

## 옥수수 轉移因子 Ac가 導入된 煙草組織의 再分化

박성원, 최광태, 박지창, 김영진\*

한국인삼연초연구소 유전생리부

\* : 충남대학교 생물학과

## Regeneration of Tobacco Tissue Introduced with the Maize Transposable Element Activator

S. W. Park, K. T. Choi, J. C. Park, and Y. J. Kim\*

Division of Genetics and Physiology, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

\* : Department of Biology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

### ABSTRACT

To explore the possibility of introducing *Zea mays* transposable element Ac(activator) which can be used as a mutagen and gene tag in tobacco plants other than maize, we tried to introduce a cloned Ac element into tobacco cells by an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system. Transformation of *N. tabacum* cv. Burley 21 tissues and regeneration to whole plant were carried out. The frequency of the transformed callus induced in shoot induction media was higher than that of transformed callus induced in callus induction media.

However, the calli were not grown in the second selection media, and became yellow senescent calli. Regenerated tobacco plantlets with foreign gene were also obtained in shoot induction media containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  carbenicillin. The leaf tissues of transformant was also resistant to 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin. The chromosomal DNAs of transformant and normal plant of *N. tabacum* were digested by EcoR I and HindIII but not by Pst I.

서 론

식물의 형질전환 vector 로서 *Agrobacterium* 균주

의 Ti plasmid를 이용하는 경우 vector의 이용 방법은 다른 생물의 유전자를 homologous recombination에 의해 Ti plasmid에 삽입시키는 intermediate

vector system을 이용하는 방법(Matzke and Chilton, 1981)과 제한효소를 처리하여 다른 생물의 유전자를 직접 vector에 삽입하는 DNA를 세균에서 식물세포로 이동시키는데에 필요한 유전자(*cis* acting element)인 T-DNA border sequence 그리고 *A. tumefaciens* 균주와 *E. coli* 균주 양쪽 모두에서 발현될 수 있는 replicon과 식물에서 발현을 확인할 수 있는 표지 유전자만 있으면 되므로 그 plasmid 유전자의 크기는 *A. tumefaciens* 균주의 Ti plasmid 보다 상당히 작으며 그 조작 또한 간편하다. 그리고 유전자의 이동에 필요한 *vir* 유전자는 Ti plasmid에 의해 따로 떨어져서 (*in trans*로) 작용하므로 *E. coli*에서 유전자 조작으로 binary vector에 삽입된 유전자는 이미 Ti plasmid를 갖고 있는 *A. tumefaciens* 균주로 이동되며 이때 균주는 binary vector와 Ti plasmid를 동시에 함유하게 된다. 따라서 식물 세포의 형질전환은 binary vector와 helper plasmid를 동시에 갖고 있는 *A. tumefaciens* 균주와의 동시 배양 방법에 의해 이루어지게 된다.

현재 형질전환을 이룩하고자 하는 품종들도 급속히 증가되고 있으며 식물에 도입하고자 하는 다른 생물의 유전자도 내병성, 내충성, 제초제 내성 등의 여러가지 종류의 유용한 유전자들을 대상으로 하고 있다(Raineri *et al.*, 1990).

옥수수의 전이인자 중 Activator-Dissociation (Ac-Ds) element는 McClintock이 1948년에 처음으로 보고한 전이인자이다. 옥수수의 전분합성에 관여하는 *waxy* (*wx*) 유전자에서 처음으로 Ac유전자가 분리되었으며 (Fedoroff *et al.*, 1983), 그 유전자의 크기는 4.6 kbp이고, 양쪽 끝에 11 bp의 말단 역반복 서열(terminal inverted repeated sequence)이 있으며 전이하여 삽입될 때마다 8 bp의 복제가 일어난다(Pohlman *et al.*, 1984). Ac유전자의 전이는 세포의 생리적 상태에 따라 달라지며 (Schwartz, 1984), dosage effect에 의하여 세포내에서 copy수가 증가하면서 전이인자가 repressor를 만들어 전이를 억제하며 (Schwartz and Echt, 1982), Ac유전자의 methylation으로도 전이를 못할 수도 있다(Chomet *et al.*, 1987).

최근에 Ac유전자를 이용하여 gene tagging방법

(Hehl and Baker, 1990)으로 유용한 유전자를 cloning하고자 옥수수 이외의 식물에도 이러한 전이인자를 이용, 형질전환을 유도하려는 연구가 많이 수행되고 있으며, Ac유전자가 옥수수이외에 연초 (Baker *et al.*, 1987)나 당근, *Arabidopsis thaliana* (Van. Sluys *et al.*, 1987), 토마토(Yoder *et al.*, 1987), 콩(Zhou and Atherly, 1990)등에서 전이된다는 보고들이 있다. 본 연구는 외부유전자가 도입된 버어리종 담배를 얻고자 수행되었으며, 버어리종 담배(Burley 21) 조직에 외부유전자로는 식물체에서 유전자 cloning수단으로 이용 가능성이 있는 전이인자 Activator(Ac)유전자의 도입을 시도하였고, 형질전환된 담배조직에서 식물체 재분화를 시도하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 *Escherichia coli* 균주는 vector의 형질전환, 증식 및 보관에 사용하였으며 *Agrobacterium tumefaciens* 균주는 연초의 형질전환을 위한 host로 사용하였다. 선택배지인 경우에 *E. coli*의 배지에는 kanamycin(Km) 25 ug/ml과 chloramphenicol(Cm) 25 ug/ml, tetracyclin(Tc) 10 ug/ml을 각각 사용하였으며, *A. tumefaciens*의 배지에는 Km 25 ug/ml, Cm 25 ug/ml, Tc 2.5 ug/ml을 각각 사용하였다. 본 실험에 사용된 연초의 품종은 재배종 연초로서 *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21을 파종후 25 ~ 27 °C인공기상실에서 8 ~ 12주 동안 재배한 연초를 실험재료로 사용하였다. 본 실험에 사용된 제한효소들과 T4 DNA ligase는 Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica회사에서 구입하였고 그밖의 모든 시약들은 Bethesda Research Laboratories회사와 Sigma회사에서 구입하여 사용하였다.

### 재조합된 binary vector의 제조

Ti plasmid vector system의 일종인 binary vector pEND4K(Klee *et al.*, 1985)를 vector plasmid로 사용하였으며 옥수수 전이인자 Ac유전자가 *waxy* 유전자에 삽입되어 mutant가 된 *wx-m7*에서

clone한 *wx-m7(Ac)* 유전자 (Behren *et al.*, 1984과 Fedoroff *et al.*, 1983)를 다른 생물의 유전자로 사용하였다. *Wx-m7* clone을 Sal I 과 Eco RV 제한효소로 이중처리하여 pBS(+)<sub>2</sub> plasmid의 Sal I 과 Sma I site에 삽입하여 BMPac7을 제조하였으며, BMPac7을 제한효소 Kpn I 과 Sal I 을 처리한 절편을 pEND4K의 Kpn I 과 Sal I site에 삽입하여 제조한 재조합 pEND4K-Ac7 plasmid(Lim *et al.*, 1990)을 사용하였다.

Binary vector의 *Agrobacterium*내로의 도입

Plasmid DNA에 의한 *A. tumefaciens*의 형질전환은 An(1987)의 triparental mating방법을 사용하였으며, 이때 donor인 *E. coli*균주는 kanamycin 25 ug/ml, chloramphenicol 25 ug/ml이 포함된 LB배지에서 배양하였으며, helper인 *E. coli*균주는 kanamycin 25 ug/ml이 포함된 LB배지에서 배양하였다. 형질전환된 균주는 kanamycin 25ug/ml과 chloramphenicol 25 ug/ml이 포함된 AB배지에서 배양하여 선발하였다. Tetracycline항생제의 농도는 *E. coli*의 배지에서는 10 ug/ml, *A. tumefaciens*의 배지에서는 2.5 ug/ml을 첨가하여 사용하였다.

*A. tumefaciens*에 의한 연초조직의 형질전환

연초의 형질전환 실험은 연초의 엽육 조직을 70% ethanol에서 멸균한 후 bleach(1% sodium hypochlorite) 용액에 10 ~ 15분간 멸균하고 중류수로 3

회이상 수세하였다. 수세후 잎을 작은 절편으로 만들어 이미 배양된 *A. tumefaciens*균주와 액체 callus유기 배지에서 동시 배양을 하였다. 이때 균주의 농도는  $10^8 \sim 10^9$  cells/ml이었으며 동시배양은 1 ~ 3일간 수행하였다. 동시배양후 멸균된 여과지에 배양액을 최대량 제거한 다음 kanamycin 100 ug/ml과 carbenicillin 100 ug/ml 이 포함된 선택배지에 치상하여 형질전환체를 선발하였다. 선택배지의 hormone농도는 callus유기배지에는 2, 4-D 0.5 ug/ml가 첨가된 MS 배지를 사용하였고 뿌리유기배지에는 호르몬을 첨가하지 않았다.

결과 및 고찰

*A. tumefaciens*에 의한 연초조직의 형질전환

연초의 형질전환조직을 선발, 육성하고자 항생제 내성이 있는 재조합 binary vector가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens*균주와 연초조직을 동시배양한 후 kanamycin 100 ug/ml, carbenicillin 100 ug/ml를 첨가하고 2, 4-D 0.5 ug/ml, kinetin 2 ug/ml를 첨가한 callus유기배지와 auxin은 첨가하지 않고 BA 0.5 ug/ml만 첨가한 shoot유기배지에 연초품종별 explant를 각각 배양하여 callus유기율을 조사하였던 바, 그 결과는 Tables 1, 2와 같다.

재조합된 binary vector pEND4K-Ac7로 형질전환된 callus의 유기율을 보면, 2, 4-D와 kinetin을

Table 1. Formation rate of callus in transformed tobacco cultured on the callus induction medium

Variety	No. of explants inoculated	No. of explants with callus	%
Burley 21	227	2	0.9

Table 2. Formation rate of callus in transformed tobacco cultured on the shoot induction medium

Variety	No. of explants inoculated	No. of explants with callus	%
Burley 21	168	33	19.6

함께 첨가한 callus유기배지에서는 0.9 ~ 3.7%의 낮은 유기율을 보인 반면, BA만 첨가한 shoot유기배지는 12.6 ~ 19.6%의 높은 유기율을 보였다 (Tables 1, 2). 두 종류의 배지 공히 품종간 차이가 있었으며 특히 BA만 첨가한 shoot유기배지에서 배양한 Br21 품종이 19.6%로서 가장 높은 callus 유기율을 보였다. 그리고 유기된 callus를 형질전환체 선발배지에서 계속 배양하게 되면 노화현상이 일어나 갈변화되는 경향을 보였다. Baker 등(1986)은 Ac유전자를 연초의 protoplast에 형질전환하여 kanamycin 200 µg/ml의 농도에서 형질전환체를 선발하는 경우 Ac유전자가 없이 형질전환했을 때보다 형질전환체가 나타나는 빈도는 약 25% 이하로 낮아진다고 보고하였는 바, 본 연구에서도 형질전환체의 출현빈도가 Ac유전자 없이 형질전환한 경우보다 낮게 나타나는 것으로 보아 그들의 결과와 같은 경향을 보였다. 그러나 Baker 등(1987)의 실험에서는 형질전환되어 완전히 재분화된 연초를 얻지는 못했다.

유기된 callus가 형질전환체의 선발배지에서 더 이상 성장하지 못하였지만 Table 2에서 보는 바와 같이 shoot유기배지에서 callus유기율이 높았으므로 pEND4K-Ac7의 형질전환은 shoot유기 배지에서 시도하는 것이 형질전환체의 출현빈도가 높을 것으로 생각되어 형질전환 후 selection marker인 kanamycin 100 µg/ml와 carbenicillin 100 µg/ml가 포함된 shoot유기배지에서 연초의 형질전환체 유기 및 재분화를 시도하였다.

#### 형질전환된 연초조직의 재분화

옥수수의 전이인자 Ac유전자를 연초에 도입하기 위하여, Ac유전자가 삽입된 binary vector pEND4K-Ac7 plasmid를 포함하고 있는 *A. tumefaciens* A281균주와 연초조직을 동시배양법에 의해 형질전환을 시도하였으며, 선택배지를 이용하여 형질전환체를 선발하였고, 이들 형질전환체로부터 연초 식물체 재분화를 시도하였다. 식물체의 재분화는 Ac유전자가 포함된 pEND4K-Ac7 plasmid로 형질전환 실험을 수행한 연초 조직에서 유기된 callus에서는 재분화에 성공을 하지 못하였으나 Ac유전

자가 없는 pEND4K plasmid 혹은 pGA643 plasmid 등으로 형질전환 실험을 수행한 연초 조직에서 유기된 callus에서는 재분화가 되었다.

Baker 등(1987)은 Ac유전자를 NPTII 유전자의 untranslated leader region에 삽입했을 경우 연초에 Ac유전자가 이동하면 kanamycin내성을 갖게 하는 vector를 만들어 연초의 원형질체를 이용하여 형질전환된 clone을 만들고 이들에서 DNA를 분석한 결과 연초에서도 Ac유전자가 이동한다고 보고하였고, Zhou 등(1990)은 콩에서 Ac유전자가 삽입된 β-glucuronidase(GUS) 유전자의 표현형으로 Ac유전자가 콩의 callus 및 재분화된 조직에서 모두 이동한다는 보고를 하였다. 따라서 이들의 보고에 비추어 볼때 pEND4K-Ac7 plasmid로 형질전환되어 유기된 callus에서 더 이상의 재분화가 되지 않는 것은 Ac유전자가 연초세포에서 스스로 이동하여 생육에 필수적인 유전자에 삽입되어 더 이상 분열을 못하고 생장이 중단된 것으로 사료되나 추후 이에 대한 연구검토가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

전이인자의 도입으로 형질전환된 콩에 대한 연구결과(Zhou and Atherly, 1990)를 참고로 하여 연초에서도 전이인자가 도입되어 재분화된 재배종 연초를 얻고자 형질전환에 이용될 때 종양을 유기하는 *A. tumefaciens* A281균주를 *A. tumefaciens* LBA4404균주로 대체한 후 *A. tumefaciens* 균주와 연초의 동시배양 시간을 1 ~ 2일에서 2 ~ 3일로 연장하고, 형질전환체의 선발배지의 hormone의 종류 및 농도를 달리하여 형질전환 실험을 계속 수행하였다. 그 결과 Ac유전자가 삽입된 pEND4K-Ac7 plasmid에 의해 형질전환된 연초조직중 처음으로 버어리종 Br21에서 shoot와 callus가 유기되었으며(Fig. 1), 유기율은 10<sup>-4</sup> 정도로 나타났다. 재분화가 잘되지 않았던 이전의 형질전환된 조직에서 유기된 callus는 주로 엽맥에서 형질전환체가 형성되었으나 현재 유기된 shoot의 잎조직의 상처감염 부위에서 직접 shoot가 유기되기도 하였고, 조직 가장자리의 상처난 부위에서도 shoot가 유기될 callus같은 조직이 유기되기도 하였다(Fig. 1). 약 6주 배양후에는 Fig. 2와 같이 callus에서 유기된 shoot와 직접 shoot에서 자라는 shoot를 판

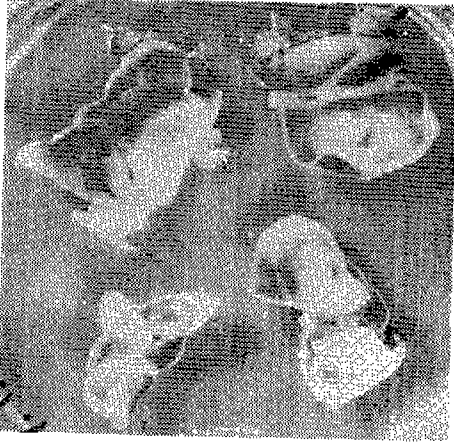


Figure 1. Shoots and calli induced directly from *N. tabacum* cv. Barley 21 leaf tissues cocultured.

*N. tabacum* leaf tissues were cocultured with *A. tumefaciens* A281 containing pEND4K-Ac7 plasmid and incubated in the selection medium(BN) containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of kanamycin and 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of carbenicillin for 4 weeks after cocultivation.



Figure 2. Growth of shoots induced from *N. tabacum* calli.

*N. tabacum* cv. Burley 21 leaf tissues were cocultured with *A. tumefaciens* A 281 containing pEND4K-Ac7 plasmid and incubated in selection medium(BN) containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of kanamycin and 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of carbenicillin for 6 weeks after cocultivations.

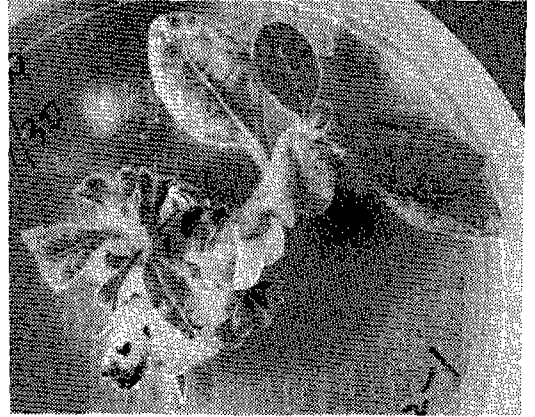


Figure 3. Growth of multi shoots induced from *N. tabacum* shoots.

Shoots of *N. tabacum* cv. Br21 were induced directly and incubated in selection medium(BN) for 9 weeks after cocultivation.

찰할 수 있었고 약 9주 배양후에는 Fig. 3과 같은 multi shoot도 관찰되었다. 그리고 single shoot로 유기된 shoot를 kanamycin이 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가된 root유기 배지에 옮겨 root를 유기하고 Fig. 4와 같이 root가 유기된 재분화 연초를 화분에 이식하여 온실에서 배양하면서 재분화된 연초(Fig. 5)의 특성 조사를 수행하였다.

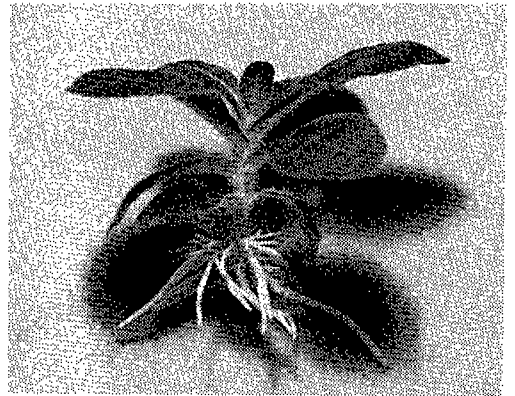


Figure 4. Induction of roots from shoots.

Induced shoots of *N. tabacum* cv. Br21 were incubated in root induction medium containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of kanamycin.

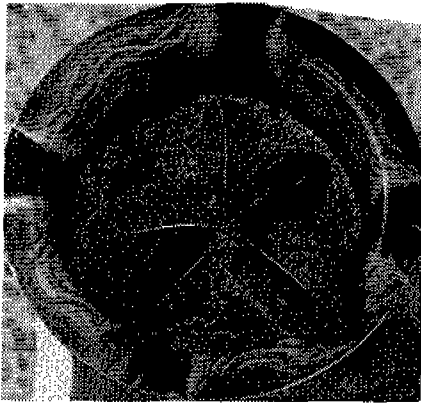


Figure 5. *N. tabacum* cv. Br21 whole plants regenerated.

*N. tabacum* cv. Br21 tissues were cocultured with *A. tumefaciens* A281 containing pEND4K-Ac7 plasmid and selected by kanamycin resistance.

#### 형질전환 식물체의 특성

형질전환에 이용된 재조합된 vector plasmid인 pEND4K-Ac7 plasmid는 Ti-plasmid의 T-DNA border sequences를 함유하고 있고 그 양쪽의 border sequences 사이에 도입된 Ac유전자와 표지 유전자 NPTII 등이 동시에 존재하고 있다. pEND4K-Ac7 plasmid로 형질전환된 연초는 일차적으로 kanamycin에 내성을 갖고 있는지 여부로 형질전환체의 선발이 이루어 지므로, 항생제 kanamycin에 내성이 있으면 pEND4K-Ac7 plasmid의 T-DNA

border sequence 사이에 존재하는 유전자가 동시에 연초에 도입되었다고 판단할 수가 있는 것이다. 그러므로 Ac유전자가 도입되어 재분화된 연초의 특성을 먼저 조사하기 위하여 형질전환되어 재분화된 연초의 표지 유전자에 대한 kanamycin의 내성을 조사하였던 바, 그 결과는 Table 3과 같다. Ac유전자가 삽입된 pEND4K-Ac plasmid로 형질전환시킨 callus로부터 재분화된 연초는 Burley 21이었으며 재분화된 품종의 조직에 대한 항생제 내성을 조사한 결과 kanamycin 1000 µg/ml의 농도에서도 내성을 지녀 생장을 하였다(Table 3). 이는 재분화된 연초가 일차적으로 형질전환체임을 나타내는 증거라고 볼 수 있다. 그러나 형질전환시킨 재분화 식물체에 대한 좀 더 확실한 결과는 재분화 연초가 더 성장한 후에 DNA를 분리하여 southern blot에 의해 Ac유전자를 확인하면 밝혀질 것으로 사료된다. 이에 관해 Klee등(1987)은 kanamycin이 300 µg/ml 첨가된 배지에서 내성을 나타내 선발된 형질전환체에도 도입된 유전자가 존재한다고 보고한 바 있다.

Ac유전자가 도입되어 재분화된 연초조직과 정상 연초조직에서 각각 염색체 DNA를 분리하여 EcoRI 과 HindIII, Pst I 등의 제한효소를 처리하여 전기영동을 수행한 결과 Br 21의 재분화된 연초조직과 정상연초조직의 염색체 DNA는 EcoR I 과 HindIII 제한효소에는 비교적 절단이 잘되었으며, Pst I 제한효소에는 절단이 잘되지 않는 특징을 나타냈다(Fig. 6). 이러한 특징은 앞으로 재배종 연초의

Table 3. Response of regenerated *N. tabacum* tissues to kanamycin

Varieties	Con. of kanamycin (µg/ml)					
	50	100	300	500	800	1000
Untransformed Burley 21	+	-	-	-	-	-
Transformed Burley 21	+	+	+	+	+	+

+ : survival, - : nonsurvival.

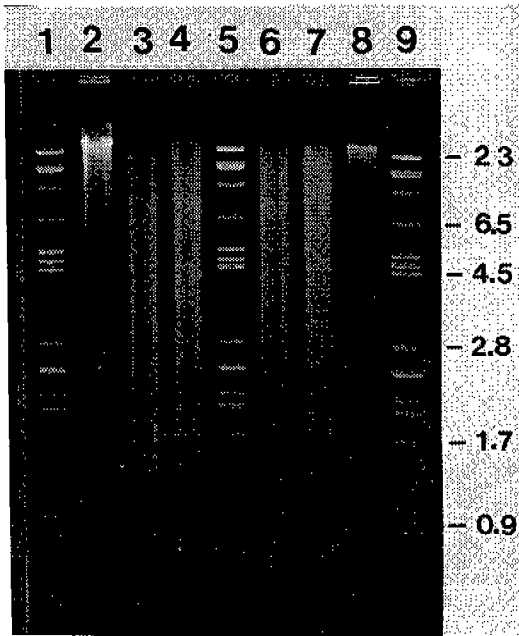


Figure 6. Restriction patterns of chromosomal DNA of transformed and untransformed *N. tabacum* cv. Br21.

The chromosomal DNA was isolated from leaf tissues, digested with restriction endonuclease and loaded 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of DNA in each well. Lane 1, 5, 9 : Lambda + HindIII + Pst I, Lane 2, 3, 4 : untransformed *N. tabacum* Br 21, Lane 6, 7, 8 : transformed *N. tabacum* Br21, Lane 2, 8 : Pst I, Lane 3, 7 : EcoR I, Lane 4, 6 : HindIII.

염색체 DNA 특성 연구에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

현재 재분화된 연초에서 그 유전적 변이의 조사가 진행되고 있으며, 재분화된 식물체로부터 DNA를 분리하여 Ac의 transposition기능과 empty donor site의 변화 등을 추적함으로써 연초의 transposition기작을 구명할 예정으로 있다. 또한 재분화된 연초에서 Ac copy수가 적은 변이주를 선발하고 선발된 변이주를 이용하여 유용유전자의 cloning도 가능할 것으로 사료된다.

## 결 론

식물체에서 유전자 clining수단으로 이용 가능성이 있는 옥수수의 전이인자 activator(Ac) 유전자가 연초에 도입 가능한지 여부를 구명하기 위하여 *Agrobacterium tumefaciens* 균주의 binary vector system을 이용하여 연초조직의 형질전환을 시키고 이들 형질전환체 조직에서 식물체를 재분화하였던 바, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 옥수수의 전이인자인 Ac유전자로 형질전환된 연초조직의 발생율은 callus유기배지보다 shoot유기배지가 높았다.
2. 외부유전자가 도입된 버어리종 연초의 재분화는 kanamycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 carbenicillin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 shoot유기배지에서 가능하였다.
3. 형질전환된 연초식물체에서 적절한 조직의 항생제 반응을 보면 kanamycin 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 내성을 나타내었다.
4. 형질전환 연초조직과 정상 연초조직의 염색체 DNA의 제한효소 EcoR I 과 HindIII, Pst I 에 대한 반응을 보면 두조직 공히 EcoR I 과 HindIII에는 절단이 잘 되었으나 Pst I 에는 절단되지 않았다.

## 참 고 문 헌

1. An, G. 1987. in Methods in Enzymology. R. Wu, and L. Grossman, eds., Academic Press, N. Y. 153, pp 292-305.
2. Baker, B., G. Coupland, N. Fedoroff, P. Starlinger, and J. Schell. 1987. EMBO J. 6, 1547-1554.
3. Baker, B., J. Schell, H. Lorz, and N. Fedoroff. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4844-4848.
4. Behrens, U., N. Fedoroff, A. Laird, M. Muller-Neumann, P. Starlinger, and J. Yoder. 1984. Mol. Gen. Genet. 194, 346-347.
5. Chomet, P. S., S. Wessler, and S. L. Dellaporta. 1987. EMBO J. 6, 295-302.

6. Fedoroff, N. V. 1983. *in* Mobile Genetic Elements. J. A. Shapiro, ed., Academic press, N. Y. pp 1-63.
7. Hehl, R. and B. Baker. 1990. Maize Genetic Cooperation Newsletter 64, p. 3.
8. Klee, H. J., M. F. Yonofsky, and E. W. Nester. 1985. Bio/Technology 3, 637-642.
9. Lim, Y. P., S. W. Park, J. Chen, S. L. Dellarporta, and K. T. Choi. 1990. Korean J. Plant Tissue Culture 17, 119-127.
10. Matzke, A. J. M. and M. D. Chilton. 1981. J. Mol. Appl. Genet. 1, 39-49.
11. Pohlman, R. F., N. V. Fedoroff, and J. Messing. 1984. Cell 37, 635-643.
12. Raineri, D. M., P. Bottino, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1990. Bio/Technology 8, 33-38.
13. Schwartz, D. 1984. Mol. Gen. Gente. 196, 81-84.
14. Schwartz, D. and C. S. Echt. 1982. Mol. Gen. Genet. 187, 410-413.
15. Van Sluys, M. A., J. Tempe, and N. Fedoroff. 1987. EMBO J. 6, 3881-3889.
16. Yoder, J., F. Belzile, K. Alpert, J. Palys, and R. Michelmore. 1987. *in* Tomato Biotechnology. R. Alan, ed., Less, N. Y. pp 189-198.
17. Zhou, J. H. and A. G. Atherly. 1990. Plant Cell Reports 8, 542-545.