

综述

植物基因工程的新载体——农杆菌Ri质粒

张 毅 沈文辉*
(北京农业大学生物学院, 北京)

产生于70年代中期的植物基因工程, 近年有了很大进展^[1,2]。其重要原因之一是近几年在植物基因工程的克隆载体, 特别是在根癌农杆菌(*A.tumefaciens*)Ti质粒的研究方面取得了进展^[3]。近两年来, 国外对带有Ri质粒的毛根转化系统的研究大量增加, 本文介绍了Ri质粒及以Ri质粒为载体的毛根转化系统的研究概况。

(一) 发根农杆菌及其Ri质粒

根癌农杆菌和发根农杆菌(*A.rhizogenes*)是同属于根瘤菌科(Rhizobiacease)的革兰氏阴性

菌。前者含有能诱发冠瘿瘤(crown gall)的Ti质粒, 后者含有能诱发毛根(hairy root)的Ri质粒。两种质粒的类型及其所诱导产生的冠瘿碱(opi-ne)种类列于表1中。发根农杆菌的致根特性与其所带的Ri质粒类型有关。有人对不同类型的发根农杆菌的致根性进行过比较^[5,7], 发现带有农杆菌碱型Ri质粒的农杆菌比带有甘露碱型或黄瓜碱型Ri质粒的农杆菌有更广的寄主范围。即使对同一种农杆菌来说, 致根特性又与被接种的寄主植物有关, 而且还受接种部位的影响。

表1 Ti及Ri质粒的类型及其所产生的冠瘿碱种类^[4-6]

pTi		pRi	
质粒类型	冠瘿碱	质粒类型	冠瘿碱
章鱼碱型 Octopine-type	章鱼碱 (Octopine)	甘露碱型 Mannopine-type	甘露碱 (Mannopine)
	章鱼肉酸 (Octopine acid)		甘露碱酸 (Mannopinic acid)
	来苏平碱 (Lysopine)		农杆菌碱 (Agropinic acid)
	组氨碱 (Histopine)		农杆菌碱素C (Agrocinopine C)
胭脂碱型 Nopaline type	胭脂碱 (Nopaline)	黄瓜碱型 Cucumopine-type	黄瓜碱 (Cucumopine)
	胭脂碱酸 (Nopaline acid)		
	鸟氨酸 (Ornaline)	农杆菌型 Agropine-type	农杆菌 (Agropine)
农杆菌型 Agropine-type	农杆菌碱 (Agropine)		农杆菌碱酸 (Agropinic acid)
	农杆菌碱酸 (Agropinic acid)		甘露碱 (Mannopine)
	甘露碱 (Mannopine)		甘露碱酸 (Mannopinic acid)
	甘露碱酸 (Mannopinic acid)		农杆菌碱素A (Agrocinopine A)

* 表中所列冠瘿碱的中译名, 除Octopine和Nopaline已有统一的译名外, 其余均未见统一的中文译名。表中的译名仅供参考。

与Ti质粒类似, Ri质粒也具有T-DNA及Vir区, 此外, 还有分解冠瘿碱的功能区等。甘露碱及黄瓜碱型Ri质粒的T-DNA是连续的, 因此, 这两种类型的Ri质粒只含有一个T-DNA区^[8,9], 其上有冠瘿碱合成基因。农杆菌型Ri质粒有两个T-DNA区, 分别称为TL-DNA及TR-DNA^[10,11]。TL-DNA的大小在10-20kb

之间^[12], 其上带有甘露碱型及黄瓜碱型Ri质粒T-DNA的同源片段^[9,13], 但它们的表达产

本文于1988年8月12日收到。
本文承蒙中国科学院微生物研究所方荣祥先生审阅, 在此表示感谢。
* 现在工作单位: Center National De La Recherche Scientifique Physiologie Cellulaire Vegetale Paris

物并不合成冠瘿碱。四个与根的形态发生有关的位点rolABCD也位于 T_L 片段。 T_R -DNA上带有编码生长素(auxin)及农杆菌合成酶的基因。三种Ri质粒的T-DNA酶切图谱示于图1。

Slightom等^[16]对pRiA₄ T_L -DNA进行了序列分析,从该序列中找出了18个ORF,据推测位于 T_L -DNA右侧的ORF9—18决定着转化植物的表型,如转化植物的皱叶现象等。White

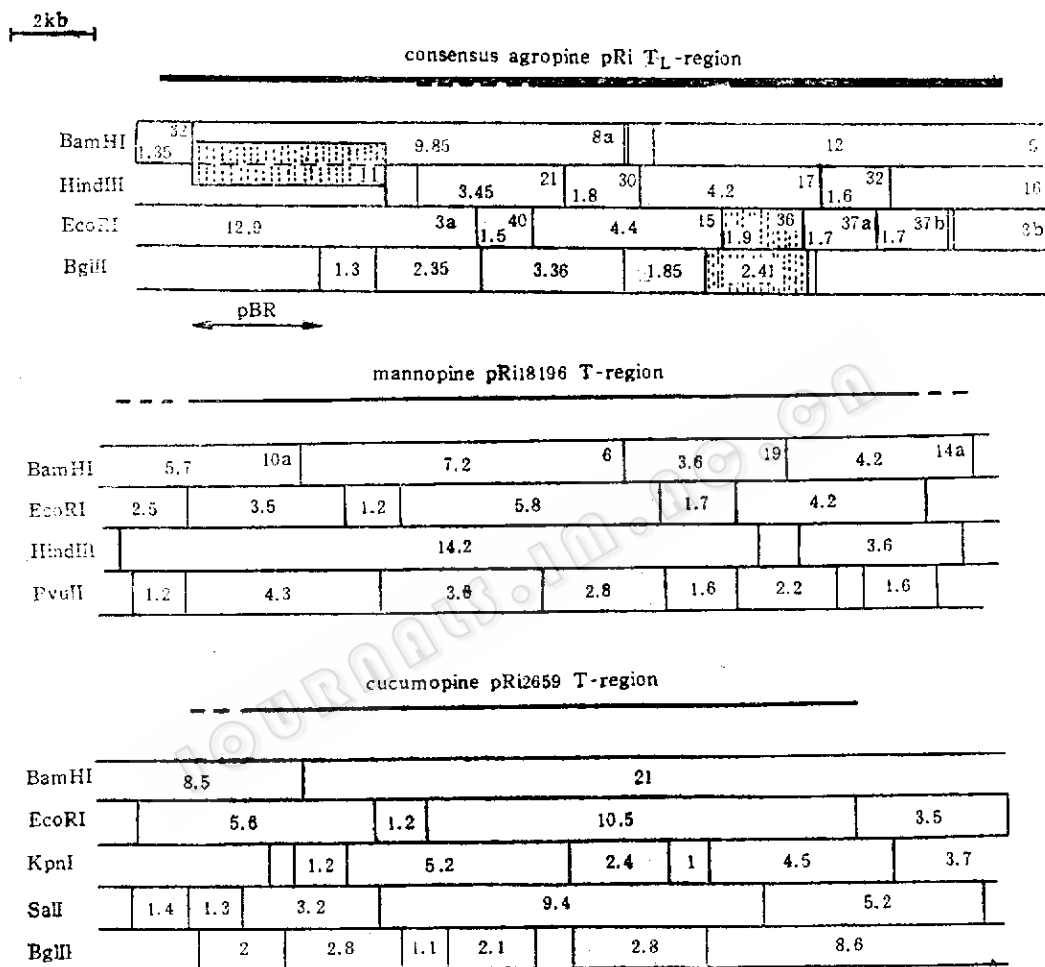


图1 三种类型Ri质粒的T-DNA限制性酶切图

农杆菌型Ri质粒只示出 T_L 区。片段数目及大小(kb)均示于图上。农杆菌型pRi T_L 区的数据引自文献(10—11, 14), 甘露碱型pRi18196T区数据引自文献(15), 黄瓜碱型pRi2659 T区数据引自文献(9)。图上方的黑线表示通常情况下的T-DNA长度;虚线表示不太确切的边界。对农杆菌型 T_L -区,较长的片段是多数植物中的情况,线下的虚线表示在烟草中时的左边界。农杆菌型 T_L -区的阴影部分表示中间载体发生同源重组的区域,箭头(pBR)表示AR1193系被pBR322取代的部位及大小。

等^[17]用转座子插入诱变方法, Boulanger等^[18]用缺失诱变方法分别对 T_L -DNA的功能区进行了分析。结果表明, T_L -DNA的各功能区对于不同植物有不同的作用效果。

对 T_R -DNA的功能区,也有人进行了插入和缺失诱变分析^[17,19]。在和Ti质粒tms-1和tms-

2同源的Ri质粒 T_R -DNA区域进行插入,除对*K. daigremontiana*的茎以外,对于其他已试验植物,此类插入都使Ri质粒丧失毒力,而不能诱发毛根的产生。当缺失部分是与tms同源的 T_R -DNA区域时,缺失后的Ri质粒对所有试验植物,包括*K. daigremontiana*都丧失毒力^[17]。

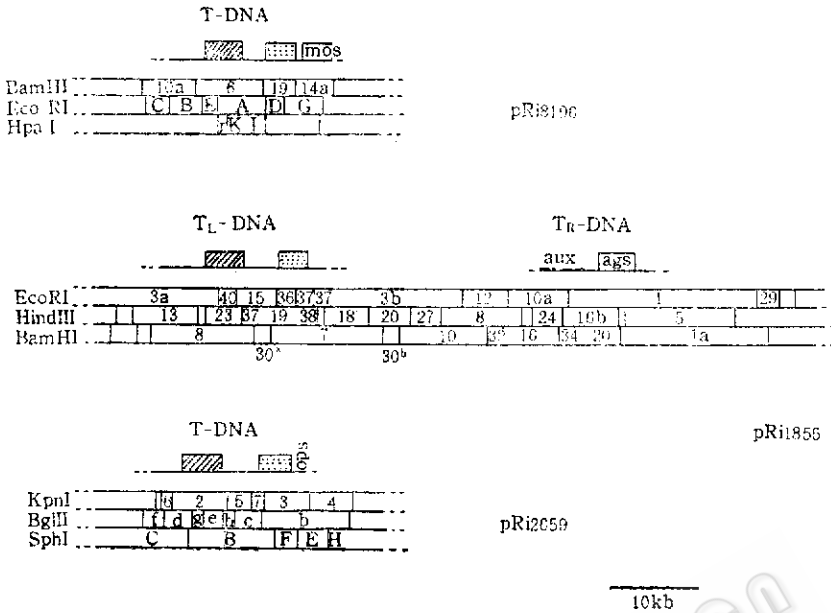


图 2 三种类型Ri质粒T-DNA限制酶酶切图 [13]

两个保守区 (T-DND 下方带阴影方框)。mos、ags及ops分别代表编码甘露碱、农杆菌碱及黄瓜碱合成的基因位置

(二) 发根农杆菌转化植物的产物——毛根

1. 毛根的特性：由发根农杆菌感染植物所产生的毛根具有生长迅速、多分枝、多根毛及没有向地性等特性 [20]，由于甘露碱及黄瓜碱型Ri质粒的T-DNA上带有编码冠瘿碱合成的基因 [21]，故由带有这两类Ri质粒的发根农杆菌诱发的毛根一般都含有冠瘿碱。通过对毛根进行体外培养，很易获得再生植株。由毛根再生的植株常表现出短节间、较弱顶端优势及皱叶等特征 [22-24]，但也有的再生植株具有完全正常的表型 [6, 7]。

对毛根再生植株有性后代 T-DNA 插入进行遗传分析表明，分离类型只与母本植物的一个克隆组成一致。尽管这类深入分析工作只有几例 [20, 25, 26]，但目前的结果几乎都证明：一条毛根起源于一个细胞。毛根的这一克隆性质及其特异表型，为转化体的筛选提供了方便。

2. 毛根转化体中的 T-DNA：已有实验表明，在转化植物中，Ri质粒的 T-DNA 插入到了植物细胞的核基因组上，而 T-DNA 的插入长度与发根农杆菌的类型有关。农杆菌碱型Ri质粒 T_L-DNA 或黄瓜碱型Ri质粒的 T-DNA 插入长度相当稳定 [27]，而农杆菌碱型Ri质粒 T_R-DNA 或甘露碱型Ri质粒的 T-DNA 插入长度则很不稳定 [15, 25, 27]。有趣的是，农杆菌碱型Ri质粒的

图 3 中间载体pAMNeo10的结构及酶切位点 [39]
pAMNeo10上的pRi同源片段来自pRiA₄ T_L-DNA Hind III 11片段

B: BamHI, E: EcoRI, H: HindIII,
K: KpnI, P: PstI, S: SalI

但Vilaine等 [19]却在整个T_R-DNA缺失的情况下，在烟草上诱发出了毛根，并再生出了具有转化特性的完整植株。

Filetici等 [30]对三种类型的Ri质粒的T-DNA进行了比较，结果发现，三类Ri质粒的T-DNA之间有两个同源性强度的区域(图2)，其长度分别为 4×10^3 和 3×10^3 kb。这个在Ti质粒中不存在的高度保守序列，可能编码所有发根农杆菌T-DNA共有的生根功能。

T_L-DNA 在烟草再生植株中总是比在其他植物中短^[12,21,28]。也就是说,在转化烟草中 T_L-DNA 在某些区域会发生缺失。这可能是因为烟草中,位于 T-DNA 缺失部位的一些基因与烟草再生或其他细胞过程不相容,从而使得这些 T_L-DNA 基因发生缺失。不仅 T-DNA 的插入长度,而且插入数目也与发根农杆菌的类型有关,许多菌株含有不止一个插入。毛根转化体上的多个 T-DNA 插入的位置大多数是相互独立的,这可从它们在再生植株后代中发生分离的现象中得到证明^[23-25]。但在某些情况下,也发现 T-DNA 插入连在一起的情况^[12]。毛根转化体中出现多个 T-DNA 插入有两种产生方式。一种是,两个或两个以上的发根农杆菌同时侵染一个植物细胞,并且它们的 T-DNA 都整合到植物细胞的核基因组中。另一种是,来自于同一细菌的几个 T-DNA 片段都整合到一个植物细胞的核基因组中。实验表明,后一种方式是产生多插入的主要原因^[29]。

自 Wilmitzer 等^[30]首次报道 Ri 质粒 T-DNA 在植物中转录出 poly A-RNA 以后,近来有不少用杂交试验进行 Ri 质粒 T-DNA 表达研究的报道^[28,31-32]。有关 T_R-DNA 在植物中转录的研究较少, Taylor 等^[21]在 *N. glauca* 上检测出 6 个 T_R-DNA 的转录产物,其中 2 个是由与 Ti 质粒的生长素合成基因及致瘤基因同源的区域转录的。但 Durand 等^[28]却没有检测到 pRiA₄ T_R-DNA 的转录产物。T_L-DNA 在植物中的转录已有三家报道即 Taylor 等^[31]建立了 pRiA₄ T_L-DNA 在 *N. glauca* 上的转录图谱; Durand 等^[28]研究了 pRiA₄ T_L-DNA 在转化烟草植株中的转录情况; Ooms 等^[32]在转化的马铃薯根及芽中分析了 pRi1855 T_L-DNA 的转录。从这三家的工作中可以发现‘T_L-DNA 转录表达具有很大的变异性。Durand 等观察到了 T_L-DNA 具有器官专一性的转录; Ooms 也观察到了在根和芽上 T_L-DNA 有不同的表达模式。这与 Ti 质粒在各器官转录的一致性完全不同。

如果把 T_L-DNA 在植物体内的转录产物与 Slightom 等^[16]找出的 ORF 区域对应起来进行分析,可以发现相应于 ORF 10, 11, 12 的转录产物的大小有时比编码它们的 DNA 要大得多,

这可能是由于转录发生通读 (readthrough) 造成的。

3. Ri 质粒 T-DNA 与未转化植物基因组的同源性: White 等^[33]在未转化的田旋花 (*C. arvensis*) 上发现了 pRiA₄ T_L-DNA 的同源序列。将植物核基因组上的同源序列克隆后进行分析表明,它和 rolB、rolC 及 rolD 同源,其上也有 ORF 结构,但植物体中的 rolB、rolC 同源区比 Ri 质粒上的 rolB、rolC 要小些。这种未转化植物体中的同源序列,很可能是进化过程中植物从上次发根农杆菌感染中获得了细菌基因,也有可能是农杆菌在侵染中获得了一部分植物基因后产生的。

(三) Ri 质粒介导的 DNA 转移方法

纵观目前植物基因工程实验中所使用的质粒载体,可将其大致划分为两类。一类是利用在农杆菌中不复制,但却能通过 T-区内发生一次重组而与 Ti 或 Ri 质粒进行共整合的中间载体 (intermediate vector)。另一类是将 Vir 区与 T-区分离于两个独立复制子上的二元载体。此外,利用 Ri 质粒的 Vir 区存在着 Ti 质粒的同源序列这一特性,可以将 Ri 质粒与 Ti 质粒联合使用^[34-35]。

1. 中间整合载体: 利用 Ti 质粒作为植物遗传转化的载体,必须去掉 T-DNA 上的 Onc 基因。因为 Onc 基因的表达影响了完整植株的再生。相反, Ri 质粒的 T-DNA 则不影响植株的再生。所以,野生型发根农杆菌能够直接用作中间载体的受体。此类中间载体的质粒上仅需带有一个能与野生型 Ri 质粒的 T-DNA 进行同源重组的区域,即可通过重组得到共整合。农杆菌型 Ri 质粒上能作为中间载体进行共整合的同源片段示于图 1。

Comai 等^[36]通过将 Hind III 17 片段上的 Bgl I 片段或 EcoR I 36 片段克隆进 pACYC184, 从而将沙门氏杆菌的 aroA 基因引入了 pRiA₄ T_L-DNA。通过对发根农杆菌进行遗传操纵,得到了耐草甘膦 (glyphosate) 的烟草植株。Stougaard 等^[37]利用含有 EcoR I 36 或 40 片段的中间载体,将嵌合大豆血红蛋白基因引入了农杆菌型发根农杆菌 pRi15834。在这种农杆菌诱发的毛根再生的牛角花 (*Lotus corniculatus*) 植株中,该

基因得到了表达。Stougaard等^[37]还构建了一个称为 Ar 1193 的发根农杆菌株系。该菌株带有一个由pBR322 序列取代与BamH I 8a片段的左端相对应的 BamH I-Bgl I 序列的 pRi15834派生质粒。与去掉Onc基因的pTi派生质粒 pGV 3850^[38]类似, 这种质粒可作为任何由pBR派生的中间载体的受体。Ar1193 虽然能有效地转化牛角花, 也许还能转化其他多种植物, 但它不一定能用于烟草的转化。因为如前所述, 在转化烟草中观察到的 T-DNA 总是不包含有这一片段

(图1)。Morgan等^[39]构建的中间载体pAM-Neo10 (图3) 情况也如此, 其上有允许 pRiA₄ T_L-DNA插入的同源区。利用pRiA₄与pAMNeo10进行同源重组, Morgan等将带有重组质粒的细菌接种到番茄上, 成功地获得了抗卡那霉素的转化番茄根, 并由根再生了完整植株。

Robaglia等^[40]构建了一系列中间载体(同时也是表达载体)。这些载体是 pBR322 的派生物, 带有pRiA₄的Hind. III 32片段或 EcoR I 36片段, 能在农杆菌型Ri质粒T_L-DNA区进行整合, 位于5'及3'序列之间的一个克隆位点使得克隆编码序列得以在转化植物细胞中表达。利用构建的四个带有新霉素磷酸转移酶 I (neomycin phosphotransferase I) 的中间表达载体中的任一个, 通过与Ri质粒T_L-DNA的同源重组而获得的重组体细菌对烟草进行转化, 得到了抗卡那霉素的再生根及植株。

2. 二元载体法: Hooykaas等^[35]证明, pRi1855的Vir功能对根癌农杆菌的非毒性突变体有补偿作用。与Ti质粒类似, 只要给带有 T-DNA的细菌提供独立复制子, Ri质粒的Vir基因就能起作用, 它能诱导 pRi T-DNA^[19]及 pTi T-DNA^[34]发生转移。

(1) 由 pRi 提供 Vir 功能的二元载体, Simpson等^[41]构建了两个带有RK2复制及转移起始点的去掉了Onc基因的质粒, 该质粒在胭脂碱pTi T37 的 T-DNA两边界之间有胭脂碱合成基因 (pARC4) 或嵌合卡那霉素抗性基因 (pARC8)。外植体在受到含有野生型pRiA₄及这些载体之一的农杆菌侵染之后, 常发生双转化。所诱发的烟草、大豆、苜蓿及番茄根中具有去掉了Onc基因的 T-DNA。用相同的转化系统也得

到了番茄^[42]、黄瓜^[43]及苜蓿^[44]的转化植株。Hamil等^[45]用相同方法得到了带有去掉Onc基因的 T-DNA 的黄花烟草、菜豆、甜菜、油菜、曼陀罗及金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的转化根。

利用 Deblaere 等构建的另一个广宿主 T-DNA载体——带有pGV941的 pRi15834, Stougaard等^[37]获得了转化牛角花根。这些转化根中有60%从去掉了Onc基因的 pTi T-DNA上获得了抗卡那霉素的特性。

Petit等^[6]通过接合法将野生型Ri质粒引入了具有pGV3850的根癌农杆菌C58C1^[38], 将这种农杆菌接种到牛角花及胡萝卜上, 所诱导的毛根有60—90%含有pGV3850上的胭脂碱合成酶基因。Van slugs等用类似方法向拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 转入了玉米可移动因子——激活子 (activator)。

(2) 由 pRi 提供 T-DNA 的二元载体, Vilaine等^[19]将 pRiA₄ T_L-DNA 克隆到广宿主装配型质粒 (cosmid) pLAFR1上, 将其引入农杆菌中并由 pAL4404 (去掉T-DNA的Ti质粒) 或 pRiB278b (去掉T-DNA的Ri质粒) 提供Vir功能。他们用这种农杆菌感染烟草及番茄后得到了转化根。Brevet等将 pRi2659 (图1) 的整个 T-区克隆到广宿主质粒 pRK404 中, 并由 pAL4404 或 pGV3850提供Vir功能获得了转化毛根。

Vilaine等^[46]还构建了一个去掉了Onc基因的微型Ri质粒, 该质粒带有 colE1 及 pArA₄ 的复制起点, 细菌选择标记、T-区边界序列及植物选择标记。通过将 pRiA₄ 上的 4.3kb EcoR I 15 片段或 1.9kb EcoR I-Nur I 片段引入这一微型Ri质粒, 他们得到了烟草转化毛根, 并在毛根中检测到了这两个片段的表达产物。含有 EcoR I 15 片段的再生烟草植株表现出毛根再生物的全部特征。

Robaglia等^[40]构建了一个微型Ri表达载体 pMRKE。这个13.7kb的微型Ri质粒载体, 在花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的35S 启动子及胭脂碱合成酶基因转录终止信号之间有一个特异 BamH I 位点。

(3) 利用Ri质粒复制起点的二元载体: Ri质粒的复制起点可用作二元载体系统的转化载

体。这类二元载体的Vir功能由去掉Onc基因的Ti质粒提供。Jouanin等^[47]克隆了农杆菌型Ri质粒pArA_{4a}及pRiHR I的复制起点区,并经实验表明,即使在没有选择压力的情况下也能在根瘤农杆菌中以低于1%的分离频率复制。最近,Nishiguchi等^[48]对自主复制所必需的pRiA_{4b}的4.6kb复制子进行了序列分析。在序列上鉴定出三个大开式阅读框架(large open reading frames),它们可能对pRiA_{4b}的复制起作用。

Simoens等^[49]利用pRiHR I的复制起点,构建了一个带有胭脂碱型pTi B6S3质粒边界序列的装配型质粒载体pC22。该质粒是为了向植物细胞引入基因文库(genomic libraries)而设计的。为了研究烟草减数分裂的稳定性,Muller等^[50]利用这一载体向烟草引入了卡那

霉素抗性基因。

Ri质粒是在发根农杆菌中发现的一个大质粒,它决定了发根农杆菌的致根特性。Ri质粒和Ti质粒在结构与功能上具有一定的同源性,其T-DNA也可整合到寄主植物的染色体上,T-DNA在植物体内的转录产物可以用常规方法检测。

与Ti质粒基因载体一样,Ri质粒基因载体也日趋成熟。最近,Robaglia等^[40]构建了一个带有花椰菜花叶病毒35S启动子的微型Ri表达载体,它的应用大大地提高了转化效率,随着Ri质粒载体系统的日趋完善,它完全可能成为可与Ti质粒载体系统媲美甚至更好的植物基因转移系统。Ti,Ri两个质粒载体系统相互补充,必将推动植物基因工程的发展。

参 考 文 献

- [1] 唐 惕:植物生理学通讯,(4):11—13,1984.
- [2] 刘 涤:生物科学动态,(4):1—8,1987.
- [3] Klee H. et al.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38:467—486, 1987.
- [4] 吴乃虎等:生物工程进展,4:1—9,1987.
- [5] Petit, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 190:204—214, 1983.
- [6] Petit, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 202:388—393, 1986.
- [7] David, C. et al.: *Plant Cell Rep.*, 7:88—91, 1988.
- [8] Chilton, M.D. et al.: *Nature*, 295:432—434, 1982.
- [9] Combard, A. et al.: *Plasmid*, 17:137—148, 1987.
- [10] Huffman, G.A. et al.: *J. Bacteriol.*, 157:269—276, 1984.
- [11] Jouanin, L.: *Plasmid*, 12:91—102, 1984.
- [12] Jouanin, L. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 206:387—392, 1987.
- [13] Flétiçci, P. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 9:19—26, 1987.
- [14] Jouanin, L. et al.: *Plasmid*, 16:124—134, 1986.
- [15] Byrne, M. C. et al.: *J. Mol. Appl. Genet.*, 2:201—209, 1983.
- [16] Slightom, J.L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 261:108—121, 1986.
- [17] White, F.F. et al.: *J. Bacteriol.*, 164:33—44, 1985.
- [18] Boulanger, F. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 6:271—279, 1986.
- [19] Vilaine, F. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 206:17—23, 1987.
- [20] David, C. et al.: *Bio/technology*, 2:73—76, 1984.
- [21] Lahners, K. et al.: *Plasmid*, 11:130—140, 1984.
- [22] Ooms, G. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 71:325—329, 1985.
- [23] Taylor, B.H. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 201:554—557, 1985.
- [24] Guerche, P. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 206:382—386, 1987.
- [25] David, C. et al.: *Plant Cell Rep.*, 7:92—95, 1988.
- [26] McKnight, T.D. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 8:439—445, 1987.
- [27] Biró, A.M. et al.: *Plant Physiol. Biochem.*, 25:323—335, 1987.
- [28] Durand-Tardif, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 186:557—564, 1985.
- [29] Depicker, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 201:477—484, 1985.
- [30] Willmitzer, L. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 186:16—22, 1982.
- [31] Taylor, B.H. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 201:546—553, 1985.
- [32] Ooms, G. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 6:321—330, 1986.

(下转184页)

- [33] White, F.F. et al.: *Nature*, 301:348—350, 1983.
- [34] Hoekema, A. et al.: *J.Bacteriol.*, 158:383—385, 1984.
- [35] Hooykaas, P.J.J. et al.: *Plasmid*, 11:195—205, 1984.
- [36] Comai, L. et al.: *Nature*, 317:741—744, 1985.
- [37] Stougaard, J.J. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 207:251—255, 1987.
- [38] Zambryski, P. et al.: *EMBO J.*, 2:2143—2150, 1983.
- [39] Morgan, A.J. et al.: *Plant Sci.*, 49:37—49, 1987.
- [40] Robaglia, C. et al.: *Biochimie.*, 69:231—237, 1987.
- [41] Simpson, R.B. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 6:403—415, 1986.
- [42] Shahin, E.A. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 72:770—777, 1986.
- [43] Trulson, A. J. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 73:11—15, 1986.
- [44] Sukhapinda, K. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 8:209—216, 1987.
- [45] Hamill, J. D. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 9:573—584, 1987.
- [46] Vilaine, F. et al.: *Gene*, 55:105—114, 1987.
- [47] Jouanin, L. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 201:370—374, 1985.
- [48] Nishiguchi, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 206:1—8, 1987.
- [49] Simoens, C. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 14:8073—8090, 1986.
- [50] Muller, A.J. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 207:171—175, 1987.