

Andrzej Joachimiak

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań

## INŻYNIERIA GENETYCZNA ROŚLIN

### WPROWADZENIE

Przez tysiące lat rozwoju cywilizacji ludzie poznali i nauczyli się uprawiać wiele roślin, które zaspokajały ich podstawowe potrzeby w zakresie żywności, odzieży, energii, leków itp. Powolna selekcja roślin doprowadziła do wydzielenia bardziej plennych gatunków i odmian. Odkrycie mendlowskich praw dziedziczenia spowodowało, że selekcja odmian mogła odbywać się efektywniej i z możliwym do przewidzenia rezultatem.

Od początku XX wieku klasyczna genetyka roślin skutecznie wspierała szybki postęp w doskonaleniu właściwości wielu roślin ważnych gospodarczo. Przyczyniła się ona m. in. do wzrostu wydajności i poprawy jakości roślin, pokonania naturalnych barier krzyżowania, rozszerzenia różnorodności genetycznej, co w konsekwencji pozwoliło na lepsze dostosowanie roślin do specyficznych warunków uprawy (szerszy zakres geograficzny i glebowy, zwiększenie odporności na choroby, pasożyty i susze, lepsze wykorzystanie nawozów itp.) (1,2,4). Odnotowano też znaczące sukcesy w selekcji odmian np. o zwiększonej zawartości białek czy olejów i o podwyższonej wartości odżywczej i ulepszonych ważnych cechach plonu. Najlepszymi przykładami osiągnięć genetyki klasycznej to powszechne zastosowanie w uprawie hybrydowej kukurydzy w latach trzydziestych oraz użycie nowych plennych odmian pszenicy w "zielonej

rewolucji" lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych naszego stulecia (1,3).

Bardzo trudno jest określić w jakim stopniu genetyka stosowana wpłynęła na wysokość zbiorów w XX w., gdyż jednocześnie doskonalono w rolnictwie organizację pracy, agrotechnikę, stosowanie irygacji, herbicydów i sztucznego nawożenia. Różne oceny wskazują, że wkład genetyki we wzrost plonów sięga 50%, głównie poprzez selekcje plenniejszych odmian (1).

Sukcesy klasycznej genetyki opierają się zasadniczo na zastosowaniu różnych metod krzyżowania roślin oraz na technikach prowadzących do zmiany liczby chromosomów (2). Jednakże techniki te napotykają na szereg ograniczeń. Wiele istotnych cech roślin (zdolność do fotosyntezy, wiązania wolnego azotu, odpowiedź na zewnętrzne stresy np. temperatura, UV, odporność na choroby) jest zdeterminowanych przez kilka genów i często trudno jest określić indywidualne geny mające wpływ na całą roślinę. Na duże trudności napotyka też określenie jaka część różnorodności genetycznej istniejącej w roślinach może być wykorzystana do poprawienia określonej właściwości rośliny. Ponadto, mimo iż możliwa jest ograniczona wymiana materiału genetycznego pomiędzy różnymi gatunkami, w celu zwiększenia zróżnicowania genetycznego, to jednak ma ona dość zawężony charakter i dotyczy tylko pokrewnych roślin (2,3,4). Istniejące naturalne bariery dla międzygatunkowych i międzygenetycznych hybrydyzacji powoduje, że procesy przeniesienia materiału genetycznego pomiędzy roślinami są znacznie utrudnione.

## BIOTECHNOLOGIA ROŚLIN

W ostatnich latach pojawiły się nowe technologie, które określamy dziś terminem BIOTECHNOLOGIA. Jest to dziedzinastosująca zintegrowane działania w wielu gałęziach nauki w celu wykorzystania zdolności produkcyjnych istniejących w organizmach żywych. Otworzyły one zupełnie nowe możliwości przed nauką w zakresie udoskonalenia wielu cech roślin. Należy podkreślić, że nowe technologie i klasyczna genetyka stosowana - nie są względem siebie konkurencyjne i błędem byłoby sadzić, że jedna wyeliminuje drugą. Na obecnym etapie rozwoju oba podejścia winny być równorzędnymi narzędziami pozwalającymi efektywniej manipulować informacją genetyczną zawartą w roślinach i innych organizmach. Jednakże nowe technologie w odróżnieniu od klasycznej genetyki charakteryzują się zupełnie nowymi jakościami w zakresie wymiany materiału genetycznego pomiędzy różnymi organizmami. Pozwalają one pokonać istniejące naturalne bariery międzygatunkowe i umożliwiają specyficzne wprowadzenie określonego materiału genetycznego w celu selektywnego rozszerzenia zróżnicowania potencjału genetycznego "gospodarza" (3,6).

Rozwój wegetatywnych metod przenoszenia materiału genetycznego do roślin stał się możliwy dzięki rozwinięciu hodowli kultur in vitro. Kluczowym elementem tego procesu jest odtworzenie embrionu z kultury tkankowej lub komórki. Materiałem wyjściowym do regeneracji może być część liścia, łodygi, kalus, a nawet w niektórych przypadkach pojedyncza komórka somatyczna. Metody te stały się dostępne dla szeregu roślin w latach siedemdziesiątych, a zastosowanie w nich

rekombinacyjnego DNA stało się faktem w 1983 r. (7). Pierwsze testy polowe z roślinami otrzymanymi tymi technikami zostały przeprowadzone w 1986 r. w USA (2).

## WPROWADZANIE GENÓW DO KOMÓREK ROŚLINNYCH

Metody wprowadzania genów do komórek roślinnych można podzielić na następujące grupy:

- 1) transformacja poprzez fuzje komórek (protoplastów, protoplastów i sferoplastów),
- 2) wprowadzenie materiału genetycznego przy użyciu różnego rodzaju wektorów roślinnych,
- 3) bezpośrednie wprowadzenie DNA do komórek roślinnych, stymulowane efektorami chemicznymi i fizycznymi,
- 4) transformacja za pomocą liposomów,
- 5) mikroiniekcja DNA.

Metody te zostaną poniżej omówione w aspekcie ich przydatności do transformacji komórek roślinnych.

*Fuzja komórek.* Protoplasty roślinne są otrzymywane w dużej skali przez trawienie błon roślinnych za pomocą enzymów degradujących ściany komórkowe (8). W obecności pewnych związków chemicznych (np. polietylenoglikolu (PEG) i Ca) lub prądu elektrycznego protoplasty różnych gatunków mogą ulec fuzji (9). Powstałe komórki somatyczne często są zdolne do regeneracji ścian komórkowych i podziału. W ten sposób mogą być hodowane *in vitro* w postaci kalusa, z którego w niektórych przypadkach (włączając ziemniak, pomidor, petunie, tytoń, a także ostatnio rośliny jednoliścienne) można zregenerować całą roślinę (10,11). Niestety dotychczas nie uzyskano tą metodą roślin mających szersze znaczenie komercyjne. Największy potencjał tej

metody może polegać na tworzeniu nowych odmian przez zastosowanie tzw. jądrowego transferu i tworzeniu mieszanych cytoplazm z organelami z dwóch gatunków (chybrydy). Jednakże zarówno udoskonalone krzyżowanie roślin polegające na międzygenetycznym transferze DNA, jak i fuzja protoplastów, pozbawione są precyzji przeniesienia genów z jaką mamy do czynienia u bakterii. Powstałe chybrydy wymagają szeregu etapów, włączając w to krzyżowanie, aby można było uzyskać roślinę o wymaganej kombinacji cech. Bardzo przydatna byłaby możliwość wprowadzenia dokładnie zdefiniowanego genu do rośliny. Proces ten wymaga dwóch etapów: po pierwsze, izolacji konkretnego genu w czystej formie i w odpowiedniej ilości; po drugie, wprowadzenie genu do chromosomu rośliny w taki sposób aby mógł funkcjonować i być dziedziczony. Metoda oferująca taką możliwość jest fuzja protoplastów z sferoplastami. Te ostatnie są to pozbawione błony komórkowej komórki bakteryjne zawierające odpowiednie plazmidy. W ten sposób udało się wprowadzić do komórek ryżu sferoplasty *Agrobacterium* zawierające T-DNA, który ulegał ekspresji (12).

Są również doniesienia o fuzji protoplastów prowadzącej do przeniesienia jedynie kilku chromosomów lub jeszcze mniejszej jednostki genetycznej np. poprzez fuzje protoplastów inaktywowanych promieniami rentgena (3).

*Zastosowanie wektorów roślinnych.* Szereg bakterii z rodzaju *Agrobacterium* np. *A. tumefaciens* zawiera plazmid Ti (lub Ai). Indukuje on rozwój tkanki nowotworowej w roślinach poprzez przeniesienie określonego fragmentu DNA (T-DNA) do

jądra komórki roślinnej i zintegrowaniu go z chromosomalnym DNA. W normalnych warunkach tylko region T plazmidu Ti ulega włączeniu do chromosomalnego DNA (13,14). Poprzez identyfikacje w plazmidzie Ti sekwencji wymaganych do transferu i integracji DNA stało się możliwe utworzenie modyfikowanych plazmidów zawierających obce geny. W ten sposób geny te mogą być wprowadzone do rośliny za pośrednictwem *Agrobacterium*, ulec ekspresji i mogą być przekazywane potomstwu zgodnie z mendlowskimi prawami dziedziczenia. Zwykle taka transformacja komórek roślinnych zachodzi bez poważniejszych reorganizacji genów, jak to ma miejsce w przypadku bezpośredniej transformacji protoplastów. Plazmid Ti pozbawiony genów wirulencji w połączeniu z regulatorowymi fragmentami (35S) genów wirusa mozaiki tytoniu (CaMV) został użyty do skonstruowania szeregu wektorów zdolnych do wprowadzenia obcych genów do roślin przez połączenie tak zmodyfikowanego plazmidu Ti pozbawionego sekwencji kodujących onkogenność z regionami regulatorowymi wirusa oraz bakteryjnych genów odporności na antybiotyki uzyskano geny chimeryczne, które mogą funkcjonować w roślinach (15,16,17,18,). Geny te mogą służyć jako selektywne wskaźniki wprowadzenia materiału genetycznego usytuowanego na tym samym wektorze. Do transformacji wektorami wygodnie jest używać powierzchniowo sterylizowane dyski liścienne, które są inokulowane odpowiednim szczepem *A. tumefaciens* zawierającym określony wektor. Cała roślina jest następnie regenerowana z dysku liściowego (19).

W szeregu przypadkach lepsze wyniki uzyskuje się stosując infekcje roślinnych hodowli komórkowych lub kalusów za

pomocą *A. tumefaciens* (10,11,20). Dalszym udoskonaleniem tej techniki było zastosowanie protoplastów roślinnych. Po transformacji protoplastów za pomocą *A. tumefaciens* z protoplastów regeneruje się całe rośliny. Proces ten charakteryzuje się zwiększoną (choć ciągle dość niską) wydajnością transformacji  $10^{-5}$ . Metoda ta wymaga zastosowania związków stymulujących, takich jak: poli-L-ornityna (PLO) (21) lub polyetylenoglikol (PEG) (22).

Istnieją przesłanki wskazujące na to, że *Agrobacterium* może również uczestniczyć w przenoszeniu jednoniciowego liniowego DNA i podwójnieniowego kołowego DNA do komórek roślinnych (23). W tym przypadku protoplasty ryżu, pszenicy i sorgo były użyte w eksperymentach stosujących transformację indukowaną elektrycznie (24).

*Bezpośrednie wprowadzanie DNA.* Jednakże wiele roślin, włączając w to szereg ważnych roślin jednoliściennych, nie ulega infekcji za pomocą *Agrobacterium* (choć, ostatnio doniesiono o transformacji komórek *Asparagus* za pomocą plazmidu Ti (25)). Testowano również możliwość bezpośredniego przeniesienia DNA do komórek roślinnych. Proces ten zachodzi wydajnie w obecności związków stymulujących, jak np. PEG. Kombinacja szeregu czynników stymulujących pozwala uzyskać wydajność transformacji rzędu  $10^{-2}$  m.in. uzyskano transformowane protoplasty pszenicy wektorem pochodnym plazmidu pBR322 z wydajnością zbliżoną do transformacji petunii i tytoniu plazmidem Ti, aczkolwiek protoplasty niezdolne były do regeneracji rośliny (26). Inny rodzaj wektora będący chimerycznym plazmidem pABD1 zawierającym gen NPTII oraz elementy regulatorowe 35S uzyskane z CaMV może

być bezpośrednio przeniesiony do protoplastów tytoniu i trzciny cukrowej stosując stymulacje PEG. Maksymalna wydajność transformacji tą metodą sięga  $10^{-2}$  (6). Ograniczeniem tej metody są trudności związane z regeneracją z protoplastów wielu gatunków roślin. Inny proces zwiększający wydajność bezpośredniego przeniesienia DNA do komórek roślinnych jest oparty na stymulacji elektrycznej. Polega on na poddaniu komórek lub protoplastów wysokonapięciowemu impulsowi elektrycznemu, który powoduje odwracalne zwiększenie przepuszczalności membran ścian komórkowych. W trakcie tego procesu DNA obecny w roztworze dostaje się do wnętrza komórki i może ulec ekspresji w komórkach roślinnych. Pomyślne przeniesienie DNA uzyskano dla protoplastów marchwi, tytoniu, kukurydzy i pszenicy (27,28). Na proces ten silny wpływ mają stężenie DNA, amplituda i czas trwania impulsu elektrycznego oraz skład medium. Wydajność tego procesu sięga  $10^{-4}$ . Systematyczne badania czynników wpływających na wydajność stabilnych transformacji metodą elektrotransformacji doprowadziły w niektórych przypadkach do 1000-krotnego zwiększenia wydajności tego procesu (29). Jest to metoda mająca duże rokowania na coraz szersze zastosowanie dla układów roślinnych.

*Liposomy.* Choć metody stosujące chemiczną stymulację przenoszenia DNA do komórek oraz elektrotransformacja mają obecnie największe znaczenie, równolegle prowadzone są prace nad alternatywnymi metodami. Jedną z nich polega na użyciu do transformacji liposomów. Zastosowanie sztucznych liposomów zawierających plazmidy DNA doprowadziło do

uzyskania stabilnych transformacji protoplastów tytoniu (30).

*Mikroiniekcja.* Jedną z najnowszych technik zastosowanych do przeniesienia DNA do komórek roślinnych jest mikroiniekcja. Polega ona na mechanicznym wprowadzeniu roztworu DNA za pomocą pipety do roślinnych protoplastów. Pozwala ona na włączenie jednego lub kilku genów do komórki roślinnej, co redukuje liczbę generacji wymaganych do stabilizacji nowej cechy. W przeciwieństwie do metod wymagających użycia protoplastów czy kultur tkankowych regeneracja roślin może być wyeliminowana. Metoda ma zastosowanie zarówno do roślin jedno- jak i dwuliściennych. W ten sposób wprowadzono obce geny do protoplastów tytoniu z wydajnością transformacji  $14 \times 10^{-2}$  dla iniekcji do jąder i  $6 \times 10^{-2}$  dla iniekcji do cytoplazmy (31). Zastosowano ją również do lucerny z wydajnością  $15-26 \times 10^{-2}$  (32). Jak dotąd brak doniesień o pomyślnej regeneracji roślin z transformowanych w ten sposób protoplastów.

Wiele wysiłków skierowanych jest również w celu znalezienia i wykorzystania elementów transpozujących będących odpowiednikami elementu P w *D. melanogaster*, które mogłyby być wykorzystane jako wektory ogólnego zastosowania. Jeden z klasycznych systemów, potencjalnie ważny do wprowadzenia obcych genów do roślin, został sklonowany i scharakteryzowany w kukurydzy. Obejmuje on elementy Ac (Activator), Ds (Dissociation), Spm (Supressor-Mutator) oraz Cin1 i Teo1 (33,34).

Wydaje się również, że możliwe będzie, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, wprowadzenie obcych genów za pomocą

wirusów roślinnych specjalnie do tego celu zmodyfikowanych. Zwykle wirusowe zakażenie rośliny nie prowadzi do stabilnej transformacji, gdyż nie obserwuje się integracji wirusowego DNA z chromosomami rośliny. Jednakże uzależnienie ekspresji genów z opłaszczaniem wirusa pozwoliło na wprowadzenie za pomocą *Agrobacterium* do kukurydzy infekcyjnego wirusa (35,36). Potencjalnie pewne znaczenie ma również zastosowanie patogennych geminiwirusów o genomie zbudowanym z jednoniciowego DNA (37).

Istnieją również możliwości klonowania materiału genetycznego z mitochondriów i chloroplastów oraz ich transformacja za pomocą plazmidów mitochondrialnych i sekwencji mitochondrialnego chromosomalnego DNA zawierających replikon.

#### GENY INDYKATOROWE

Równoległe z pracami mającymi na celu zwiększenie możliwości wprowadzenia obcego materiału genetycznego do roślin prowadzono doświadczenia nad metodami pozwalającymi śledzić wprowadzone geny. Opracowano szereg selektywnych wskaźników mogących służyć do pomiaru przeniesienia DNA do komórek roślinnych (2). Skonstruowano geny chimeryczne zawierające selektywne wskaźniki (zob. zestawienie).

#### Zestawienie

##### Geny indykatorowe transformacji

Syntaza nopalinowa (Nos)-synteza opin(43).

Transferaza neomycyny (NPTII)-odporność na kanamycynę, neomycynę(26).

Acetylotransferaza chloramfenikolu-odporność na chloramfenikol(44)  
Luciferaza(45)  
Reduktaza dwuhydrofolanu

Ponadto testuje się przydatność wprowadzania genów pod kontrola promotorów regulowanych czynnikami zewnętrznymi np. szokiem temperaturowym, indukcją świetlną itd. (46).

#### NAJNOWSZE OSIĄGNIĘCIA

Przedstawione metody stanowią potężny aparat technologiczny, którego zastosowanie, jak sędzę, spowoduje głębokie zmiany w metodach ulepszania materiału genetycznego roślin. Obecnie istnieje szereg dobrze zdefiniowanych pojedynczych genów, których wprowadzenie do roślin spowoduje uzyskanie wartościowych odmian roślin uprawnych. Ostatnio doniesiono o uzyskaniu szeregu roślin o genetycznie ulepszonych właściwościach. Komórki i zregenerowane rośliny petunii transformowane chimerycznym genem nadprodukującym enzym syntazę 5-enolopiruwiłszikimat-3-fosforanu wykazały tolerancję na herbicyd glyphosate będący inhibitorem tego enzymu (38,39). Dyski liścienne tytoniu transformowane za pomocą *A. tumefaciens* wektorem zawierającym chimeryczne geny NPTII oraz białka płaszczka mozaikowego wirusa lucerny (AMV) będące pod kontrola promotora 19S (CaMV). Zregenerowane rośliny produkowały białko płaszczka wirusa i wykazywały specyficzną odporność przeciwko zakażeniom wirusem AMV (40,41). W podobny sposób wprowadzono do tytoniu geny specyficznej toksyny wyizolowanej z bakterii *Bacillus thuringiensis*. Zregenerowane rośliny produkowały toksynę i

wykazywały specyficzną odporność przeciwko owadom z rodziny Lepodoptera (42).

#### WNIOSKI

Nowe technologie reprezentują duży potencjał specyficznego wprowadzania określonych genów do roślin w celu uzyskania ściśle zdefiniowanego efektu. Jednakże aby w pełni wykorzystać te możliwości niezbędne jest poznanie molekularnych podstaw determinujących ważne gospodarczo właściwości roślin i wydzielenie genów kodujących te cechy. Jest zatem oczywiste, że biotechnologia roślin do realizacji swych celów wymagać musi bardziej kompleksowego podejścia i udziału szeregu dyscyplin nauki - biochemii, biologii molekularnej, mikrobiologii, genetyki stosowanej, botaniki i innych. Tylko wtedy nowoczesna biotechnologia będzie mogła skutecznie zwielokrotnić produktywność i użyteczność roślin i spełnić pokładane w niej nadzieje społeczne.

#### Literatura:

1. Genetic Technology. A new Frontier. Westview Press 1982. Dir. J.H.Gibbons.
2. M. Goodman, H.Hauptli, A.Crossway and V.C.Knauf. Science 236,1987,48-54.
3. J.R.Bedbrook. Genetic Enginering of Plants and Microorganisms Important for Agriculture. 1985,627-636, E. Magnien and D.deNettancourt eds. Martinus Nijhoff/Dr W.Junk Publishers.
4. G.F. Sprague, D.E.Alexander and J.W.Dudley. BioScience 30,1980,17.

5. W.J.C. Lawrence, Plant Breeding, London: Edward Arnold Ltd. 1968.
6. E.C. Cocking and M.R. Davey. Science, 236, 1987, 1259-1262.
7. N. Murai, D.W. Sutton, M.G. Murray, J.L. Slightom, D.J. Merlo, N.A. Reichert, C. Segupta-Gopalan, C.A. Stock, R.F. Barker, J.D. Kemp and T.C. Hall. Science 222, 1983, 476-482.
8. T. Murashige. AnnRev. Plant Physiol. 25, 1974, 135-166.
9. J.F. Shepard, D. Bidney, T. Barsby and R. Kemble. Science 219, 1983, 683-688.
10. R.B. Horsch et. al. Science 223, 1984, 496.
11. M. DeBlock et. al. EMBO. J. 3, 1984, 1681.
12. A. Baba, S. Hasezawa, K. Syono. Plant Cell Physiol. 27, 1986, 463.
13. R. C. Gardner and V. C. Knauf. Science 231, 1986, 725-727.
14. P. J. J. Hooykaas and R. A. Schilperoort. TIBS Aug. 1985, 307-309.
15. R. B. Simpson, A. Spielmann, L. Margossian and T. D. McKnight. Plant Mol. Biol. 6, 1986, 403.
16. J. Paszkowski, R. D. Shillito, V. Mandak, M. Saul, T. Hohn, B. Hohn and I. Potrykus. EMBO. J. 3, 1984, 2717-2722.
17. R. Hain, P. Stabel, A. P. Czernilowski, H. H. Steinbiss, L. Herrera-Estrella and J. Schell. Mol. Gen. Genet. 199, 1985, 161-168.
18. P. Zambryski, L. Herrera-Estrella, M. deBlock, M. van Montague and J. Schell. Genetic Engineering, 1984, Vol. 6 A. Halaender and J. Setlow eds. Plenum Press NY.
19. R. B. Horsch, J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley. Science 227, 1985, 1229-1231.
20. L. Marton, G. J. Wullems, L. Molendijk and R. A. Schilperoort, Nature 227, 1979, 129.

21. M.R.Davey et al. Plant Sci. Lett. 18,1980,307.
22. F.A.Krens, L.Molendijk, G.J.Wullems and R.A.Schilperoort, Nature 296,1982,72.
23. S.E.Stachel, E.Messens, M.van Montagu and P.Zambryski. Nature 318,1985,624,
24. T.-M.Ou-Lee, R.Turgeon and R.Wu. Proc Natl.Acad.Sci.USA, 83,1986,6815.
25. Sp.P.Hernalsteens, L.Thiu-Toong, J.Schell and M.Montagu, EMBO.J. 3,1984,3039.
26. H.Lorz, B.Baker and J.Schell, Mol.Gen.Genet. 199,1985,178.
27. M.Fromm, L.P.Taylor and V.Walbot, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82,1985,5824.
28. W.Werr and H.Lorz. Mol.Gen.Genet. 202,1986,471.
29. R.D.Shillito, M.W.Saul, J.Paszkowski, M,Muller and I.Potrykus. Biotechnology, 3, 1985,1099-1103.
30. M.Caboche and A.Deshayes. C.R.Acad.Sci. (Paris) 299,1984,663.
31. A.Crossway et al. Mol.Gen.Genet. 202,1986,179.
32. T.J.Reich, V.N.Iver and B.L.Miki. BioTechnology (NY) 4,1986,1001.
33. J.R.S.Fincham, Nature, 306,1083,425-426.
34. H.P.Doring, E.Tillmann and P.Strlinger. Nature 307,1984,127-130.
35. N.Grimsley, T.Hohn, J.W.Davies and B.Hohn. Nature, 325,1987,177.
36. N.Brisson, J.Paszkowski, J.R.Penswick, B.Gronenborn, I.Portykus and T.Hohn. Nature 310,1984,511-514.
37. J.Stanley. Nature 305,1983,643-645.

38. L. Comai, D. Facciotti, R.W. Hiatt, G. Thompson, R.E. Rose and D.M. Stalker. *Nature* 317, 1985, 741-744.
39. D.M. Shah, R.B. Horsch, H.J. Klee, G.M. Kishore, J.E. Winter, N.E. Tumer, C.M. Hironaka, P.R. Sanders, C.S. Gasser, S. Aykent, N.R. Siegel, S.G. Rogers and R.T. Fraley. *Science* 233, 1986, 478-481.
40. C.J. Houwing and E.M.J. Jaspars. *FEBS Lett.* 209, 1986, 284-288.
41. L.S. Loesch-Fries, D. Merlo, T. Zinnen, L. Burhop, K. Hill, K. Krahn, N. Jarvis, S. Nelson and E. Halk. *EMBO J.* 6, 1987, 1845-1851.
42. M. Vaeck, A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu and J. Leemans. *Nature* 328, 1987, 33-37.
43. G.M.S. Hooykaas-van Slogteren, P.J.J. Hooykaas and Schilperoot, *Nature* 311, 1984, 763-764.
44. M. Boutry, F. Nagy, C. Poulsen, K. Aoyagi and N.C. Chua. *Nature* 328, 1987, 340-342.
45. D.W. Ow et al. *Science* 234, 1986, 856.
46. M.P. Timko, A.P. Kausch, C. Castresana, J. Fassler, L. Herrera-Estrella, G. van den Broeck, M. Van Montagu, J. Schell and A.R. Cashmore. *Nature* 318, 1985, 579-582.