

TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS MEDIADA POR *Agrobacterium*: “INGENIERÍA GENÉTICA NATURAL APLICADA”

Ana Milena Valderrama Fonseca¹; Rafael Arango Isaza²
y Lucia Afanador Kafuri³

RESUMEN

Agrobacterium tumefaciens tiene la capacidad de transferir ADN entre reinos diferentes. El impacto de este hallazgo ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología. En este artículo se describen los procesos por los cuales **Agrobacterium** realiza la transferencia de ADN a la planta, puntualizando en 7 eventos fundamentales para la interacción **A. tumefaciens**-planta y esta dirigido a profesionales de las áreas biológicas que estén interesados en actualizarse en el tema. El conocimiento básico sobre el mecanismo de transferencia del ADN ha permitido el desarrollo de vectores para la introducción de genes foráneos, dentro de los cuales se describen los 2 tipos de vectores utilizados en la actualidad: co-integrados y binarios. Así mismo se detallan algunos factores importantes que median la transformación y algunas de las principales aplicaciones de la transformación de plantas y hongos mediada por **Agrobacterium**.

Palabras clave: Transformación genética, **Agrobacterium tumefaciens**, ingeniería genética, biotecnología vegetal.

¹ Investigadora. Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB. Medellín, Colombia. <avalderrama@cib.org.co>

² Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. A. A. 3840. Medellín, Colombia. <rafaelarango@epm.net.co>

³ Profesora Asociada. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A. A. 3840. Medellín, Colombia. <lafanado@unalmed.edu.co>

ABSTRACT

PLANT TRANSFORMATION MEDIATED BY *Agrobacterium*: “APPLIED NATURAL GENETIC ENGINEERING”

Agrobacterium tumefaciens has the ability to transfer DNA between different kingdoms. This finding has had a great impact in several fields of plant biology, agriculture and biotechnology. This review describes the mechanisms by which **Agrobacterium** transfer DNA to the plant, emphasizing

7 fundamental steps in the **A. tumefaciens**-plant interaction, to provide an opportunity for professionals in the biological sciences to familiarize themselves with the topic. Basic knowledge about the DNA transfer mechanism has allowed the development of various vectors for the introduction of foreign genes, among which two classes that are currently used are described: co-integrative and binary vectors. Furthermore, detail some important factors that mediate transformation and some of the principal applications of the transformation of plants and fungi by means of **Agrobacterium**.

Key Words: Genetic transformation, **Agrobacterium tumefaciens**, genetic engineering, plant biotechnology.

INTRODUCCIÓN

Chilton *et al.* (1977) demostraron la presencia de un pequeño fragmento de ADN de la bacteria *A. tumefaciens* cuando aislaron tumores axénicos de la agalla de la corona en tabaco. Con estos experimentos se demostró la capacidad de esta bacteria de transferir ADN entre reinos diferentes. El impacto de este hallazgo ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología.

Agrobacterium tumefaciens y sus especies relacionadas como *A. rhizogenes* y *A. vitis* son patógenos reconocidos de plantas y tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero (Tzfira y Citovsky, 2000). Desde el año 1970 hasta nuestros días se ha venido estudiando en detalle el

mecanismo por el cual *A. tumefaciens* induce la formación de tumores en plantas y el conocimiento adquirido ha sido fundamental para su uso como herramienta en la ingeniería genética de plantas. Así mismo, esta interacción ha dado pie a formular modelos de señalización celular, transporte célula a célula, importe nuclear de proteínas y ADN y mecanismos de integración genómica (Tzfira y Citovsky, 2000).

Durante el proceso de infección *A. tumefaciens* introduce en la célula vegetal una parte de su ADN (ADN de transferencia) el cual es integrado dentro del genoma de la planta. Los genes del ADN-T son expresados en su hospedero e inducen la formación de tumores y la síntesis de unos derivados de aminoácidos llamados opinas los cuales son aprovechados por la bacteria. El ADN-T está localizado en el plásmido Ti (Plásmido inductor de tumor), que ade-

más contiene los genes *vir* que son necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta. La especie *A. rhizogenes* produce el crecimiento vigoroso de las raíces infectadas mediante un mecanismo semejante al de *A. tumefaciens*. En este caso el plásmido que contiene el ADN-T es llamado Ri (plásmido inductor de raíces).

Un hallazgo crucial que permitió el diseño de vectores para la transformación genética de plantas mediante el uso de especies de *Agrobacterium* es el hecho que sólo las secuencias borde del ADN-T son requeridas para que la transferencia se lleve a cabo (Garfinkel et al., 1981; Zambryski et al., 1983). Algunos o todos los genes bacterianos del ADN-T pueden ser removidos originando vectores desarmados, los cuales pueden transformar células vegetales sin los síntomas generales de la infección bacteriana.

La inserción de nuevos genes y sus elementos reguladores en el ADN-T ha permitido la transformación genética de plantas susceptibles con genes de importancia agronómica. Esto a su vez ha servido para el estudio de la función y expresión de genes, y para el desarrollo de plantas con nuevas características (Gelvin, 2003). El principio de transferencia de ADN con *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* ha sido útil para la transformación de especies de plantas dicotiledóneas; sin embargo, ciertas condiciones experimentales deben ser establecidas para que el sistema de transformación funcione bien en nuevas especies vegetales. Las monocotiledóneas no son generalmente susceptibles a *A. tumefaciens*; aunque se ha logrado la transferencia de genes a especies monocotiledóneas de

importancia económica como el arroz (Cheng et al., 1998), el banano (May et al., 1995), el maíz (Ishida et al., 1996), el trigo (Cheng et al., 1997) y la caña de azúcar (Arencibia et al., 1998) entre otros.

En este artículo se describen los procesos por los cuales *Agrobacterium* realiza la transferencia de ADN a plantas, el desarrollo de vectores desarmados útiles para la transformación de plantas y las condiciones experimentales que afectan su integración. Así mismo, se dará una descripción de las principales utilidades y aplicaciones del uso de la transformación genética de plantas mediante *Agrobacterium*.

Mecanismo de transferencia de ADN-T mediado por *Agrobacterium*.

El mecanismo de transferencia del ADN-T a la célula vegetal está determinado por la interacción molecular entre la bacteria y la planta, especialmente por el intercambio de señales de tipo proteico. Aunque el proceso de transferencia del ADN-T de *A. tumefaciens* ha sido ampliamente estudiado, aún no han sido descifrados completamente los mecanismos moleculares por los cuales éste es transferido a la planta. Se han obtenido mutantes de *Arabidopsis thaliana* que son resistentes a la transformación con *Agrobacterium* (mutantes *rat*) con los cuales se espera entender el papel de los genes y proteínas de la planta que median el proceso de transformación (Zhu et al., 2003). Tzfira y Citovsky (2000) describen siete eventos fundamentales para la interacción *A. tumefaciens*-planta: (i) reconocimiento y adherencia; (ii) identificación de señales de la planta; (iii) activación de genes *vir*; (iv) generación del ADN-T; (v) exportación del ADN-T hacia la planta; (vi) importación del ADN-T dentro del núcleo de la

planta; (vii) integración del ADN-T dentro del genoma del hospedero.

Reconocimiento y adherencia. El aislamiento de mutantes de *A. tumefaciens* incapaces de adherirse a células vegetales ha permitido identificar algunos genes cromosomales necesarios para esta interacción como lo son *chvA*, *chvB*, *pscA* y *att*. De otro lado, las moléculas de la planta reconocidas por *Agrobacterium* han sido poco caracterizadas pero se cree que pueden actuar moléculas parecidas a la vitronectina de células animales (Wagner y Matthysee, 1992). La producción de especies de *A. thaliana* mutantes para la unión con *A. tumefaciens* podrá ayudar a identificar proteínas y carbohidratos que estén involucrados en esta unión (Naam *et al.*, 1999).

Identificación de señales producidas por la planta. Se han identificado dos sensores proteicos, VirA y VirG, que reaccionan específicamente con la presencia de exudados de plantas heridas y que además promueven la activación transcripcional de los genes *vir* (Winans *et al.*, 1994). La proteína de membrana VirA interactúa de forma directa o indirecta con compuestos fenólicos producidos por las plantas como lignina, precursores de flavonoides y acetosiringona (Stachel *et al.*, 1985). La proteína citoplasmática VirG es fosforilada por VirA y permite la transducción de señales que activan los genes *vir* (Jin *et al.*, 1990a). Compuestos como la glucosa y galactosa también inducen los genes *vir* por la unión a receptores codificados cromosomalmente como ChvE que interactúa con VirA y transmite la señal (Shimoda *et al.*, 1993).

La proteína sensora ChvG hace parte del complejo cromosomal ChvG/ChvI que es importante para la virulencia de *A. tumefaciens*. Se ha demostrado que ChvG interviene en la regulación de genes inducibles en presencia de pH ácidos como *aopB*, *katA*, *virB* y *virE*. Ya que ChvG regula genes inducibles a cierto pH se presume que ChvG es un sensor que puede detectar directa o indirectamente la acidez extracelular (Li *et al.*, 2002).

Activación de genes *vir*. Los genes *vir* constituyen un operón con 8 genes principales (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*) regulados por una secuencia promotora que contiene 12 pares de bases conservadas a la que se une específicamente la proteína VirG fosforilada. La fosforilación de la proteína VirG es requerida para la activación de los genes *vir* (Jin *et al.*, 1990b).

Generación del ADN-T. La producción del ADN-T se da por la acción de las proteínas VirD2 y VirD1, que actúan como endonucleasas, uniéndose al plásmido Ti en los bordes del ADN-T relajándolo y haciendo cortes en la cadena del ADN-T sin sentido (Filichkin y Gelvin, 1993; Scheiffle; Pansegrau y Lanka, 1995; Wang *et al.*, 1987). Después de hacer el corte, la proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' del ADN-T hasta su transferencia a la planta (Howard *et al.*, 1989). El ADN-T es cubierto por proteínas de unión al ADN de cadena sencilla (SSB) que permiten su transporte. Las proteínas VirE2 también se unen al ADN-T y posiblemente cubren la cadena formando junto con VirD2 un complejo de transferencia (Howard y Citovsky, 1990; Zupan y Zambryski, 1997). Estudios más recientes sugieren que el complejo pro-

teínas Vir:ADN-T se forma dentro del citoplasma de la célula hospedera; donde el ADN-T viaja al citoplasma vegetal asociado con VirD2 de forma independiente y la proteína chaperona VirE1 exporta al citoplasma la proteína VirE2. Una vez ha llegado al citoplasma de la célula hospedera el complejo VirE1- VirE2 se disocia y se forma otro complejo entre VirE2 y el ADN-T (Deng et al., 1999; Sundberg y Ream, 1999; Zhou y Christie, 1999).

Exportación del ADN-T. *Agrobacterium*

utiliza un mecanismo similar a la conjugación para la transferencia de su ADN-T oncogénico. Esta transferencia es mediada por el sistema de secreción tipo IV (T4SS). Este transportador es crítico para los procesos de patogénesis ya que exporta factores de virulencia importantes a través de la membrana de la bacteria (Burns, 2003; Yeo y Waskman 2004). El sistema tipo IV exporta diferentes tipos de proteínas entre las cuales se pueden definir tres componentes: el operón *VirB/VirD4* que es requerido para la transferencia del ADN a la planta hospedera, el sistema Trb que codifica para la transferencia por conjugación del plásmido Ti entre células de *Agrobacterium*, y el sistema AvhB que media la transferencia del T-ADN en ausencia de las proteínas VirB y el sistema Trb (Chen et al., 2002).

El T4SS de *Agrobacterium tumefaciens* está compuesto por 11 proteínas codificadas por el operon *VirB* y al menos una proteína del operon *VirD* (*VirD4*). Esta última proteína actúa como acoplante entre T4SS y el T-DNA/*VirD2* (Cascales y Christie, 2004). *VirB1* permite disolver la membrana de peptidoglicano de la pared bacteriana y puede participar en el contacto célula a

célula (Baron et al., 1997; Christie, 1997); *VirB3* y *VirB4* promueven el ensamblaje del pili de virulencia (Zupan; Ward y Zambryski, 1998); *VirB6* media la formación de los complejos *VirB7* y *VirB9* requeridos para la biogénesis del pili T y del canal de secreción (Jakubowski; Krishnamoorthy y Christie, 2003); *VirB10* se ubica transmembranalmente y su función es desconocida, y finalmente *VirD4* es requerida para la formación del pili de virulencia (Fullner; Lara y Nester, 1996).

El mecanismo de translocación de las proteínas *VirB/D4* no es conocido en detalle, pero se sabe que tienen una señal de translocación en el extremo c-terminal cuya característica principal es poseer una carga neta positiva con una secuencia consenso R-X(7)-R-X-R-X-R-X-X(n) (Vergunst et al., 2005).

Importación nuclear del complejo – T.

La importación al núcleo del complejo *VirD2-complejoT* se da en conjunto con el transporte de las proteínas *VirE2*, *VirF* y *VirE3* (Schrammeijer et al., 2003). Las proteínas *VirD2* y *VirE2* son las que median directamente el proceso de importe nuclear del complejo-T (Citovsky; Warnick y Zambryski, 1994; Herrera-Estrella; Van Montagu y Wang, 1990; Tinland et al., 1992). En la célula vegetal, *VirD2* y *VirE2* pueden interactuar con proteínas chaperonas que permiten el importe nuclear del complejo-T y su integración. Las proteínas chaperonas *RocA*, *Roc4* y *CypA* al parecer mantienen la conformación de *VirD2* durante el importe nuclear del complejo-T y su integración (Deng et al., 1998). El importe nuclear del complejo T es asistido por proteínas celulares del hospedero como *VIP1* que

interactúa específicamente con VirE2. Elevados niveles de VIP1 en el hospedero lo hacen más susceptible a la transformación con *Agrobacterium* (Tzfira; Vaidya y Citovsky, 2002). También se ha encontrado que VirE3 puede simular la función de VIP1, actuando como un adaptador entre VirE2 y la Karioferina a celular asistiendo el importe nuclear del complejo TDNA-VirE2. Debido a que VIP1 no es una proteína abundante y representa un factor limitante para la transformación, *Agrobacterium* puede haber desarrollado un sistema para complementar, al menos parcialmente, la función de VIP1 (Lacroix *et al.*, 2005).

Integración del ADN-T. La integración del ADN-T dentro del cromosoma de la planta esta mediada por la proteína VirD2 que contiene dominios con actividad para la recombinación y ligación (Argos *et al.*, 1986; Tinland *et al.*, 1995). El estudio de mutantes de *A. thaliana* resistentes a la transformación con *A. tumefaciens* sugiere la participación de histonas H2A en la integración del ADN-T (Mysore; Nam y Gelvin, 2000).

Desarrollo de vectores desarmados. El conocimiento básico sobre el mecanismo de transferencia del ADN-T ha permitido el desarrollo de vectores para la introducción de genes foráneos en plantas cultivadas. Ya que los genes que codifican para la síntesis de opinas y auxinas no son necesarios para la transferencia del ADN-T, permite que esta región pueda ser reemplazada por genes de interés sin afectar el proceso de transferencia. Los vectores a los que se les ha removido la región interna del ADN-T son conocidos bajo el término de "desarmados".

El hecho de que los genes *vir*, para que sean funcionales, no necesitan estar en el mismo plásmido que el ADN-T y de que el plásmido Ti tiene un tamaño de 200 kilobases, a forzado el desarrollo de estrategias para reducir el tamaño de estos vectores. Hasta el momento se han desarrollado 2 tipos de estrategias: las que utilizan vectores co-integrados y las que utilizan vectores binarios.

Vectores co-integrados. Estos vectores son construidos por la recombinación entre un plásmido Ti desarmado que contiene el borde izquierdo y un pequeño vector que contiene el gen de interés flanqueado por el borde derecho y una región homóloga al borde izquierdo. La recombinación se lleva a cabo por un evento de entrecruzamiento de regiones homólogas de los dos plásmidos. Un ejemplo de este sistema es el plásmido de *Agrobacterium* co-integrado R772: pTiB6 (Hille *et al.*, 1983). Algunos vectores co-integrados han sido modificados para tener una recombinación sitio específica como el sistema *cre/lox* (Vergunst; Jansen y Hooykaas, 1998). En este sistema la cepa de *Agrobacterium* contiene un plásmido que codifica para una recombinasa, una secuencia para el control de su expresión, genes *vir* y un sitio de recombinación. Este plásmido se recombina con otro plásmido, que contiene el gen de interés flanqueado por el borde derecho, generando un plásmido co-integrado sitio específico.

Vectores binarios. Estos son los vectores más usados para la transformación de plantas y se encuentran en una gran variedad. En este sistema *Agrobacterium* tiene dos vectores: uno que contiene la región del T-

ADN con el gen de interés y otro vector que contiene la región vir. Los vectores binarios Ti tienen sitios de replicación para *Escherichia coli* y *A. tumefaciens*, permitiendo el desarrollo de técnicas de manipulación in vitro en *E. coli* (Hellens y Mullineaux, 2000). Dentro de los vectores simples binarios se encuentran pBIN 19, pC22, pGA482, pPCV001, pGreen y pCAMBIA entre otros. Su principal diferencia radica en el tamaño, el número de sitios de restricción del ADN-T, la presencia de genes reporteros, los orígenes de replicación y el antibiótico de selección en bacterias y plantas (Hellens y Mullineaux, 2000).

Se han realizado modificaciones de estos vectores mediante la introducción en el cromosoma de *Agrobacterium* ya sea la región del ADN-T o la región vir. Cuando la región T está integrada en el cromosoma, la región vir es parte del plásmido Ti y viceversa. Estos vectores binarios modificados han permitido la transformación de plantas de las familias Amariyllidaceae (como cebolla y ajo) y Liliaceae (como espárragos) (<http://www.cambiaip.org>).

Otras modificaciones también han permitido obtener cepas hipervirulentas de *Agrobacterium* capaces de mediar la transformación de cereales. Las cepas hipervirulentas contienen en el vector binario un cassette extra de genes *vir B*, *C* y *G* (Khanna y Daggard, 2003). La construcción de vectores binarios con sitios de reconocimiento de endonucleasas permite el ensamblaje de cassettes flanqueados por estas secuencias, para la construcción de vectores de transformación de plantas que contienen múltiples cassettes de expresión.

Este sistema permitió la transformación y expresión de seis genes en *A. thaliana* (Goderis *et al.*, 2002). En la actualidad están disponibles una amplia variedad de vectores Ti que los investigadores pueden escoger de acuerdo a sus necesidades y capacidad tecnológica.

Factores que median la transformación.

Existen diferentes factores que intervienen en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* determinando el éxito o fracaso en la transferencia del gen de interés y su posterior integración y expresión. Estos factores varían de acuerdo a la especie vegetal pero se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: edad de la planta, tipo de tejido a transformar, cepa de *Agrobacterium* seleccionada para transformar, tiempo y condiciones de inoculación del tejido con *Agrobacterium*, densidad y período de precultivo de la bacteria y presencia de necrosis en el tejido de la planta causada por *Agrobacterium* (Grevelding *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002, Ko *et al.*, 2003).

Con el objetivo de inducir la expresión de los genes vir y facilitar la transformación se han utilizado diferentes inductores de la transformación como son los compuestos glucosa, acetosiringona y azacitidina; los resultados en el porcentaje de plantas transformadas varían de acuerdo a la especie vegetal evaluada y a la concentración utilizada (Chakrabarty *et al.*, 2002; Boase; Butler y Borst, 1998). Recientemente se ha descrito que la exposición de líneas celulares de *Nicotiana tabacum*, *A. thaliana* y *Ageratum conyzoides* a sustancias inhibitoras de la síntesis de purinas y pirimidinas como la azaserina y acivicina

eleva hasta 180 veces la frecuencia de transformación en comparación con aquellas líneas que no habían sido tratadas con estos compuestos. Los mecanismos moleculares involucrados en esta respuesta son desconocidos. (Roberts *et al.*, 2003).

La transferencia del ADN-T en algunos explantes ha sido fuertemente disminuida por la producción por parte de la planta de especies reactivas de oxígeno las cuales probablemente activan procesos de muerte celular programada o necrosis tisular generando una barrera de células muertas alrededor del tejido infectado. Aunque estos compuestos promueven el necrosamiento del tejido, se han introducido diferentes inhibidores de enzimas que participan en este proceso para aumentar los porcentajes de plantas transformadas. Algunos tratamientos anti-necróticos aplicados durante el proceso de transformación incluyen la adición de agentes reductores, inhibición por calor de enzimas que participan en el proceso oxidativo, reducción del pH y la adición de inhibidores de enzimas. Los compuestos más ampliamente utilizados son: inhibidores de etileno (AgNO₃), inhibidores de oxidasas y peroxidasas (Quelantes de cobre y hierro, compuestos tiólicicos como L-cisteína, tiosulfato de sodio y glutatión, DTT) (Olhoft *et al.*, 2001; Olhoft y Somers 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002).

Estudios sobre el proceso de tumorigénesis han revelado que el desarrollo del tumor producido por *Agrobacterium* no se obtiene a altas temperaturas debido a un cambio conformacional de la proteína VirA que ocurre a temperaturas cercanas a 32 °C (Jin *et al.*, 1993). Otros estudios mostraron que

aunque la inducción óptima de los genes *vir* es a 25 °C la transferencia del ADN-T fue óptima a una temperatura de 19 °C (Fullner; Lara y Nester, 1996). Estos trabajos resaltan la importancia de la temperatura de co-cultivo durante la transformación. La temperatura óptima para el co-cultivo depende del tipo de planta y explante, y se resalta que es mejor el uso de temperaturas cercanas o inferiores a 25 °C. Además, temperaturas por encima de 25 °C causan un mayor necrosamiento del tejido y una reducción en la tasa de transformación (Salas *et al.*, 2001; Chakrabarty *et al.*, 2002).

En general las condiciones de luz durante el co-cultivo varían considerablemente si se compararan diferentes protocolos de transformación de plantas y este factor no ha sido evaluado ampliamente. Zambre *et al.* (2003) utilizaron callos de *Phaseolus acutifolius* y segmentos de raíz de *A. thaliana* en co-cultivo con *Agrobacterium* con diferentes condiciones de luz como oscuridad continua, fotoperíodo 16h luz/ 8h oscuridad y luz continua. En este estudio se concluyó que la actividad del gen GUS esta altamente correlacionada con el período de luz, siendo mayor la actividad cuando se utilizó luz continua para los dos tipos de explantes.

Principales aplicaciones de la transformación mediante *Agrobacterium*

Transformación de plantas. El conocimiento de las bases moleculares por las cuales *A. tumefaciens* transfiere su ADN-T al genoma de la planta ha sido fundamen

tal para el desarrollo de la ingeniería genética de plantas. Los primeros reportes científicos de plantas transgénicas son del año 1983 con el desarrollo de plantas de tabaco (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), de *Nicotiana plumbaginifolia* (Bevan; Flavell y Chilton, 1983), de petunia (Fraley *et al.*, 1983) y girasoles (Murai *et al.*, 1983) resistentes al antibiótico kanamicina.

Estas primeras plantas fueron usadas en el laboratorio pero en investigaciones posteriores se ha logrado producir plantas transgénicas con características comerciales importantes como la resistencia a herbicidas, insectos y virus, control de la maduración de frutos, plantas con resistencia a condiciones adversas como desecación (Dai *et al.*, 2001), alcalinidad, salinidad (Moyhanti *et al.*, 2002) y frío (Huang *et al.*, 2002). Las plantas transgénicas también han sido muy útiles para el estudio de la sobreexpresión de genes de defensa en la planta (Kanzaki *et al.*, 2002), evaluación de promotores inducibles por patógenos (Malnoy *et al.*, 20003), bioensayos de hipersensibilidad para facilitar la clonación y análisis funcional de nuevos genes *R* y *Avr* (Kamoun; Hamada y Huitema, 2003), entre muchos otros.

Adicionalmente la transformación mediada por *Agrobacterium* ha permitido la expresión y producción de interleukina-2 y la producción de vacunas en plantas (Jani *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003; Yu y Langridge, 2003; Park y Cheong, 2002), producción de plantas utilizadas en procesos de fitoremediación (Gisbert *et al.*, 2003, French *et al.*, 1999) y mejoramiento del contenido nutricional de algunos alimentos (Zhang *et al.*, 2003).

Transformación de hongos. La transformación mediada por *Agrobacterium* no ha sido solamente utilizada para la transformación y mejoramiento de plantas sino que también ha tenido aplicaciones en el área de micología. Se han transformado hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Fusarium venenatum*, *Trichoderma reesei*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Neurospora crassa*, la seta *Agaricus bisporus* (de Groot *et al.*, 1998), hongos ectomicorrizales (Comber *et al.*, 2003) y hongos patógenos humanos como *Coccidioides immitis* (Abuodeh *et al.*, 2000) y *Paracoccidioides brasiliensis* (Leal *et al.*, 2004). La transformación mediada por *Agrobacterium* además de permitir la integración de genes foráneos puede ser usada para diferentes estudios moleculares como el marcaje de genes por mutagénesis insercional (Brown y Holden., 1998), la disrupción de genes por la adición de secuencias homólogas (Gouka *et al.*, 1999) y la posibilidad de producir fenotipos alterados.

Transformación genética medida por *A. rhizogenes*. *A. rhizogenes* ha sido utilizado para la formación e incremento de pelos radicales que han sido apropiados para la producción de metabolitos secundarios por su estabilidad y alta producción. Entre los metabolitos secundarios producidos en raíces transformadas se encuentran terpenoides (Ayadi y Tremouillaux-Guiller, 2003) hiosciamina y escopolamina (Moyano *et al.*, 2003). Los cultivos de raíces transformadas son una fuente potencial de compuestos farmacéuticos (Sevon y Oksman-Caldentey., 2002). *A. rhizogenes* se ha utilizado para la introducción de genes en raíces de resistencia a

nemátodos en caña de azúcar (Cai *et al.*, 2003). De igual forma puede tener aplicación para procesos de fitoremediación con la producción de raíces capaces de remover uranio de soluciones acuosas (Eapen *et al.*, 2003).

Transformación genética medida otras bacterias. Hasta hace muy poco *Agrobacterium* era el único género conocido con la capacidad para transferir genes en las plantas. Sin embargo muy recientemente se ha demostrado que otras especies de bacterias incluyendo, *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti* pueden volverse competentes para integrar genes en las plantas si se les introduce un plasmido Ti desarmado y un vector binario. (Broothaerts, *et al.*, 2005) Es posible que en el futuro, otras bacterias se conviertan en una alternativa para la transferencia de genes en las plantas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Aunque los mecanismos de transferencia del ADN-T se han estudiado intensamente durante estas 2 últimas décadas, todavía hay algunos aspectos que es necesario aclarar, especialmente los mecanismos de integración del ADN-T en el genoma de la planta receptora y la interacción de las proteínas bacterianas transportadas a la célula vegetal con aquellas encargadas de realizar los procesos de recombinación, reparación y replicación del ADN celular. De otra parte, el genoma de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58, antecesora de las cepas que se usan actualmente para transformación, está publicado y analizado desde el 2001 (Wood; Setubal y Kaul, 2001 y Goodner *et al.*, 2001). Esta

información sin duda ayudará enormemente a seguir dilucidando los mecanismos moleculares de la transferencia de genes realizado por este género de bacterias a las plantas.

Desde el punto de vista más práctico, con el descubrimiento reciente de que, al menos en algunos modelos, los inhibidores de síntesis de purinas mejoran considerablemente los porcentajes de transformación, se ha abierto un camino para mejorar considerablemente la eficiencia de los métodos disponibles y posiblemente se logre incrementar el número de especies (no necesariamente plantas) susceptibles a ser transformadas por *Agrobacterium*.

Han pasado 20 años desde que se lograron producir las primeras plantas transgénicas y es realmente impresionante la gran variedad de aplicaciones y usos que se la ha dado a esta tecnología. Aplicaciones tan exóticas de las plantas transgénicas como por ejemplo su utilización para la descontaminación de campos contaminados con diversos xenobióticos (Eapen *et al.*, 2003; Gisbert *et al.*, 2003; French *et al.*, 1999) o para la producción de diversos metabolitos (Ayadi y Tremouillaux-Guiller, 2003; Moyano *et al.*, 2003; Sevon y Oksman-Caldentey., 2002) no deja de sorprender gratamente. Se espera que en el futuro la humanidad aprenda a utilizar y convivir armónicamente con una tecnología que bien utilizada puede traer innumerables beneficios.

BIBLIOGRAFÍA

ABUODEH, R. *et al.* Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by

- informa *Agrobacterium tumefaciens*. *En: The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 181 (2000); p. 2106-2110.
- ARENCIBIA, A. *et al.* En efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Transgenic Research*. Vol. 7 (1998); p. 1-10.
- ARGOS, P. *et al.* The integrate family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *En: EMBO Journal*. Vol. 5 (1986); p. 433-440.
- AYADI, R. and TREMOUILLAUX-GUILLER, J. Root formation from transgenic calli of Ginkgo bilob. *En: Tree Physiology*. Vol. 23, No. 10 (jul., 2003); p. 713-718.
- CASCALES, E. C and CHRISTIE, P. J. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *En: Science*. Vol. 304 (2004); p. 1170-1173.
- BARON C. *et al.* VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 179 (1997); p. 1203-1210.
- BEVAN, M. W.; FLAVELL, R. B. and CHILTON, M. D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *En: Nature*. Vol. 304 (1983); p.184-187.
- BOASE, M. R.; BUTLER, R. C. and BORST, N.K. *Chrysanthemum* cultivar-*Agrobacterium* interactions revealed by GUS expression time course experiments. *En: Scientia Horticulturae*. Vol. 77 (1998); p. 89-107.
- BROOThAERTS, W, *et al.* Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *En: Nature*. Vol. 433, No. 7026 (2005); p. 583-584.
- BROWN, J. S. and HOLDEN, D. W. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. *En: Currents Opinions of Microbiology*. Vol. 1 (1998); p. 390-394
- BURNS, D. L. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *En: Currents Opinions of Microbiology*. Vol. 6, No. 1 (2003); p. 29-34.
- CAI, D. *et al.* Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. *En: Plant Molecular Biology*. Vol. 51, No. 6 (2003); p. 839-849.
- CHAKRABARTY, R. *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *En: Journal of Bioscience*. Vol. 27, No.5 (2002); p. 495-502.
- CHILTON M. D. *et al.* Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *En: Cell*. Vol. 11, No. 2 (1977); p. 263-271.
- CHEN L. *et al.* A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Journal*

- of Bacteriology. Vol. 184, No. 17 (2002); p. 4838-4845
- CHENG M. *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Plant Physiology*. Vol. 115 (1997); p. 971-980.
- CHENG, X.Y. *et al.* *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol.95 (1998) ; p. 2767-2772.
- CHRISTIE, P. J. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *En: Journal of Bacteriology* Vol. 179 (1997); p. 3085-3094.
- CITOVSKY, V.; WARNICK, D. and ZAMBRYSKI, P. Nuclear import of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 91 (1994); p. 3210-3214.
- COMBIER, J. P. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* FEMS. *En: Microbiology Letters*. Vol. 14, No.220 (1) (2003); p. 141-148.
- DAI, X. *et al.* Expression of otsA gene in tobacco and improvement stress tolerance. *En: Wei Sheng Wu Xue Bao*. Vol. 41, No.4 (2001); p. 427-31.
- DE-GROOT, M. J. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* transformation of filamentous fungi. *En: Natural Biotechnology*. Vol. 16 (1998); p. 839-842
- DENG, W. *et al.* *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 95 (1998); p.7040-7045.
- et al.* VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *En: Molecular Microbiology*. Vol.31 (1991); p. 1795-1807.
- EAPEN, S. *et al.* Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *En: Environmental Research*. Vol. 91, No. 2 (feb., 2003); p. 127-133.
- FILICHKIN, S. A. and GELVIN, S. B.. Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1,D2 endonuclease. *En: Molecular Microbiology*. Vol. 8 (1993); p. 915-926.
- FRALEY, R. T. *et al.* Expression of bacterial genes in plant cells. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 80 (1983); p. 4803-4807.
- FRENCH C. *et al.* Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *En: Nature of Biotechnology*. Vol.17, No.5 (1999); p. 491.

- FULLNER, K. J.; LARA, J. C. and NESTER, E. W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *En: Science*. Vol. 173 (1996); p. 1107-1109.
- GAO, Y. *et al.* Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *En: World Journal of Gastroenterology*. Vol. 9, No.5 (2003); p.996-1002
- GARFINKEL, D. J. *et al.* Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *En: Cell*. Vol. 27 (1981); p. 143-153.
- GELVIN, S. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the Biology behind the "GENE-Jockeying" TOOL. *En: Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 67 (2003); p. 16-37.
- GISBERT, C. *et al.* A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *En: Biochemistry Biophysics Research Community*. Vol. 303, No.2 (2003); p. 440-445.
- GODERIS, I. J. A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. *En: Plant Molecular Biology*. Vol. 50, No.1 (2002); p. 17-27.
- GOODNER, B. *et al.* Genome sequence of the Plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *En: Science*. Vol. 294 (2001); p. 2323-2328
- GOUKA, R. J. *et al.* Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens* homologous recombination. *En: Nature Biotechnology*. Vol. 17 (1999); p. 598-601.
- GREVELDING, C. *et al.* Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *En: Plant Molecular Biology*. Vol. 23, No.4 (1993); p. 847-860.
- HERRERA-ESTRELLA, L. *et al.* Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *En: Nature*. Vol. 303 (1983); p. 209-213.
- ; VAN MONTAGU, M. and WANG, J. A bacterial peptide actino as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium* virD2 protein directs a β -glucuronidase fusion protein into tobacco nuclei. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 87 (1990); p. 9534-9537.
- HELLENS, R. P. and MULLINEAUX, P. M. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *En: Trends in Plant Science*. Vol. 5, No 10 (2000); p. 446-451.
- HILLE, J. Site-directed mutagenesis in *Escherichia coli* of a stable R772::Ti cointegrate plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Journal of Bacteriology*. Vol.154, No. 2 (1983); p. 693-701.
- HOWARD, E. A. and CITOVSKY, V. The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. *En: Bioassays*. Vol. 12 (1990); p. 103-108.

- HOWARD, E. A. *et al.* Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand protein complex: tight association with the 5'-end of T-strands. *En: Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 86 (1989); p. 4017-4021.
- HUANG, T. Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature. *En: Plant Molecular Biology*. Vol. 50, No. 3 (2002); p. 333-344.
- ISHIDA, Y. *et al.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Nature Biotechnology*. Vol. 4 (1996); p. 745-750.
- JAKUBOWSKI, S. J.; KRISHNAMOORTHY, V. and CHRISTIE, P. J. *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 185, No. 9 (2003); p. 2867-2878.
- JANI, D. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *En: Transgenic Research*. Vol. 11, No. 5 (2002); p. 447-54.
- JIN, S. G. *et al.* Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 172 (1990a); p. 4945-4950.
- _____ *et al.* The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 172 (1990b); p. 531-522.
- _____ *et al.* The regulatory virA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 175 (1993); p. 6830-6835.
- KAMOUN, S.; HAMADA, W. and HUITEMA, E. Agrosuppression: a bioassay for the hypersensitive response suited to high-throughput screening. *En: Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 16, No.1 (2003); p. 7-13.
- KANZAKI, H. *et al.* Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *En: Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 105, Nos. 6-7 (2002); p. 809-814.
- KHANNA, H. K. and DAGGARD, G. E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 21, No.5 (2003); p. 429-436.
- KO, T. S. *et al.* Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *En: Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 107, No. 3 (2003); p. 439-447
- LACROIX, B. *et al.* The VirE3 protein of *Agrobacterium mimics* a host cell function

- required for plant genetic transformation. *En: EMBO Journal* 24: (2005); p. 428–437
- LEAL, C. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *En: Medical Mycology 2004* (in press).
- LI, L. *et al.* A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *En: Proceedings of The Natural Academy of Science*. Vol. 99, No. 19 (2002); p. 12369–12374.
- MALNOY, M. *et al.* Activation of three pathogen-inducible promoters of tobacco in transgenic pear (*Pyrus communis* L.) after abiotic and biotic elicitation. *En: Planta*. Vol. 216, No. 5 (2003); p. 802-14.
- MAY, G. D. *et al.* Generations of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *En: Biotechnology*. Vol. 13 (1995); p. 486-492.
- MOYHANTI, A. *et al.* Transgenics of an elite indica rice variety *Pusa basmati* 1 harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress. *En: Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 106, No.1 (2002); p. 51-57.
- MOYANO, E. *et al.* Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *En: Journal of Experimental Botany*. Vol. 54, No. 381 (2003); p. 203-11.
- MURAI, N. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *En: Science*. Vol. 222 (1983); p. 476-482.
- MYSORE, K. S.; NAM, J. and GELVIN, S. B. An *Arabidopsis* H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DN integration. *En: Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. Vol. 97 (2000); p. 948-953.
- NAAM, J. *et al.* Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *En: Molecular General Genetics*. Vol. 261 (1999); p. 429-438.
- OLHOFT, P. M. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 20 (2001); p. 731-737.
- _____ and SOMERS, D. A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 20 (2001); p. 706-711.
- PARK, Y. and CHEONG, H. Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants. *En: Protein Expression Purification*. Vol. 25, No.1 (2002); p. 160-165.
- ROBERTS, R. L. *et al.* Purine synthesis and increased *Agrobacterium tumefaciens* transformation of yeast and plants. *En: Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. Vol. 100, No.11 (2003); p. 6634-6639.

- SALAS, M. G. *et al.* Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *En: Plant Cell Reports*. Vol. 20 (2001); p. 701-705.
- SCHEIFFELE, P., PANSEGRAU, W. and LANKA, E. Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. *En: Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270 (1995); p. 1269-1276.
- SCHRAMMEIJER, B. *et al.* Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *En: Nucleic Acids Research*. Vol. 31, No. 3 (feb.-2003); p. 860-868.
- SEVON, N. and OKSMAN-CALDENTY, K. M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *En: Planta Médica*. Vol.10 (2002); p. 859-868.
- SHIMODA, N. *et al.* Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar binding protein of *Agrobacterium*. *En: Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268 (1993); p. 26552-26558.
- STACHEL S.E. *et al.* Identification of signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Nature*. Vol. 318 (1985); p. 624-629.
- SUNDBERG, C. and REAM, W. The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 181 (1999); p. 6850-6855.
- TINLAND, B. *et al.* The T-DNA linked VirD2 protein contains two distinct nuclear localization signals. *En: Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. Vol. 89 (1992); p. 7442-7446.
- _____ *et al.* The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *En: EMBO Journal*. Vol. 14 (1995); p. 3585-3595.
- TZFIRA, T. and CITOVSKEY, V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *En: Molecular Plant Pathology*. Vol. 1, No. 4 (2000); p. 202-212.
- TZFIRA, T.; VAIDYA, M. and CITOVSKEY, V. Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1. *En: Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. Vol. 99, No.16 (2002); p. 10435-10440.
- VERGUNST, A. C. *et al.* Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *En: PNAS*. Vol. 102 (2005); p. 832-837.
- _____; JANSEN, L. E. and HOOYKAAS, P. J. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. *En: Nucleic Acids Research*. Vol. 26, No. 11 (1998); p. 2729-2734.

- WANG, K. *et al.* Site-specific nick occurs within the 25 bp transfer promoting border sequence following induction of vir gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Science*. Vol. 235 (1987); p. 587-591.
- WAGNER, V. T. and MATTHYSSE, A.G. Involvement of vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspensions culture cells. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 174 (1992); p. 5999-6003.
- WINANS, S. C. *et al.* Host recognition by the VirA Vir G two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *En: Research Microbiology*. Vol. 145 (1994); p. 461- 473.
- WOOD, D. W. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *En: Science*. Vol. 294 (2001); p. 2317-2323,
- YEO, H. and WAKSMAN, G. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 186 (2004); p. 1919–1926.
- YU, J. and LANGRIDGE, W. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *En: Transgenic Research*. Vol. 12, No. 2 (2003); p. 163-169.
- ZAMBRE, M. *et al.* Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *En: Planta*. Vol. 216 (2003); p. 580–586.
- ZAMBRYSKI, P. *et al.* Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *En: EMBO Journal*. Vol. 2 (1983); p. 2143-2150.
- ZHANG, P. *et al.* Transfer and expression of an artificial storage protein (ASP1) gene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *En: Transgenic Research*. Vol. 12, No.2 (2003); p. 243-250.
- ZHOU, X. R. and CHRISTIE, P. J. Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 single stranded DNA binding protein identifies regions required for self-association and interaction with VirE1 and a permissive site for hybrid protein construction. *En: Journal of Bacteriology*. Vol. 181 (1999); p. 4342-4352.
- ZHU, Y. *et al.* Identification of *Arabidopsis* rat mutants. *En: Plant Physiology*. Vol. 132, No. 2 (2003); p. 494-505.
- ZUPAN, J. and ZAMBRYSKI, P. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *En: Critical Review Plant Science*. Vol. 16 (1997); p. 279-295.
- _____ ; WARD, D. and ZAMBRYSKI, P. Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *En: Current Opinion of Microbiology*. Vol. 1 (1998); p. 649-655.