

2

Ingeniería genética del trigo

Pilar Carbonero

1. Antecedentes

2. La ingeniería genética como herramienta en biotecnología:

- Plantas resistentes a insectos mediante expresión transgénica de inhibidores de proteasas.
- Los inhibidores de proteasas pueden ser también fungicidas.

3. La ingeniería genética como herramienta de conocimiento:
la regulación de la expresión génica en semillas.



Pilar Carbonero,
Departamento de Biotecnología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, I.PAI

Ingeniería genética del trigo

2.1. Antecedentes

La domesticación del trigo hace diez milenios constituyó el acto fundacional no sólo de la agricultura, sino también de lo que denominamos como civilización occidental. Si hoy conocemos con exactitud el lugar donde ocurrió tan magno acontecimiento es gracias a unos catalizadores biológicos (enzimas) denominados endonucleasas de restricción que se pusieron a nuestra disposición a partir de los descubrimientos del Profesor Arber. Éstos permiten fragmentar el material genético (ADN) de forma específica y cuando se utilizan en la fragmentación del ADN de los genomas de trigos diploides silvestres y cultivados, los patrones que se obtienen, después de su separación electroforética y un revelado apropiado, son característicos de cada trigo y de su comparación binaria puede concluirse respecto al grado de divergencia evolutiva entre los genotipos comparados. Los trigos diploides domesticados siguieron en uso hasta las primeras décadas del siglo xx y en España, fueron los valles pirenaicos su último reducto. Hoy se conservan numerosas muestras de trigos diploides en herbarios y bancos de germoplasma. Los patrones genómicos de todos

los trigos diploides cultivados son muy parecidos entre sí, lo que indica que todos proceden de un mismo acto de domesticación, de una misma población silvestre. Los trigos diploides silvestres presentan en cambio una gran diversidad de patrones que mediante algoritmos apropiados pueden ser organizados en árboles genealógicos (Heun *et al.*, 1997).

Acortando la historia, solamente una población silvestre de una ladera de las montañas de Karaca Dag, entre los valles del Tigris y del Éufrates, en el Irak actual, cerca de Turquía, ha podido dar lugar al trigo diploide cultivado, lo que nos lleva a la fundada sospecha de que en ese lugar debimos de nacer como pueblo civilizado. Pronto se domesticó en una zona próxima el trigo tetraploide, cultivado a partir del silvestre. Este trigo tenía un comportamiento agronómico superior y de él se han derivado todos los trigos semoleros actuales que se usan para fabricar las pastas alimenticias de calidad (espaguetis, macarrones, etc.) ya que las propiedades viscoelásticas –las propiedades reológicas– de las masas sémola-agua son óptimas para tal fin y, en cambio, son menos apropiadas que las masas harina-agua del trigo hexaploide para retener los gases de la fermentación, por lo que en general no se usan para la fabricación de pan.

El cultivo de trigo tetraploide se extendió progresivamente a otras regiones, y en Kirghizia, al sur del mar Caspio, sirvió de base para la obtención del trigo hexaploide. El trigo hexaploide es el único obtenido por el hombre en un campo de cultivo, en una gran operación de transgenia que no se ha repetido antes ni después con igual éxito. Éste es el trigo panificable, *Triticum aestivum*, que viene siendo desde hace varios milenios la primera planta transgénica cultivada, ya que recibió dos copias del genoma (unos 30.000 genes por duplicado) de una gramínea silvestre, *Aegilops ventricosa* (syn. *T. tauschii*). Esta enorme redundancia génica ha sido el secreto del éxito del trigo de hacer pan, del trigo hexaploide,

de su adaptabilidad a los más diversos hábitat, desde la cuenca mediterránea hasta los países escandinavos, desde el Kilimanjaro hasta América, Asia y Australia.

Pero no sólo pastas alimentarias y pan se obtienen del trigo y de su pariente próximo la cebada, sino que también, previa germinación parcial, estos cereales pueden ser sustratos de la fermentación alcohólica para fabricar la cerveza. En Mesopotamia, en tiempos de Nabucodonosor, se consumía hasta un tercio de la producción de cereal para este fin, y al principio el trigo era el principal ingrediente, para luego dar paso a la cebada cuando la salinización de los suelos hizo difícil el cultivo del trigo. La germinación no sólo es importante como paso previo a la fermentación, sino que es crucial en la siembra, para la propagación de la cosecha.

El esclarecimiento de los mecanismos moleculares que rigen los procesos de germinación de la semilla de cebada, y de la acumulación de proteínas de reserva durante el desarrollo de la misma, así como la ingeniería genética de la resistencia a plagas en cereales, han sido objeto de investigación activa en el grupo que dirijo en la Universidad Politécnica de Madrid, durante los últimos años (Carbonero *et al.*, 1999; Carbonero *et al.*, 2000).

2.2. La ingeniería genética como herramienta en biotecnología: plantas resistentes a insectos

Las pérdidas en las cosechas causadas por insectos se cifran como media alrededor del 20% a escala mundial, pero pueden llegar a ser más del 50%, cuando las condiciones ambientales son favorables al desarrollo de la plaga, como ocurre con frecuencia en zonas tropicales y subtropicales. Incluso en zonas con una agricultura altamente tecnificada, estas pérdidas pueden ser importantes a pesar de la utilización racional de insecticidas (organo-

fosforados, carbamatos, piretroides, etc.). No hay que olvidar que a las pérdidas directas por ingestión de hojas, flores, raíces y semillas, hay que añadir las indirectas causadas por los insectos, por ejemplo, la transmisión de virus y bacterias fitopatógenas (por áfidos principalmente) o las infecciones oportunistas por hongos en tejidos previamente macerados por los insectos plaga.

Las prácticas agrícolas modernas (regadíos, monocultivos, etc.) así como el aumento de la temperatura a escala global y la pérdida de sus enemigos naturales, tienden a favorecer el desarrollo de las plagas de insectos en los cultivos.

Cuando en la década de los ochenta, se desarrolló un método sencillo de realizar transgénesis vegetal, utilizando como vector un derivado del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Zambryski *et al.*, 1983), una de las primeras aplicaciones realizadas consistió en hacer que las plantas expresaran una proteína insecticida de origen bacteriano, la proteína Bt producida al esporular *Bacillus thuringiensis*. Las propiedades insecticidas de Bt se conocían desde las primeras décadas del siglo xx, pero no fue hasta 1952 que empezó a ser usada con fines agrícolas, cuando la empresa Sandoz, obtiene la primera patente (Thuricide). En 1987, una pequeña empresa de Biotecnología, Plant Genetics Systems, creada al amparo de la Universidad de Gante (Bélgica), demostró que tabacos transgénicos que expresaban la proteína Bt eran más resistentes al ataque de las voraces larvas de *Manduca sexta* (lepidóptero) que los tabacos controles sin transformar (Vaeck *et al.*, 1987). A partir de este momento aparecen numerosas patentes relativas a distintas variantes de Bt expresadas transgénicamente en distintas cosechas importantes. Entre otras, los maíces transgénicos expresando la variante CryIA que los hace particularmente resistentes al taladro europeo y patatas transgénicas expresando la variante CryIIIA del Bt más resistentes al escarabajo de la patata.

Un procedimiento alternativo al uso del plásmido Ti como vector para obtener plantas

transgénicas es el método biolístico que utiliza una “pistola de genes”. Este dispositivo dispara a velocidad controlada microprojectiles de oro o tungsteno coloidal recubiertos del material genético, ADN, sobre fragmentos de tejidos vegetales capaces de regenerar *in vitro* plantas completas (Klein *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1988). Este procedimiento ha sido el más utilizado, hasta la fecha para obtener cereales transgénicos (arroz, trigo, maíz), si bien recientemente se ha conseguido transformar cereales utilizando ciertas cepas de *A. tumefaciens*.

En Aragón, en la zona de los Monegros, se cultivan unas decenas de miles de hectáreas de maíz transgénico, expresando la proteína Bt. La resistencia obtenida frente al taladro europeo, es un carácter agronómico deseable en esta zona donde esta plaga de lepidópteros es particularmente insidiosa y difícil de controlar con tratamientos externos de insecticidas, ya que las larvas se guarecen en el interior de túneles que excavan dentro de la planta.

Además de las proteínas Bt, se han caracterizado otras proteínas insecticidas de origen vegetal para su eventual uso transgénico como insecticidas, tales como:

- i) Inhibidores de proteasas digestivas de insectos plaga.
- ii) Inhibidores de α -amilasas.
- iii) Polifenoloxidasas, Lipoxigenasas, lectinas.
- iv) Proteínas implicadas en catálisis biosintética de metabolitos secundarios que transforman precursores inactivos en insecticidas activos.

Las plantas transgénicas, expresando proteínas insecticidas tienen un lugar destacado dentro de los programas de control integrado de plagas ya que la ingeniería genética permite expresarlas donde y cuando se necesitan, eligiendo adecuadamente los promotores. Además se evitan pérdidas por agua de lluvia o riego y se contamina menos el Medio Ambiente al disminuir el número de tratamientos con insecticidas convencionales de síntesis.

Nuestro grupo ha venido dedicando una parte importante de su esfuerzo investigador al estudio de una familia multigénica de inhibidores de α -amilasas y proteasas del grano de trigo y cebada, con vistas a su utilización transgénica en el control de plagas de insectos.

2.2.1. Plantas resistentes a insectos mediante expresión transgénica de inhibidores de proteasas

En la semilla de trigo y cebada, una fracción sustancial del contenido proteico está representada por péptidos antibióticos –lo que recientemente en animales se ha denominado “inmunidad innata”– y por inhibidores de enzimas heterólogas. En estos cereales, una única familia proteica engloba inhibidores de α -amilasa y de tripsina. Más de 20 proteínas distintas de esta familia han sido caracterizadas, sus propiedades insecticidas analizadas *in vitro*, muchos de sus genes han sido clonados y algunos de éstos expresados transgénicamente (Carbonero *et al.*, 1993; Carbonero, 1997; Carbonero *et al.*, 1999).

El inhibidor de tripsina de cebada BTI-CMe (gen *Itr1*) es uno de los miembros de esta familia mejor caracterizados (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 1989; Royo *et al.*, 1996). Pertenece a la misma subfamilia que los inhibidores de tripsina de centeno y maíz y del inhibidor bifuncional del mijo africano (RBI). El modelo 3D de su estructura proteica ha sido posible a partir de la estructura de este último, obtenida por técnicas de NMR, ya que con el RBI del mijo africano (Strobl *et al.*, 1995) comparte un 69% de residuos similares y probablemente, la posición de sus cinco puentes disulfuro.

BTI-CMe inhibe *in vitro* las proteasas extraídas del tubo digestivo de larvas de lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* (Alfonso *et al.*, 1997), un lepidóptero polífago. Se obtuvieron trigos transgénicos, expresando la proteína BTI-CMe por el procedimiento biolístico, bombardeando embriones inmaduros. En 16 líneas seleccionadas que inicialmente expresaban transgénicamente BTI-CMe, se realizaron ensayos de supervivencia con la polilla de los

graneros (*Sitotroga cerealella*) alimentadas exclusivamente con semillas transgénicas. En aquellos experimentos en las que BTI-CMe constituía más del 0,5% (hasta 1,1%) de la proteína total, se observó no sólo un peso inferior en las larvas alimentadas con estas semillas, sino que el porcentaje de larvas que llegaban al último estadio larvario o que pupaban era ~30% inferior que en las alimentadas con semillas control no transformadas (Altpeter *et al.*, 1999).

En otro conjunto de experimentos se transformó tabaco (*Nicotiana tabacum*) con el mismo gen Itr1 bajo el control de un promotor constitutivo fuerte (35S CaMV). Aun cuando el transgén se expresó y el inhibidor BTI-CMe era activo inhibiendo tripsina *in vitro*, el crecimiento de las larvas de *Spodoptera exigua*, alimentadas durante dos días con las hojas transgénicas de tabaco, no se vio afectada y la mortandad obtenida era análoga a la de los controles. Analizando el patrón de actividad proteolítica en el tubo digestivo de estas larvas se observó que, así como la actividad tipo tripsina decrecía en un 25%, esta disminución venía acompañada de una inducción de proteasas digestivas de otros tipos, tales como leucín-aminopeptidasas y carboxipeptidasas A. Este mecanismo compensatorio en el perfil proteolítico del tracto digestivo pudiera ser la causa de la resistencia observada en estos insectos plaga (Lara *et al.*, 2000)

También se expresó este mismo gen Itr1 en arroz (*Oryza sativa*), tanto en una subespecie *indica* como en otra *japonica* y se observó su efecto insecticida en el curculiónido *Sitophilus oryzae*, una de las plagas de almacén más importantes en arroz. El interés de este estudio radica, además de en su posible utilidad práctica, en que desde el punto de vista básico es la primera vez que se demuestra la presencia de serín-proteasas (tripsina) en el tracto digestivo de este tipo de insectos lo que indica que su patrón proteolítico es complejo y no sólo contiene cisteín-proteasas como se había descrito con anterioridad (Alfonso-Rubí *et al.*, 2003).

2.2.2. Los inhibidores de proteasas pueden ser también fungicidas

En nuestro grupo se ha caracterizado otro gen de cebada (gen *Icy*), no perteneciente a la familia multigénica descrita anteriormente, que codifica un inhibidor de cisteín-proteasas (Gaddour et al., 2001). La proteína codificada por el gen *Icy*, cistatina de cebada, inhibe papaína, quimopapaína, ficina y catepsina B *in vitro*, y es también un antifúngico potente frente a *Botrytis cinerea*, un hongo causante de una importante enfermedad de la vid. Por experimentos de mutagénesis dirigida hemos obtenido un gen más activo como inhibidor de proteasas, manteniendo su capacidad fungicida frente a *Botrytis*. Este mutante es un candidato obvio para explorar sus propiedades biotecnológicas en la protección de cosechas importantes frente a coleópteros plaga (nuestros datos sin publicar). De momento, estos experimentos de mutagénesis dirigida ya nos han permitido establecer que la inhibición de proteasas y el poder antifúngico residen en dos partes bien diferenciadas de la molécula (Martínez et al., 2003).

2.3. La ingeniería genética como herramienta de conocimiento: la regulación de la expresión génica en semillas

Las semillas de los cereales han constituido la base de la alimentación humana y animal desde los albores de la agricultura hasta nuestros días. En trigo, arroz, maíz, etc., se diferencian en ellas el embrión que dará lugar a la nueva planta al germinar y el endospermo, donde se acumulan las sustancias de reserva (almidón y proteínas principalmente). Las proteínas de reserva están codificadas por genes que se expresan específicamente durante el desarrollo del endospermo siguiendo un patrón espacio-temporal bien establecido. La clave de esta espe-

cificidad radica en una serie de motivos en cis en los promotores de estos genes que son reconocidos por proteínas reguladoras (factores transcripcionales TFs) que actúan en trans.

Al final del desarrollo de la semilla, ésta inicia un periodo de latencia (dormancia) durante el cual se prepara para soportar la pérdida de agua. En este estado de deshidratación la semilla puede sobrevivir durante años, antes de reiniciar su actividad metabólica y crecimiento, durante la etapa de germinación. En esta nueva etapa, una vez que la semilla absorbe agua, el embrión sintetiza giberelinas (una hormona vegetal) que difunde hacia las células externas del endospermo (capa de aleurona) donde dispara una cadena de transducción de señales que acaba induciendo la expresión de genes que codifican enzimas encargados de hidrolizar las sustancias de reserva (proteínas y almidón) acumulados en el endospermo durante el desarrollo de la semilla. En las células de la capa de aleurona se induce la expresión específica de genes que codifican proteasas, α -amilasas, etc., conjugando secuencias específicas en cis en sus promotores génicos con proteínas reguladoras (TFs) en trans.

Entre los TFs que regulan la síntesis de proteínas de reserva, nosotros hemos caracterizado proteínas pertenecientes a las clases bZIP, DOF y MYB no sólo en cereales, sino también en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 1998; Oñate *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2003) y hemos demostrado su interacción con los distintos motivos en cis de los promotores y entre los distintos TFs. Así como un bZIP de la subfamilia Opaco-2, había sido previamente descrito en la regulación de los genes de proteínas de reserva en maíz (Schmidt *et al.*, 1990), y nuestra contribución consistió en corroborar que este tipo de proteínas realizaban una función equivalente en otros cereales tales como trigo y cebada, nosotros hemos sido los primeros en señalar el papel de los DOF en la regulación de la expresión génica, tanto en el desarrollo como en la germinación y en señalar que algunos de estos TFs (GAMYB, BPBF) participan tanto en uno como en otro proceso (Gubler *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2002; Mena *et al.*, 2002).

Referencias

- Alfonso, J., Ortego, F., Sánchez-Monge, R., García-Casado, G., Pujol, M., Castañera, P., Salcedo, G. (1997) "Wheat and barley inhibitors active towards α -amylase and trypsin-like activities from *Spodoptera frugiperda*". *J. Chem. Ecol.* 23, 1729-1741.
- Alfonso-Rubí, J., Ortego, F., Castañera, P., Carbonero, P., Díaz, I. (2003). "Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in indica and japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*". *Transgenic Res.* 12, 23-31.
- Altpeter, F., Díaz, I., McAuslane, H., Gaddour, K., Carbonero, P., Vasil, I. K. (1999) "Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor" *CMe. Mol. Breed.* 5, 53-63.
- Carbonero, P. (1997) "Plantas transgénicas". *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp.)* 91, 115-120.
- Carbonero, P., Díaz, I., Vicente-Carbajosa, J., Alfonso-Rubí, J., Gaddour, K., Lara, P. (1999) "Cereal α -amylase/trypsin inhibitors and transgenic insect resistance". In: *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance* (G. T. Scarascia-Mugnozza & M. A. Pagnotta, eds.) pp 147-158. Kluwer Academic Publishers.
- Carbonero, P., Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., García-Maroto, F., Royo, J., Gómez, L., Mena, M., Medina, J., Díaz, I. (1993) "A multigene family from cereals which encodes inhibitors of trypsin and heterologous α -amylases". In: *Innovations in proteases and their inhibitors* pp. 333-348 (F. X. Avilés, ed.). Walter de Gruyter.
- Carbonero, P., Vicente-Carbajosa, J., Mena, M., Oñate, L., Lara, P., Díaz, I. (2000) "bZIP and DOF transcription factors in the regulation of gene expression in barley endosperm". In: *Seed Biology: Advances and Applications* (M. Black, K.J. Bradford & J. Vazquez-Ramos, eds.) pp 27-41. CAB International.
- Díaz, I., Vicente-Carbajosa, J., Abraham, Z., Martínez, M., Isabel-Lamoneda, I., Carbonero P. (2002) "The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development". *Plant J.* 29, 401-412.
- Gaddour, K., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Isabel-Lamoneda, I., Díaz, I., Carbonero, P. (2001) "A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*lcy*) responds differentially to abiotic stimuli". *Plant Mol. Biol.* 45, 599-608.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K., Jacobsen, J. V. (1995) "Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for myb transactivation of a high-pl α -amylase gene promoter". *Plant Cell* 7, 1879-1891.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., Schell, J. (1983) "Expresión of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector". *Nature* 303, 209-213.
- Heun, M., Schaefer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F. (1997) "Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA finger printing". *Science* 278, 1312-1314.

- Klein, T. M., Fromm, M. E., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M., Sanford, J. C. (1988) "Transfer of foreign genes into intact maize cells with high velocity microprojectiles". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4305-4309.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., Sanford, J. C. (1987) "High-velocity micro-projectiles for delivering nucleic acids into living cells". *Nature* 327, 70-23.
- Lara, P., Oñate-Sánchez, L., Ferrándiz, C., Abraham, Z. Díaz, I., Carbonero P., Vicente-Carbajosa, J. (2003) "Synergistic activation of seed-storage protein gene expression in Arabidopsis by AB13 and two bZIPs related to Opaque-2". *J. Biol. Chem.* 278, 21003-21011.
- Lara, P., Ortego, F., González-Hidalgo, E., Castañera, P., Carbonero, P., Díaz, I. (2000) "Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco". *Transgenic Res.* 9, 169-178.
- Martínez, M., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P., Carbonero P., Díaz, I. (2003) "Inhibition of plant pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (*Icy* gene) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties". *Mol. Plant-Microbe Inter.* 16, 876-883.
- Mena, M., Cejudo, F-J., Isabel-La-Moneda, I., Carbonero P. (2002) "A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberelin-responsive genes in barley aleurone". *Plant Physiol.* 130, 111-119.
- Mena, M., Vicente-Carbajosa, J., Schmidt, R.J., Carbonero P. (1998) "An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamins-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm". *Plant J.* 16, 53-62.
- Oñate, L., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Díaz, I., Carbonero P. (1999) "Barley BLZ2: a seed specific bZIP protein that interacts with BLZ1 in vivo and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm". *J. Biol. Chem.* 274, 9175-9182.
- Rodríguez-Palenzuela, P., Royo, J., Gómez, L., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Molina-Cano, J. L., García-Olmedo, F., Carbonero P. (1989) "The gene for trypsin inhibitor CMe is regulated in trans by the lys 3a locus in the endosperm of barley (*Hordeum vulgare* L.)". *Mol. Gen. Genet.* 219, 474-479.
- Royo, J., Díaz, I., Rodríguez-Palenzuela, P., Carbonero P. (1996) "Isolation and promoter characterization of barley gene *ltr1* encoding trypsin inhibitor BTI-CMe: differential activity in wild-type and mutant *lys3a* endosperm". *Plant Mol. Biol.* 31, 1051-1059.
- Schmidt, R. J., Burr, F. A., Aukerman, M. J., Burr, B. (1990) "Maize regulatory gene Opaque-2 encodes a protein with a leucine-zipper motif that binds to zein DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 46-50
- Strobl, S., Mühlhahn, P., Bersntein, R., Witscheck, R., Maskos, K., Wunderlich, M., Huber, R., Glockshuber, R., Holak, T.A. (1995) "Determination of the three-dimensional structure of the bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor from ragi seeds by NMR spectroscopy". *Biochemistry* 34, 8281-8293.

Vaeckt, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansen, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., Leemans, J. (1987) "Transgenic plant protected from insect attack". *Nature* 328, 33-37

Vicente-Carbajosa, J., Oñate, L., Lara, P., Díaz, I., Carbonero P. (1998) "Barley BLZ1: a bZIP transcriptional activator that interacts with endosperm-specific gene promoters". *Plant J.* 13, 629-640.

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J. (1983) "Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity". *EMBO J.* 2, 2143-2150.