

## 人蔘의 Crown Gall Tumor 形成에 關한 研究

崔光泰 · 梁德春

韓國人蔘煙草研究所

(1986年 1月 27日 接受)

### Formation of Crown Gall Tumor in *Panax ginseng* C.A. Meyer

Kwang-Tae Choi and Deok-Chun Yang

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute

(Received Jan. 27, 1986)

#### Abstract

These studies were carried out to obtain the basic information about transformation of ginseng plant by potential vector system, utilization of opine compound by *Agrobacterium* spp., and initiation of crown gall tumor callus. Crown gall tumors were induced from stem of *Panax ginseng* C.A. Meyer by infection of *Agrobacterium tumefaciens*. Therefore, it was clarified that transformation of ginseng by Ti plasmid was possible. The crown gall tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens* isolated from the soil were different in a shape, size, and growth rate. Especially, infection of ginseng by *Agrobacterium tumefaciens* Y104 led to the amorphous tumor. Tumor tissue derived from stem crown gall could not be continuously cultured on the medium which did not contain phytohormone, and did not form the callus even on the medium supplemented with 2,4-D. On the other hand, the root crown gall tumors formed the calli but the formation rate of callus was quite low.

As for the utilization of octopine and nopaline, it was found that 3 strains of *Agrobacterium* spp., Y104, Y110 and C58, utilized nopaline only, Y109 utilized octopine, and Y101 failed to utilize either compound.

#### 緒 論

最近 遺傳工學 技術의 發達로 미생물 분야에서는 遺傳子 再組合 技術에 依한 인슐린, 인터페론 등이 생산단계에까지 와있지만 高等植物細胞의 遺傳子操作은 實用化 단계에 있지 않으며, 한층 더 높은 수준의 기술을 요구하고 있다. 이런 원인은 물론 여러가지 이유가 있겠지만 무엇보다도 외부 유전 인자를 植物体内的 chromosomal DNA와 組合시키기

위해서 필요한 中間매개체인 vector system이 開發되지 못하고 있는 점이 가장 큰 원인이라고 할 수 있겠다. 현재 植物遺傳工學用 potential vector로서는 植物에 기생하거나 공생하는 세균의 plasmid와 식물 virus - 특히 cauliflower mosaic virus(CaMV) - 그리고 mitochondria DNA와 chloroplast DNA 같은 cytoplasmic DNA 등이 있으며 이들에 관한 研究가 많이 수행되고 있다<sup>3,6,7,11,14,19</sup>. 특히 세균의 plasmid로서는 crown gall이나 cane gall처럼 tumor를 inducing할 수 있는 Ti-plasmid와 hairy root를 inducing할 수 있는 Ri-plasmid가 상당히 각광을 받고 있는데, crown gall tumor는 *Agrobacterium tumefaciens*를 植物체에 상처를 주고 감염시켰을 때 형성이 되며, hairy root는 *A. rhizogenes*를 감염시켰을 때 형성된다<sup>3</sup>. Crown gall tumor가 形成된 원인에 대해서는 이미 많은 보고가 발표되었는데 Ti-plasmid의 일부인 T-DNA가 식물 세포의 nuclear DNA에 integration되어 형질 전환이 유도되어 gene expression이 일어남으로써 tumor가 형성되는 것으로 알려져 있다<sup>7,15,18</sup>. 이러한 tumor는 정상 식물 조직과는 달리 크게 2가지의 特性을 갖게 되는데 우선 자체내에서 phytohormone을 충분히 생성해냄으로써 조직 배양시 exogenous hormone을 전혀 첨가하지 않아도 분화될 수 있으며, 또 하나는 아미노산 유도체인 opine이란 化合物을 생성할 수 있다는 점이다. 이러한 特性은 정상 조직이 형질 전환이 되었음을 판단할 수 있는 유전적 선별 표시가 되므로 somatic hybrid를 창출해 낼 때 매우 유용하게 marker로서 활용할 수도 있다<sup>16,17</sup>. Opine化合物은 크게 octopine, nopaline 그리고 agropine 등으로 구분되는데 이런 물질들은 *Agrobacterium* spp.의 strain에 따라 활용할 수 있는 범위가 달라지는데, octopine 혹은 nopaline 중 하나만을 활용할 수 있는 strain이 있는가 하면 둘 다 활용못하거나, 또한 모두다 활용할 수 있는 strain도 있다<sup>10</sup>.

本 實驗은 植物遺傳工學用 vector system 개발 연구의 일환으로 우선 다년생 식물인 人蔘에서 Ti-plasmid에 依한 형질 전환 가능성을 타진하기 위하여 토양중에서 선발한 *A. tumefaciens*의 여러 strain<sup>4</sup>과 *A. tumefaciens* C58을 人蔘의 각 부위에 감염시킨 후 crown gall tumor의 형성능과 형태 및 이들 組織의 phytohormone autonomy 能力을 調査 하였으며, 또한 *Agrobacterium* spp.에 의해 利用된 opine 化合物의 種類와 carbon이나 nitrogen source로 활용할 수 있는 能力을 測定하였던 바 얻어진 결과를 이에 보고한다.

## 材料 및 方法

공시 材料 : 본 실험에 使用한 植物은 2년생 人蔘 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)으로서, 이들을 시판되고 있는 vermiculite, perlite, peatmoss를 각각 3 : 1 : 1로 배합한 상토에 재식하였으며, flower bed(30×80m)당 48분씩 심은 후 인공 기상실에서 栽培하였다.

공시 균주 : 당 연구실에서 선발한 土壤菌 *Agrobacterium tumefaciens* Y101~Y110 10균주<sup>4</sup>와 *Agrobacterium tumefaciens* C58을 本 實驗에 使用하였으며, 이들 菌株들은 YEB(Nutrient broth 13.3 g, Yeast extract 1.0 g, Sucrose 5.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.24 g, ddH<sub>2</sub>O 1 l) 배지에서 29°C 로 100rpm gyratory shaker에서 현탁 배양하였다.

접종 방법 : YEB 배지에서 현탁 배양된 *Agrobacterium* spp. 가 spectrophotometer의 600nm의 파장에서 O. D.가 0.8 (cell density는 대략  $10^8/ml$ )이 되었을 때 인삼의 각 부위(뿌리, 줄기, 잎)에 상처를 주고 주사기로 균주를 감염시켰다.

Opine 化合物 測定 : *Agrobacterium* spp. 의 opine 化合物 利用能力을 調査하기 위해서 공시 균주 중 crown gall tumor가 형성된 Y101, Y104, Y109, C58과 tumor 形成이 안된 Y110을 대상으로 하여 測定하였다. SM培地( $K_2HPO_4$  10.25g,  $KH_2PO_4$  7.25g,  $(NH_4)_2SO_4$  3.0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g, NaCl 0.15g,  $CaCl_2$  0.1g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0025g, Glucose 4.0g, ddH<sub>2</sub>O 1ℓ)에서 nitrogen source를 빼고, 대신 opine 化合物인 octopine과 nopaline을  $50\mu g/ml$  첨가한 후 균주를 접종하여 48時間 培養하였다. 이 때 octopine과 nopaline은  $0.22\mu m$  pore size membrane filter (millipore)로 멸균한 후 SM-N 배양액에 첨가하였으며, SM배지 조제시 glucose와  $CaCl_2$ 는 각각 별도로 autoclave한 후 혼합하여 사용하였다. 48時間 균 배양 후 5ml의 현탁액을 채취하여 spectrophotometer에서 cell growth rate를 測定하고 나서, 현탁액을 centrifuge에서  $10,000 \times g$ 로 15분동안 원심 분리한 후 상등액 3ml를 취하여 opine 化合物을 測定하였다. 測定方法은 1ml의 상등액에 1ml의 0.9N NaOH를 첨가한 후 vortex mixer로 혼합한 후 1ml의  $\alpha$ -naphthol-diacetyl reagent(3%  $\alpha$ -naphthol, 0.015% diacetyl, 60% n-propanol)를 다시 혼합한 후 실온에서 30분동안 방치한 후에 spectrophotometer 530nm 파장에서 O. D.를 測定하여, 그 결과를 대조구와 비교하여 使用량을 %로 환산하였다.

Callus유기 : 人蔘의 뿌리와 줄기에 形成된 crown gall tumor 조직을 예리한 면도날로 가능한한 정상조직에서 부터 떨어져 있는 조직을 절취하여 깨끗이 세척한 후 표면 살균을 위해서 70%EtOH 용액에 3分間 處理한 후 2%의 NaClO 용액에서 15分間 침지하여 멸균 증류수로 4회 세척하였다. 세척된 조직을 잘게 썰어 phytohormone free MS배지에 추가로  $10\mu g/ml$ 의 kanamycin이 첨가된 고체 배지에 접종하여  $25 \pm 1^\circ C$ 의 배양실에서 암상태로 배양하여 tumor callus를 유기하였다.

## 結果 및 考察

### 1. Crown gall tumor의 유기

人蔘에서 *Agrobacterium* spp.에 의한 형질 전환 여부를 調査하기 위해서 人蔘의 각 부위(잎, 줄기, 뿌리)에 상처를 주고서 *A. tumefaciens* C58을 감염시켜 crown gall tumor (根頭癌腫病)의 形成 여부를 관찰하였던 바, 結果는 Figs. 1~3과 같다.

Crown gall tumor는 人蔘의 모든 部位에서 잘 形成되었으며(Figs. 1~3), 감염 후 2개월 후에는 tumor의 형태가 일반 조직 배양시 形成된 callus의 모습과 비슷한 형태로서(Figs. 1 and 2) friable한 callus의 양상을 보였다. 그러나 人蔘의 뿌리에서 形成된 tumor의 形能(Fig. 3)는 매우 치밀하고 tight한 형태의 tumor 모습을 보이며 잎이나 줄기에서 形成된 tumor tissue와는 判異하였다. 이러한 원인은 T-DNA에서 tumor 形成에 關係하는 tumor inducing gene(onc-gene)은 phytohormone인 auxin과 cytokinin 形成 유전자

임이 밝혀져 있는 바<sup>5)</sup>, crown gall tumor의 形態는 바로 이 種類의 hormone의 비율에 의하여 달라지는 것으로 사료된다. Amasino等<sup>1)</sup>은 煙草에서 形成된 crown gall tumor의 形態에 미치는 phytohormone의 영향을 調査하기 위하여 여러 형태의 tumor조직에서 cytokinin양과 IAA양을 測定한 바, friable unorganized tumor조직에서는 cytokinin양

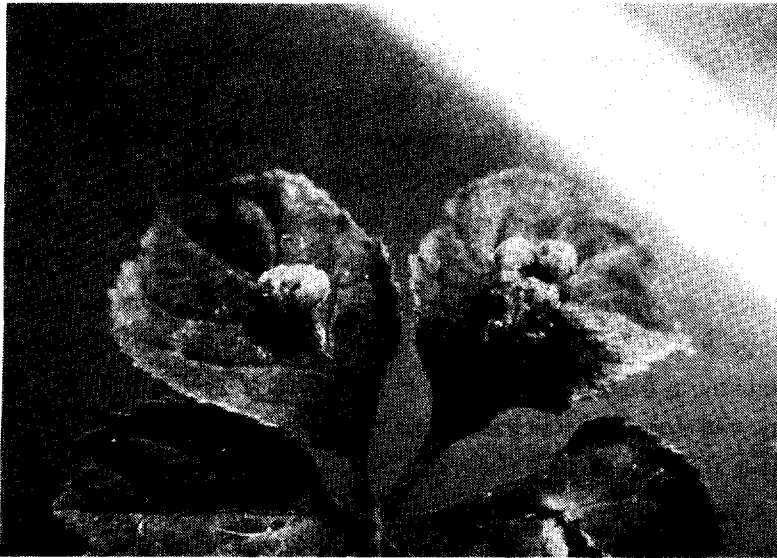


Fig. 1. Crown gall tumors induced by *A. tumefaciens* C58 in ginseng leaves.

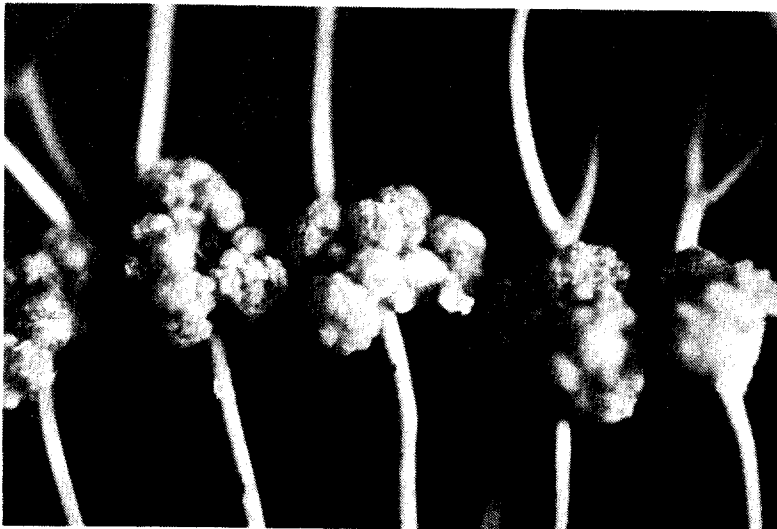


Fig. 2. Crown gall tumors induced by *A. tumefaciens* C58 in ginseng stems.

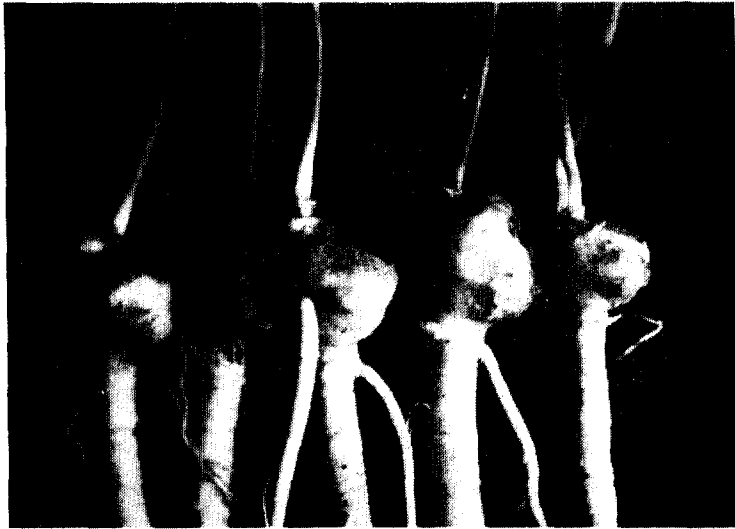


Fig. 3. Crown gall tumors induced by *A. tumefaciens* C58 in ginseng roots.

보다 IAA 양이 더 많이 존재하였으며, compact unorganized tumor에서는 cytokinin의 양에 비해 IAA 양이 매우 적었음을 보고하였다.

본 실험에서 나타난 결과에서는 tumor의 形態가 잎과 줄기에서는 friable한 unorganized tumor의 형태이며, 뿌리에서 형성된 tumor는 compact한 tumor조직이라고 간주할 때 부위에 따라 tumor의 형태가 달라지는 것은 식물 조직에 따라 phytohormone형성 능력이 달라짐을 의미할 수 있으며, 또 하나는 정상 식물체내에서 IAA는 주로 coleoptile이나 stem의 생장에 관여하므로 이 부위에서 생성이 많고, 뿌리 부근에서는 cytokinin이 주로 형성되어 위로 이동된 관계로 crown gall tumor 조직 자체내에서 생성한 phytohormone과 정상 식물체의 조직에서 만들어 낸 endogenous hormone이 서로 combination되어 작용함으로써 이러한 결과를 가져온 것으로 사료된다.

## 2. *Agrobacterium tumefaciens*의 strain別 crown gall tumor 形成能 比較

토양중에서 선발한 *A. tumefaciens* 10균주의 tumor 形成 여부를 調査하기 위해서 人蔘의 줄기에 상처를 주고 균주를 감염시켰던바, Y101, Y104, Y109에서만 crown gall tumor가 형성되었고 다른 균주는 모두 avirulence이었다. 그리고, 形成된 crown gall tumor의 4개월 후의 樣相을 보면 菌株에 따라 tumor의 形成能和 形態 등에 심한 차이가 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). *A. tumefaciens* C58 감염시에는 당 연구실에서 선발한 균주들보다 tumor의 形成時期도 빨랐지만 접종 후 2~3개월까지는 cell division이 매우 왕성하게 일어나 성장 속도가 빨라짐으로써 fresh weight도 상당히 높은 경향을 보였다. 그러나, 3개월 후부터는 다른 tumor들에 비해 급격히 senescence가 일어나 색깔이 brown으로 변하면서 4개월 후에는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 까맣게 변색된 후 거의 죽어가는 상태를 관찰할 수 있었다. 반면에 다른 균주는 tumor 형성 시기와 성장 정도는 늦었지만 4개월 후에도 꾸준히 증식되고 있음을 알 수 있었다. 그래서 이런 균주들에 의해 형성된 tumor



Fig. 4. Crown gall tumors induced by *A. tumefaciens* strains in ginseng stems. Infected strains (left to right): C58, Y104, Y101, Y109, Y110.

의 生体量과 形態를 調査한 結果, C58은 接種 2개월 후에는 2.88 g 으로서 生体量이 가장 높았으나 4개월 후에는 0.45 g 으로 senescence가 일어나 거의 死滅하였다(Table 1). 그러나, Y101은 2개월 후에는 0.64 g 으로 매우 저조했으나 4개월 후에는 1.13 g 으로 상당히 증식되었으며 계속 생장을 하고 있었다. 반면 Y110은 tumor가 전혀 형성되지 않은 avirulent bacteria 이었다. 또한 tumor의 형태도 매우 다양했는데 C58, Y101, Y109는 callus 형태의 unorganized tumor 이었으며, Y104는 부정형의 amorphous tumor의 형태를 나타내었다(Fig. 5).

Table 1. Fresh weight of ginseng crown gall tumor induced by *A. tumefaciens* strains

Strains	F.W. (g) of tumors after		Morphology of tumors
	2 months	4 months	
C58	2.88±0.45*	0.45±0.15	Undifferentiated
Y101	0.64±0.15	1.13±0.21	Undifferentiated
Y109	V**	0.07±0.05	Undifferentiated
Y104	1.08±0.38	1.89±0.51	Amorphous
Y110	0	0	Avirulent

\* Values are means of 20 ginseng plants.

\*\* Visible.

Tumor 種類는 크게 3가지로 분류하고 있는데<sup>2)</sup> callus모양의 unorganized tumor, 기형의 shoot이지만 teratoma까지는 될 수 없고 unorganized tumor 형태를 넘어서 부정형의 green color인 amorphous tumor로 나누어지고 있다. 이러한 tumor의 형태는 使用한 균주의 種類에 따라, 그리고 식물의 種類 등에 따라 차이가 생기는데 본 실험 결과 人蔘

줄기에 C58을 접종했을 때는 전혀 teratoma가 형성되지 않았고, Y104에서는 amorphic tumor가 형성되었는데 특히 Y104에 대해서는今後 계속 研究檢計되어야 할 것이다. 왜냐하면 C58은 nopaline type bacteria로서 연초등에 접종했을 때 teratoma를 형성할 수 있었는데<sup>13,18)</sup>, 人蔘에서는 전혀 형성되지 않은 것으로 보아 C58에 비해 Y104가 cytokinin의 생성이 더 많이 되지 않았나 생각되어지며, 또한 접종 부위가 아닌 다른 부위에서 또다른 tumor인 secondary tumor가 C58 접종에 의해 연초에서 많이 생성되었는데, 人蔘에서는 전혀 형성되지 않았음을 관찰할 수 있었다.



Fig. 5. Amorphic tumors induced by *A. tumefaciens* Y104 in ginseng stem.

### 3. Crown gall tumor 培養에 의한 callus 形成

人蔘의 잎, 줄기, 뿌리 등에서 形成된 crown gall tumor 조직의 callus 形成能을 究明하기 위하여 여러 가지 培養基에서 培養하였던 바 그 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. The formation of callus from crown gall tumor and normal tissue of ginseng cultured on the phytohormone free media

Explant	No. of explant		Percent
	Cultured	Differentiation*	
RT	92	2	2.2
RN	21	0	0.0
ST	136	0	0.0
SN	23	0	0.0

\* Investigated 1 month after inoculation.

RT: Root crown gall tumor tissue, RN: Normal root tissue,

ST: Stem crown gall tumor tissue, SN: Normal stem tissue.

人蔘의 각 부위 tumor tissue를 hormone free media에서 培養한 結果를 보면, 培養 4個月이 지나도 stem tumor에서는 callus가 전혀 形成되지 않았으며, root tumor에서는 callus 形成率이 2.2%로서 煙草를 비롯한 他植物의 경우와는 判異하게 callus 形成率이 낮은 傾向을 보였다(Table 2). 一般적으로 人蔘은 특이하게 他植物과는 달리 2,4-D를 많이 요구하는 식물체인 관계로 추가로 2,4-D를 1, 3, 5mg/l 씩 添加하여 배양한 결과, 正常的인 root tissue는 callus가 形成되었지만 tumor tissue는 전혀 반응을 보이지 않고 callus가 형성되어 없었다(Table 3). 그러나 tumor root 조직에서는 극히 일부이지만 callus가 유기되긴 하였으나 형성율은 대단히 낮았으며, 形成된 tumor callus의 形態도 정상 조직에서 callus가 유기된 모습과 상당히 차이가 있었다. 즉, 정상 조직에서는 조직의 전체 부위에서 callus가 형성된 모습이었으나 tumor 조직에서는 어느 일부에서 callus division이 일어나 증식된 모습이었다. 또한, 2,4-D첨가 배지에서도 1mg/l 에서만 41개 explant 중 2개가 callus를 형성하였을 뿐, 3mg/l, 5mg/l 에서는 전혀 callus가 형성되지 않아 tumor callus의 유기에 2,4-D가 영향을 미치지 못하는 것을 관찰할 수 있었다(Table 3). 반면에 정상 조직에서는 2,4-D첨가에 의해 매우 민감한 경향을 보였는데 hormone첨가 배지에서는 86%이상의 callus가 유기되었고 유의성은 없었지만 2,4-D 1mg/l 첨가시 3mg/l, 5mg/l 첨가했을 때 보다 callus의 무게가 다소 높은 경향을 보였다. 그러나 人蔘 tumor 조직에서 callus가 잘 형성되지 않은 점에 대해서는 추후 다각적인 면에서 검토가 이루어져야 할 것이며, 특히 여러 종류의 다른 phytohormone과 濃도에 對한 研究가 進行되어야 할 것으로 사료된다.

**Table 3.** The formation of callus from crown gall tumor and normal tissue of ginseng cultured on the media with 2,4-D

Conc. of 2,4-D(mg/l)	Explant	No. of explant		F.W. of callus	Percent
		Cultured	Differentiation*		
1	RT	41	2	0.202 ± 0.131	4.9
	RN	44	38		86.4
	ST	22	0		0.0
	SN	23	0		0.0
3	RT	43	0	0.160 ± 0.142	0.0
	RN	46	41		89.1
	ST	23	0		0.0
	SN	23	3		13.0
5	RT	46	0	0.122 ± 0.101	0.0
	RN	43	40		93.0
	ST	21	0		0.0
	SN	23	0		0.0

\* Investigated 1 month after inoculation.

RT: Root crown gall tumor tissue, RN: Normal root tissue.

ST: Stem crown gall tumor tissue, SN: Normal stem tissue.



#### 4. *Agrobacterium tumefaciens*의 strain別 opine化合物의 利用

토양중에서 선발한 *A. tumefaciens*의 여러 strain 중 crown gall tumor를 形成하는 Y101, Y104, Y109와 avirulent인 Y110 및 C58을 대상으로 opine化合物 활용 능력을 測定한 結果, amorphous tumor를 形成했던 Y104와 C58 및 avirulent인 Y110은 nopaline type이었지만 crown gall tumor의 形成能이 비교적 약했던 Y109는 octopine type이었으며, Y110은 nopaline과 octopine 중 어느 것도 활용하지 못했다(Table 4).

**Table 4.** The growth and opine utilization rate of various strains of *Agrobacterium tumefaciens* after 48 hours of incubation

Strains	Growth* on SM-N with		Util. **rate(%) of		Growth* on		Type
	Nopaline	Octopine	Nopaline	Octopine	SM-N	SM	
101	0.649	0.643	0	1	0.656	1.207	—
104	0.978	0.763	82	2	0.783	0.841	Nopaline
109	0.233	0.457	5	80	0.287	0.689	Octopine
110	0.270	0.074	81	0	0.139	0.823	Nopaline
C58	0.793	0.668	93	8	0.534	2.62	Nopaline

\* Absorption (O.D. of spectrophotometer at 660 nm).

\*\* Utilization by *A. tumefaciens* strains.

Arginine의 유도체인 opine化合物에는 크게 octopine(agrinine + pyruvate)과 nopaline (arginine +  $\alpha$ -ketoglutarate) 그리고 null type인 agropine으로 나뉘어지는데 이런 물질은 *Agrobacterium* spp.에 의하여 생성되기도 하지만 파괴도 가능하므로 때에 따라서는 carbon source나 nitrogen source로도 활용될 수 있다<sup>1,10</sup>. 그러나, crown gall tumor에서는 opine化合物를 생산할 수 있지만 자체내에서 분해시켜 활용할 수는 없다. 이런 원인은 Ti-plasmid 유전자 배열에는 opine化合物를 분해할 수 있는 유전자가 존재하므로 Ti-plasmid를 가지고 있는 *Agrobacterium*은 opine化合物를 분해하여 활용 가능하지만 식물 세포내에 도입되는 T-DNA 유전자 배열에는 opine을 생성할 수 있는 유전자는 가지고 있으나 opine化合物를 분해할 수 있는 유전자는 존재하지 않으므로 crown gall tumor 조직은 opine化合物를 에너지 source로 활용할 수 없다<sup>9</sup>.

### 要 約

人蔘에 利用할 수 있는 vector system의 開發研究의 一環으로 于先 *Agrobacterium* spp.를 人蔘의 莖, 줄기 및 뿌리에 接種하여 crown gall tumor의 形成 및 脫分化 그리고 *Agrobacterium* spp.의 opine化合物의 利用程度등을 調査하였던 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. *Agrobacterium tumefaciens* C58은 人蔘의 모든 部位에서 crown gall tumor를 形成하였으나 secondary tumor나 teratoma는 형성하지 못했다.

2. Wild type *Agrobacterium tumefaciens* Y101, Y104, Y109는 crown gall tumor를 형성하였으며, tumor의 形態, 크기 그리고 생장 정도는 strain別로 차이가 있었다.
3. *Agrobacterium tumefaciens* Y104는 特히 amorphous tumor를 形成하였다.
4. 줄기에서 形成된 tumor 조직에서 callus를 유기하고자 phytohormone free 배지 및 2,4-D 첨가 배지에 接種한 結果 전혀 callus가 形成되지 않았다.
5. 뿌리에서 形成된 tumor 조직은 phytohormone free 배지와 2,4-D 1mg/l 첨가 배지에서 callus가 形成되긴 하였으나 出現 빈도가 극히 낮았으며, 정상 조직과는 달리 2,4-D의 효과가 微微하였다.
6. *Agrobacterium* spp.에 依한 opine化合物의 利用能力을 調査한 結果, *Agrobacterium tumefaciens* Y104, Y110과 C58은 nopaline type이었고 Y109는 octopine type이었으며, Y101은 nopaline과 octopine 어느 것도 利用하지 못하였다.

## 引 用 文 獻

1. Amasino, R. M. and C. O. Miller : *Plant Physiology* **69**, 389 (1982).
2. Caplan, A. B., M. V. Montagu and J. Schell : *J. Bacteriology* **161**(2), 655(1985).
3. Chilton, M. D., D. A. Tepfer, A. Petit, C. David, C. D. Francine and J. Tempe : *Nature* **295**(4), 432(1982).
4. Choi, K. T., D. C. Yang, H. S. Baik, S. W. Park and C. H. Lee : *Kor. J. Breed.* **17**(4), 348(1985).
5. Hedgcock, G. G. : U.S.D.A. *Bar. Pl. Industr. Bull.* 186(1910).
6. Holsters, M., B. Silva, F. V. Vliet, C. Genetello, M. D. Block, P. Dhaese, A. Depicker, D. Inze, G. Engler, K. Villarroel, M. V. Montagu and J. Schell : *Plasmid* **3**, 212(1980).
7. Hooykaas, P. J. J., P. M. Klapwijk, M. P. Nuti, R. A. Schilperoort and A. Rorsch : *J. Gen. Microbiol.* **98**, 477(1977).
8. Inze, D., A. Follin, M. V. Lijsevettens, C. Simoens, C. Genetello, M. V. Montagu and J. Schell : *Mol. Gen. Genet.* **194**, 265(1984).
9. Koekman, B. P., G. Ooms, P. M. Klapwijk and R. A. Schilperoort : *Plasmid* **2**, 347(1979).
10. Lippincott, J. A., R. Beiderbeck and B. B. Lippincott : *J. Bacteriology* **116**(1), 378(1973).
11. Stephen, H. H., L. L. Walker and R. M. Walden : *Nature* **293**(8), 483 (1981).
12. Stewart, F. C., F. M. Rolfs and F. H. Hall : *New York Agric. Exp. Sta. Bull.* **191**, 291 (1900).
13. Turgeon, R. : *Planta* **153**, 42 (1981).
14. Vedel, F., F. Quetier and M. Bayen : *Nature* **263**, 440(1976).
15. Willmitzer, L., M. D. Beuckeleer, M. Lemmers, M. V. Montagu and J. Schell : *Nature* **287**(25), 359 (1980).
16. Wullems, G. J., C. Molendijk and R. A. Schilperoort : *Theor. Appl. Genet.* **56**, 203(1980).
17. Wullems, G. J., L. Molendijk, G. Ooms and R. A. Schilperoort : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**(7), 4344 (1981).
18. Yadav, N. S., K. Postle, R. K. Saiki, M. F. Thomashow and M. D. Chilton : *Nature* **287**, 458 (1980).
19. Yamaguchi, H. and H. Kakiuchi : *JPN. J. Genet.* **58**, 607 (1983).