인된 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS26의 spheroplast를 형성하고 Ti plasmid를 형질전환법에 의하여 도입하여 얻어진 transformant의 특성을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 사용 균주

본 실험에서 사용한 균주는 전보<sup>8)</sup>에서 분리한 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26과 미국 위스콘신대에서 분양받은 *Agrobacterium tumefaciens* 15955, Ach5, C58 및 A208을 사용하였다.

#### 2. 사용 배지

균의 배양 및 보관을 위해서는 yeast extract mannitol (AMA) 배지<sup>10)</sup>를 사용하였으며, *Bradyrhizobium japonicum*의 합성최소배지로 RMM<sup>11)</sup> 배지, Ti plasmid 형질전환의 선별을 위해서 RMM 배지에서 탄소원과 질소원으로 mannitol과 KNO<sub>3</sub> 대신 octopine을 최종 농도가 250µg/ml되게 첨가하여 사용하였다.

*Agrobacterium tumefaciens*의 영양요구성을 검토하기 위해서는 Klapwijk 등<sup>12)</sup>이 사용한 SM 합성배지를 사용하였으며 영양요구성 검토시에는 질소원으로(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 대신에 octopine혹은 nopaline을 최종 농도가 100µg/ml되게 조정하여 사용하였다.

형질전환을 위해 spheroplast를 형성한 후 균의 삼투압에 대한 안정성을 유지하기 위하여 YS-14 배지의 기본 조성에서 안정제로 sucrose를 14% (W/V)되게 각각 분리 살균하여 혼합후 사용하였으며<sup>13)</sup> plasmid 분리시 사용한 배지는 Beringer<sup>13)</sup>가 사용한 TY 배지를 사용하였다.

#### 3. Spheroplast형성 및 형질전환

세균을 20ml TY배지에서 2×10<sup>9</sup> cells/ml 정도 되게 배양한 다음 원심분리하여 glycine이 0.03% 함유된 YS-14배지에 현탁시킨 후 100rpm으로 조정된 회전식 진탕배양기에 배양시켰다. 24시간 후에

lysozyme을 300µg/ml되게 배지에 첨가하여 24시간 처리하여 spheroplast를 형성시킨 다음 5,000xg에서 원심분리하고 여액(약 100µl정도)에 균일하게 현탁시켜 Ti plasmid DNA 5µg을 함유한 Tris-EDTA buffer<sup>14)</sup>을 50µl가하고 다시 PEG용액 0.4ml를 첨가한 후 5분간 incubation하여 형질전환시켰다.

이때 대조구는 Ti plasmid DNA를 함유하지 않고 Tris-EDTA buffer만을 첨가한 것으로 하였다. 세포벽 재생을 위해 glycine이나 lysozyme이 없는 YS-14배지에서 50rpm의 진탕배양기로 7~10일간 배양하여 정상세포로 전환시켰으며, 형질전환되는 비율은 transformant colony수에서 본래 생성된 spheroplast수를 나누어서 계산했다.

Spheroplast의 생균수는 0.1M Tris-Cl와 4% sucrose배지에서 serial dilution법에 의하여 측정하였다.

#### 4. Plasmid DNA분리

Ti plasmid 대량 분리는 Currier과 Nester 방법<sup>15)</sup>을 사용하였으며 근류균의 plasmid분리를 위해서는 상기 방법을 개선한 Casse법<sup>16)</sup>을 사용하였다. 전기영동은 0.7% agarose에 running buffer는 TBE를 사용하여 초기 1시간 동안에는 8mA, 다음 3시간 정도는 40mA전압으로 전기영동한 후 polaroid MP camera 및 type 667 film으로 촬영하였다.

#### 5. 이차원 전기영동법에 의한 균체단백질 분석

이차원 전기영동법은 전보<sup>9)</sup>에 준하였다.

#### 6. Pouch재배법<sup>17)</sup>

근류 형성과정의 현미경 관찰을 위해 pouch재배법에 의하여 대두를 재배하였다. 살균된 pouch(S/P seed-pack, Scientific Products No.B1220)에 무질소 수경재배액 40ml를 넣고 대두 종자(*Glycine max.*)를 표면살균한 후 pouch상단에 심고 transformant를 식물당 10<sup>8</sup> cells 이상되게 접종하여 근류형성과정을 관찰하였다.

#### 7. Oncogenicity 시험

*Bradyrhizobium japonicum* 균주내로 형질도입된 Ti plasmid DNA의 oncogenicity 능력이 *Bradyrhizobium*내에서 발현되는 가를 조사하기 위하여 transformants를 살균 주사기로 페추니아 줄기

에 상처를 내어 tumor 상태를 4주 후에 조사하였으며 대조군 *Agrobacterium* strain 15955와 무접종 대조구와 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 영양요구성 배지선정**

*Agrobacterium tumefaciens*는 균주에 따라서 octopine과 nopaline의 이용성에 따라 크게 두 group으로 대별되는 데<sup>1)</sup> 본 실험에서 사용된 *Agrobacterium tumefaciens* 균주의 octopine 혹은 nopaline의 이용성을 확인하기 위하여 이들의 최종 농도가 SM-N이나 RMM-C,N배지에서 250µg/ml 가 되도록 첨가한 배지상에서 생육 정도를 관찰하였다. 각 균주를 선택 배지에 접종한 후 2일후에 나타난 결과를 Table 1에 나타냈다. Table 1에서 처럼 15955와 Ach 5균주는 octopine 요구성이었으며 C58과 A208 균주는 nopaline 요구성을 나타내었다. 그 중에서도 15955는 다른 균주에 비하여 성장이 좋은 것으로 나타나서 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26의 형질전환을 위한 donor

plasmid DNA의 분리 균주로 선택하였다. Ti plasmid를 함유한 transformant의 선별을 위해서는 RMM-C, N+octopine+carbenicillin(100µg/ml)배지에 선택하였다. 여기서 carbenicillin을 첨가하는 이유는 분리한 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26의 항생물질 내성실험에서 carbenicillin에 대한 저항성을 가지고 있었으며 *Agrobacterium tumefaciens* 15955는 carbenicillin에 대한 감수성을 나타내었기 때문에 transformant의 선별시 Ti plasmid 분리과정이나 실험과정에서 *Agrobacterium tumefaciens*의 혼입 가능성을 고려할때 carbenicillin의 첨가는 목적하는 colony분리를 위해 매우 효과적인 결과이었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 RMM-C,N 배지에서는 시험균주의 생육이 관찰되지 않았다. RMM-C,N+octopine 배지에서 분리균 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26은 생육하지 못하였으나 Ti plasmid가 도입된 transformant에서는 생육이 가능하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26 균주에 Ti plasmid가 도입되어 octopine 함유배지에서 생육이 가능한

**Table 1.** Growth characteristics on selective media

Strains Media	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ROKS 26	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>				Transformants
		15955	Ach5	C58	A208	
AMA	+	+	+	+	+	+
SM	+	+	+	+		
SM-N <sup>2)</sup>		-	-	-	-	
SM-N+oct <sup>3)</sup>	-	+	±	-	-	
SM-N+nop <sup>4)</sup>		-	-	±	±	
RMM	+	+	+	+	+	+
RMM-C,N <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-	-
RMM-C,N+oct	-	+	±	-	-	±
RMM-C,N+oct	-	+	±	-	-	±
RMM-C,N+nop	-	-	-	±	±	-
RMM-C,N+oct +carben <sup>5)</sup>	-	-	-	-	-	+

1) SM-N: SM-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 2) RMM-C,N; RMM-mannitol-KNO<sub>3</sub>  
 3) SM-N+oct; SM-N+octopine  
 4) SM-N+nop; SM-M+nopaline  
 5) RMM-C,N+oct+car; RMM-C,N+octopine+carbenicillin  
 6) + ; good growth  
 7) - ; no growth  
 8) ± ; weak growth

것은 첨가된 octopine이 도입된 Ti plasmid DNA의 형질 발현이 되어 *Bradyrhizobium*내에서 대사되어 이들이 탄소원과 질소원으로 작용하였기 때문이라 생각된다.

2. Spheroplast 형성 및 재생과 전자현미경 관찰

일반적으로 세균의 spheroplast는 sucrose와 같은 삼투압 안정제 존재하에서 세포벽을 효소적으로 제거함으로써 이루어진다. Coetzee<sup>19)</sup> 등은 glycine과 lysozyme-EDTA조합으로 세균의 spheroplast 형성을 시도하였는데, 본 실험과정에서도 spheroplast 형성방법으로 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26 세포가 glycine 존재하에서 24시간 진탕배양 후에 lysozyme에 민감한 것을 관찰하였다.

실험과정에 따라 spheroplast의 형성 각 단계마다 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1 과 같다. Fig. 1A에서는 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26을 TY배지에서  $2 \times 10^9$  cells/ml되게 생육시켰을 때의 세포막 상태를 나타내고, Fig. 1B는 glycine존재하에서 24시간 배양후 세포벽 상태를 관찰한 것이다. Fig. 1C는 lysozyme처리 24시간 후 *Bradyrhizobium japonicum* spheroplast 상태를 보여주고 있다.

많은 경우에서 남아 있는 세포벽 물질의 어떤 잔존물질이 spheroplast와 관련되어 존재하고 있었으며, spheroplast 상태의 세포는 삼투적으로 민감하기 때문에 14% sucrose의 농도에서 유지시켰다. 원심분리 및 Ti plasmid를 첨가하기 전에 현미경으로 관찰한 결과 생성된 spheroplast형성율은 거의 90% 정도 되었다. 한편 glycine이 함유된 YS-14배지에서 세포수의 증가는 없었으며 YS-14배지 자체로써 생육은 가능하였다. 따라서 Ti plasmid DNA 도입후 spheroplast는 세포벽 재생을 위해 배지속에서 배양시켰으며, 대개 액체배지상에서 7~10일 내에 느린 속도로 진탕배양시키면 세포벽이 재생되었다. Spheroplast의 세포벽 재생율은 액체배지 상태에서 약 10%의 빈도를 나타내고 있었으며 soft agar를 처리한 고체배지 상태에서는 그 빈도가 아주 낮아 0.1% 정도로 관찰되었다. 따라서 세포벽의 재생은 액체배지가 더욱 유리하게 나타났으며, 이러한 재생에 미치는 여러인자들을 구명하기 위해서는 더욱 여러가지 조건들을 검토해 보아야 될 것으로 생각된다.

관련 spheroplast를 형성시키는 방법에 따라서

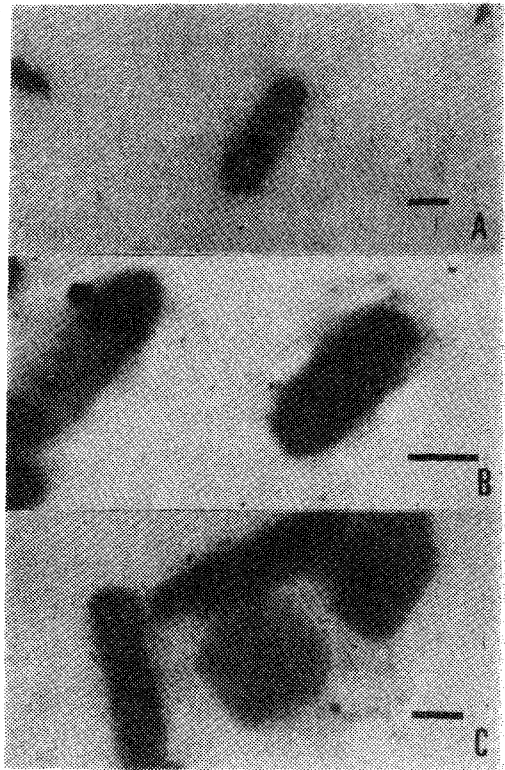


Fig. 1. Formation of spheroplast of *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26  
Transmission electron micrographs.  
A : Cells grown in TY medium.  
B : Cells grown in YS-14 medium.  
C : After lysozyme treatment.  
Bar=0.5 $\mu$ m.

제조합율은 spheroplast의 재생에 의존되는 것이라고 Baltz<sup>20)</sup>가 보고한 바 있고, Fodor 등<sup>21)</sup>은 세포벽 재생 후에 transformant의 선별이 적용되기 때문에 세포벽이 재생될 수 있는 부수적인 여건이 존재할 것이라고 시사하였다. Gabor 등<sup>22)</sup>은 같은 방법에 의해 *Bacillus*속에서 접합 후에 spheroplast 재생율은 약 10% 정도 되었다고 보고하였으며, Hopwood 등<sup>23,24)</sup>은 *Streptomyces* 속의 경우에는 아주 낮은 빈도를 나타내는 것으로 보고한 바가 있다.

3. Agarose gel 전기영동법에 의한 transformant plasmid DNA의 분석

Transformation 실험에서 분리한 transformant와 원 균주인 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26으로부터 각각 plasmid를 Casse법에 의하여 분

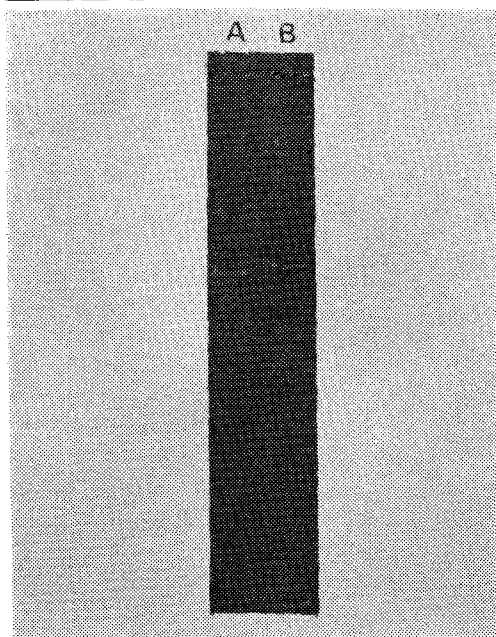


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26 (lane A) and transformant (lane B) by Casse procedure.

리한 결과는 Fig. 2에서와 같이 transformant에서는 새로운 plasmid와 본래 *Bradyrhizobium japonicum*이 가지고 있는 endogenous plasmid가 확인되었다.

4. 2차원 전기영동법에 의한 transformant의 균체단백질 분석

분리균 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26 균주에 *Agrobacterium tumefaciens* 15955의 Ti plasmid DNA를 도입시킨 transformant의 균체단

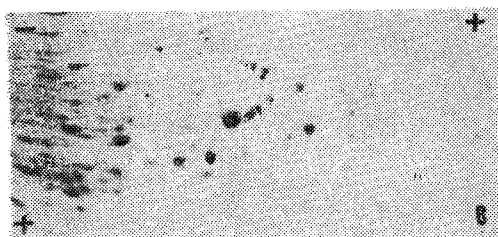


Fig. 3. The protein pattern of transformant by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.  
X-axis is isoelectric focusing (pH8-4)  
Y-axis is SDS-dimension (M.W. > 160,000-15,000)

백질을 two-dimensional 전기영동법에 의한 pattern을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 전보<sup>9)</sup>에서 보고한 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26과 본 실험에서 얻은 transformant간의 단백질 pattern의 비교에서 main protein spot는 각기 공통적으로 나타내고 있으며 transformant에서 spot수가 약간 많은 것으로 나타났으며 tumor에 관계되는 spot는 본 실험의 결과로 잘 알 수 없었으며 이에 대한 계속적인 연구가 요구된다.

5. Transformant의 근류형성 관찰

형질전환된 transformant가 본래 분리균 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26의 근류형성력을 가지고 있는가를 조사하기 위하여 pouch재배법으로 근류 형성과정을 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4A는 transformant를 접종한 후 7일 후에 대두 뿌리를 현미경 상에서 40배로 확대하여 관찰한 것이고 Fig. 4B는 transformant

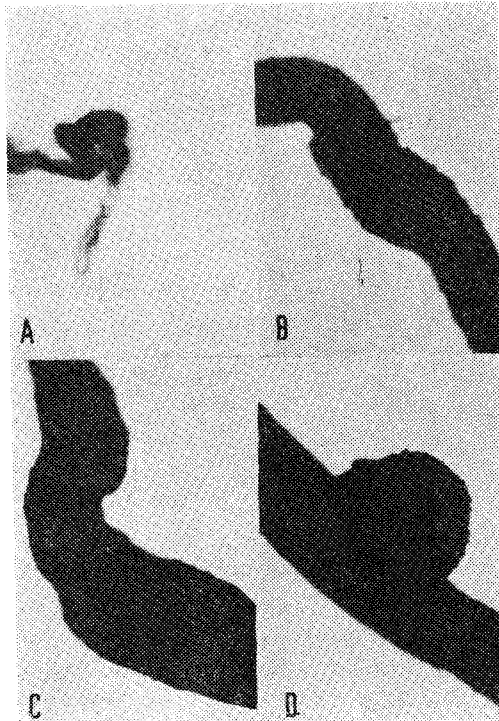


Fig. 4. Photomicrographs (×40) of nodule forming process on *Glycine max.* by transformant.

- A : 7 days after inoculated
- B : 10 days after inoculated
- C : 11 days after inoculated
- D : 14 days after inoculated

를 접종 후 10일후에 관찰한 것으로 미생물과 식물뿌리의 초기 감염단계로서 뿌리가 약간 swelling 된 상태를 보였고, Fig. 4C는 swelling이 더욱 진행된 상태를 나타내고 있다. Fig. 4D는 접종 후 2주째 관찰한 것으로 완전한 근류형성을 나타내고 있어 형질전환에 의해 근류형성에 어떤 영향은 없는 것으로 생각된다.

6. Transformant에 의한 oncogenicity시험

*Bradyrhizobium japonicum* 균주내로 형질도입된 Ti plasmid DNA에 의한 고유의 oncogenicity 능력이 *Bradyrhizobium* 내에서 발휘되는가를 조사하기 위하여 transformant를 페추니아에 처리하여 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5A는 전혀 미생물이 접종되지 않은 어린 *Petunia hybrida*의 줄기를 촬영한 것이고, Fig. 5B는 미생물을 접종하지 않고 살균된 주사바늘 끝으로 줄기 부위에 상처를 낸 것으로 이것을 대조구로 하여 비교하였

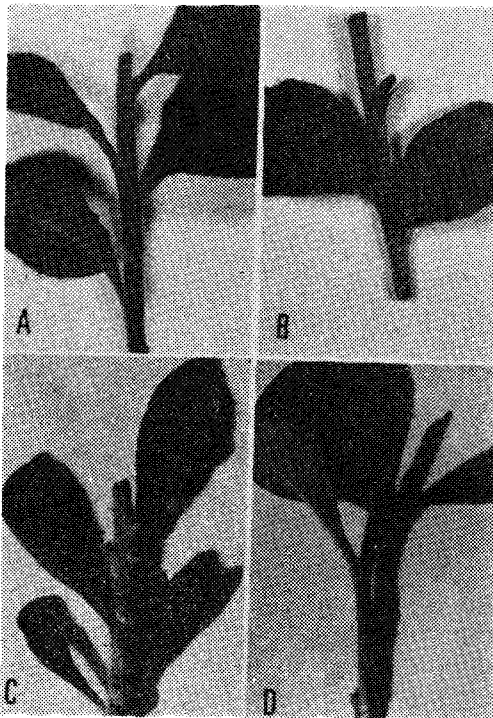


Fig. 5. Oncogenicity test on *Petunia hybrida* by transformant.

- A : Uninoculated control
- B : Needling pricking control
- C : Inoculated by *A. tumefaciens* 15955 after 4 weeks
- D : Inoculated by transformant after 4 weeks.

다. Fig. 5C는 *Agrobacterium tumefaciens* 15955를 접종하여 4주후에 관찰한 것으로 정상적인 crown gall이 형성 되었으며 Fig. 5D는 transformant를 접종하여 관찰한 것으로 crown gall이 형성은 되었으나 gall의 크기가 본래의 *Agrobacterium*에 의해 형성되는 것보다는 작게 나타났다.

본 실험의 결과로 spheroplast에 의해 *Bradyrhizobium japonicum*과 *Agrobacterium tumefaciens*과의 유전자 교환의 가능성을 보여 주었으며 Ti plasmid가 *Bradyrhizobium* 속으로 도입되어 형질전환된 transformant가 근류형성력과 gall형성력의 두 가지 특성이 *Bradyrhizobium japonicum*내에서 안정하게 발현유지되었다는 것은 서로 같은 incompatibility group에 속하지 않은 것으로 생각되고, 미생물에서 유래한 Ti plasmid의 유전적인 이용성에 있어서 지금까지 식물에 전이될 수 있는 유일한 vector로 알려져 있지만 본 실험에서는 도입된 Ti plasmid가 vector의 역할 보다는 gall을 형성 시킬수 있는 능력의 유전자 교환이 어떤 유용한, 미생물에게 부여할 수 있다는 데에 의의가 있는 것으로 생각된다.

초 록

*Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26 균주를 glycine 및 lysozyme을 처리하여 spheroplast를 형성시킨 후 *Agrobacterium tumefaciens*에서 분리한 Ti plasmid를 분리하여 형질전환 시키고 octopine 영양 요구성에 의하여 transformants를 분리하였다. 그 결과 Ti plasmid가 도입된 transformants의 형질전환율은  $1 \times 10^{-7}$  정도 되었다. 얻어진 transformant의 plasmid를 조사한 결과 도입된 Ti plasmid 존재가 확인되었으며, 2차원 전기영동법으로 균체 단백질을 분석한 결과 수용체포인 *Bradyrhizobium japonicum* ROKS 26과 transformant간의 단백질 구성 차이도 확인되었다. 또한 transformant의 근류형성력을 조사한 결과 본래의 근류의 근류형성력을 가지고 있었으나, crown gall형성에 있어서는 *Agrobacterium tumefaciens* 15955에 의한 gall보다는 크기에 있어 차이가 있었다.

참 고 문 헌

1. Jordan, D.C.: Int. Syst. Bacteriol. 32 : 163

- (1982)
2. Jordan, D.C. and Allen, N.: In 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology', 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore., 261 (1974)
  3. Enquist, L., Sternbery, N.: In 'Methods in Enzymology', Academic Press, New York: Vol. 68, 281 (1979)
  4. Knauf, V.C. and Nester, E.W.: Plasmid. 8 : 45 (1982)
  5. Khmel'nitsky, M.I., Zlozhikov, K.M. and Bayer, A.A.: Doelady Academi Naub., 256 : 191 (1981)
  6. Hooykaas, P.J.J., Roobol, C. and Schilperoort, R.A.: J. Gen. Microbiol., 110 : 99 (1979)
  7. Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M. P., Schilperoort, R.A. and Rorsh, A.: J. Gen. Microbiol. 98 : 477 (1977)
  8. Yun, H.D., Cho, M.J. and Lee, K.H.: Kor. J. Agri. Chem., In press (1987)
  9. Yun, H.D., Cho, M.J. and Lee, K.H.: Kor. J. Agri. Chem., In press (1987)
  10. Vincent, J.M.: A Manual for the Practical Study of the Root-nodule Bacteria. International Biological Programme, Blackwell Scientific Pub., Oxford, England (1970)
  11. Klapwijk, P.M., Jonge, D., Schilperoort, A. T.R. and Rorsch, A.: J. Gen. Microbiol., 91 : 177 (1975)
  12. Berry, J.O. and Atherly, A.G.: J. Microbiol., 30 : 415 (1983)
  13. Beringer, J.E., Beynon, J.L., Buchanan-Walston, A.V. and Johnston, A.W.B.: Nature 276 (1978)
  14. Klapwijk, P.M., Scheulderman, T. and Schilperoort, R.A.: J. Bacteriol., 136 : 775 (1978)
  15. Currier, T.C. and Nester, E.W.: Biochem., 76 : 431 (1976)
  16. Casse, F., Boucher, C., Julliot, J.S., Michel, M. and Denarie, J.: J. Gen. Microbiol., 113 : 229 (1979)
  17. Weaver, R.W. and Frederick, L.R.: Plant and Soil, 36 : 219 (1972)
  18. Tempe, J. and Petit, A.: La Piste des Opines. Molecular Genetics of the Bacteria-plant Interaction. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 14 (1983)
  19. Coetzee, J.N., Sirgel, F.A. and Lecatsas, G.: J. Gen. Microbiol., 114 : 313 (1979)
  20. Baltz, R.H.: J. Gen. Microbiol., 107 : 93 (1978)
  21. Fordor, K. and Alfoldi, L.: PNAS, 73 : 2147 (1976)
  22. Gabor, M.H. and Hotchkiss, R.D.: J. Bacteriol., 137 : 1346 (1979)
  23. Hopwood, D., Wright, H.M., Bibb, M.J. and Cohen, S.N.: Nature (London), 268 : 171 (1977)
  24. Hopwood, D. and Wright, H.M.: Mol. Gen. Genet., 162 : 307 (1987)