

## Trabajo de revisión

# El sistema del plásmido Ti de la *Agrobacterium tumefaciens* y su empleo para introducir genes en células vegetales y plantas

LUIS HERRERA-ESTRELLA

Laboratorio de Genética

Ryksuniversiteit Gent. B-9000 Gent (Bélgica)

Desde hace mucho tiempo, los patólogos vegetales se encuentran interesados en la bacteria de los suelos conocida como *Agrobacterium tumefaciens*, pues algunas cepas de este organismo tienen la capacidad de infectar a casi todas las plantas dicotiledóneas (Braun, 1978, 1982).

Como resultado de la infección, el tejido dañado comienza a proliferar como un crecimiento neoplásico, lo cual se conoce generalmente como tumor de la corona (*crown gall*). Una vez inducido, este tumor no requiere la presencia de bacterias para continuar desarrollándose, y puede ser cultivado *in vitro* como un cultivo axénico (Braun, 1943). Hay dos características o propiedades principales de este tipo de tumor: la capacidad para crecer *in vitro* sin el suplemento de hormonas requerido por las células normales vegetales, y su capacidad para sintetizar un conjunto de nuevos metabolitos conocidos como opinas, los cuales no están presentes en las células normales. Las opinas son aminoácidos o derivados de azúcares que pueden ser utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno por la bacteria responsable de incitar el tumor (Tempé y Petit, 1982).

La *Agrobacterium* atrajo la atención de los biólogos moleculares cuando se descubrió que un plásmido de gran tamaño, el plásmido inductor del tumor o plásmido Ti (*tumor inducing*) es el responsable de la capacidad oncogénica de la bacteria (Zaenen *et al.*, 1974; Van Larebeke *et al.*, 1974; Waltson *et al.*, 1975), y que la formación del tumor es el resultado directo de la transferencia y la integración estable de un segmento definido de este plásmido Ti (ADN-T) dentro del genoma nuclear de la célula vegetal (Chilton *et al.*, 1977, 1980; Willmitzer *et al.*, 1980).

Recientemente ha surgido un nuevo interés en la *Agrobacterium* a causa de la posibilidad de utilizar el plásmido Ti como vector para la transferencia y expresión de genes exógenos en las plantas. Ello ya es hoy día una realidad y ha abierto las puertas al estudio de la regulación de los genes en los vegetales.

En este trabajo explicaré principalmente algunos de los avances más recientes en la comprensión al nivel molecular de cómo la *Agrobacterium* transfiere el ADN en la célula vegetal, y cómo esta comprensión permitió el diseño sistemático de derivados del plásmido Ti eficientes para introducir secuencias de ADN foráneas en las células vegetales, sin alterar su capacidad normal para diferenciarse en plantas.

## ORGANIZACION GENETICA Y FUNCIONAL DEL PLASMIDO Ti

Desde el descubrimiento de la naturaleza plasmídica del principio inductor del tumor de la *Agrobacterium*, el plásmido Ti se convirtió en el principal objetivo de los estudios encaminados a la identificación y el análisis de las funciones de los genes responsables de la formación del tumor.

Los plásmidos Ti pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de opina que inducen en la planta. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han encaminado hacia los plásmidos Ti que inducen tumores productores de nopalina o de octopina.

Los tumores de la corona inducidos por plásmidos Ti productores de nopalina también producen agrocinopina A y B (Firmin y Fenwick, 1978; Ellis y Murphym, 1981), mientras que los tumores productores de octopina también producen agropina y mannopina (Tate *et al.*, 1982).

De esta forma se logró obtener un esquema detallado de la organización genética del plásmido Ti productor de octopina y del productor de nopalina. Inicialmente ello se logró mediante mutagenización por inserción de un transposón y posteriormente utilizando mutantes de delección extensiva. Se demostró que no sólo los genes responsables de la síntesis de opina están localizados en el plásmido Ti, sino que también allí se localizan los genes que permiten a la *Agrobacterium* utilizar las opinas como fuentes de carbono y nitrógeno. Incluso estos estudios definieron 2 regiones del plásmido Ti que son esenciales para la formación del tumor. Estos resultados se resumen en la figura 1. Los mutantes que se sitúan en una de estas dos regiones, llamada *Vir*, tienen un fenotipo no oncogénico, mientras que los mutantes en la otra región del plásmido Ti importante para la inducción del tumor, conocida como región *T*, tienen un fenotipo oncogénico atenuado o inducen tumores con morfología alterada (Holsters *et al.*, 1980; De Greve *et al.*, 1981).

El análisis de hibridación según el método de Cot y Southern demostró que la región *T* contiene todas las secuencias en el plásmido Ti, que son transferidas e integradas dentro del genoma nuclear de las líneas tumorales (Chilton *et al.*, 1977, 1980; Thomashow *et al.*, 1980; Lemmers *et al.*, 1980). En algunos plásmidos productores de octopina, por ejemplo pTiA6NC, pTiAch5 y pTiB6S3, la región *T* se encuentra dividida en dos segmentos adyacentes de ADN, uno de 13 kb (ADN-T izquierdo) y otro de aproximadamente 7 kb (ADN-T derecho) (Thomashow *et al.*, 1980; De Beuckeleer *et al.*, 1981). Estos dos segmentos de ADN pueden ser transferidos al genoma de la planta independientemente uno del otro, o ser transferidos como un segmento continuo de ADN colineal con la región *T* presente en el plásmido Ti. Los plásmidos productores de nopalina, como el pTiC58 y pTiT37, siempre transfieren un segmento único de ADN de aproximadamente 23 kb (Lemmers *et al.*, 1980; Hepburn *et al.*, 1983; Ursic *et al.*, 1983) (Ver figura 1).

Las regiones *T* de los plásmidos productores de octopina y de nopalina son expresados en las células vegetales, codificando varios transcritos poliadenilados, los cuales son transcritos por la ARN polimerasa II de la planta (Willmitzer *et al.*, 1981, 1982, 1983; Bevan y Chilton, 1982). La posición de estos transcritos fue "mapeada" por hibridación con diferentes sondas de la región *T* y la dirección de la transcripción se identificó por hibridación con ambas cadenas del fragmento correspondiente de la región *T*. Seis de estos transcritos (5, 2, 1, 4, 6a y 6b) son homólogos de ambos ADN-T y están codificados por un segmento de ADN de 9 kb común a ambos ADN-T productores de octopina y nopalina (Chilton *et al.*, 1978; Depicker *et al.*, 1978; Engler *et al.*, 1981; Willmitzer *et al.*, 1983) (fig. 2). Comparados con otros transcritos celulares,

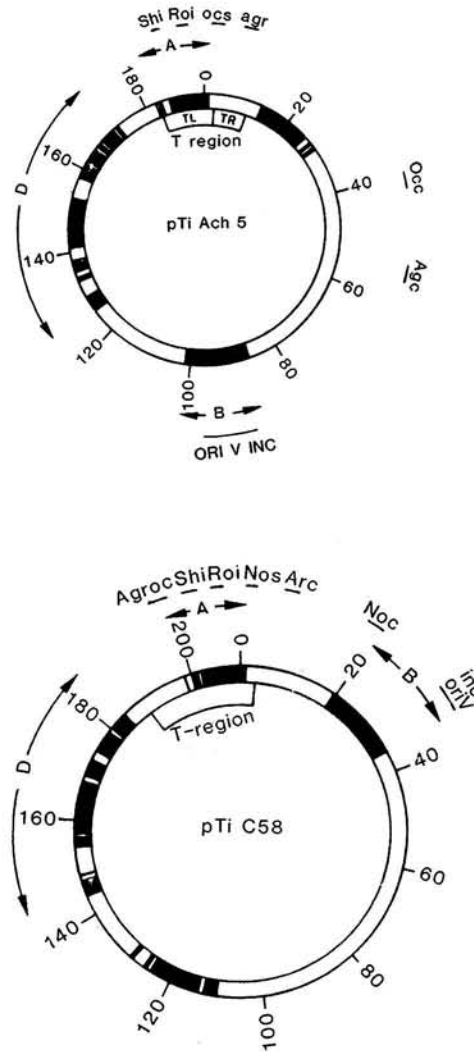


FIG. 1. Organización funcional de los plásmidos de octopina pTiAch5 y de nopalina pTiC58. Los números indican el tamaño de cada plásmido en kb. Las barras negras representan las regiones de homología entre dos plásmidos, como han sido descritas por Engler *et al.*, (1981). *Shi* y *Roi* indican la posición de los sitios implicados en la inhibición de la formación de retoños o raíces respectivamente. Los genes responsables de la síntesis de opina están indicados como *ocs* (octopina sintetasa), *agroC* (agrocina sintetasa), *agr* (agropina sintetasa) y *nos* (nopalina sintetasa). La región que contiene los genes implicados en el catabolismo de octopina o nopalina están indicados respectivamente por *occ* y *noc*. La región D o Vir tiene largos segmentos de homología entre ambos plásmidos y es la región esencial para la virulencia de la *Agrobacterium*. De Greve *et al.*, (1981) y Holsters *et al.*, (1980) ofrecen un mapa más detallado y la descripción de estos plásmidos.

los transcritos del ADN-T contribuyen con no más de  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  del contenido total de la población de ARN poli (A) ; sin embargo la expresión de los genes de ADN-T tiene un efecto dramático en la fisiología y en el fenotipo del tejido transformado. Al menos tres de estos transcritos parecen ser directamente responsables del comportamiento del crecimiento tumoral de las células transformadas.

El análisis de las células vegetales transformadas por inserción de transposón y por mutantes de delección de la región ADN-T del plásmido Ti, estableció una correlación entre el fenotipo del tumor y la actividad de algunos de los genes que codifican los diferentes transcritos de ADN-T. Los tumores de la corona normales crecen como tejidos no organizados. Las mutaciones en los genes 1 y 2 inducen tumores que producen abundantes retoños indicando que estos genes codifican funciones que suprimen la formación de retoños en los tumores salvajes (Shi; ver figura 2). Los plásmidos Ti con mutaciones en el gen 4 inducen tumores que muestran como característica una proliferación desproporcionada de la raíz indicando que el gen 4 codifica una función que bloquea la capacidad normal de la célula vegetal para sufrir diferenciación con vistas a la formación de raíces (Roi; figura 2) (Garfinkel *et al.*, 1981; Leemans *et al.*, 1982; Joos *et al.*, 1983a).

Se ha demostrado que otros genes del ADN-T codifican las enzimas responsables de la síntesis de la opina. Tal es el caso de la sintetasa de nopalina (Holsters *et al.*, 1980), de la sintetasa de la agrocinopina (Joos *et al.*, 1983a) ambos en el pTiC58, y de la sintetasa de octopina y agropina en el pTiAch5 y pTiB6S3 (De Greve *et al.*, 1981; Salomón *et al.*, 1984). Aunque hay algunos otros genes que se transcriben, no ha sido posible correlacionar sus mutantes con un cambio fácilmente detectable en el fenotipo del tumor correspondiente. Sin embargo, parece factible que algunos de ellos influyan en el fenotipo del tumor. Por ejemplo, los mutantes en el gen 1 ó 2 de los plásmidos de octopina, inducen tumores que germinan retoños normales derivados de células no transformadas, en contraste con mutantes similares en plásmidos de nopalina que inducen tumores con retoños fundamentalmente anormales conteniendo opiná (Leemans *et al.*, 1982; Joos *et al.*, 1983a). Estas diferencias pueden deberse posiblemente a la presencia de los transcritos *a-e* en los ADN-T de nopalina (fig. 2) que están ausentes en los ADN-T de octopina, o bien deberse a diferencias en los niveles de transcripción de los genes homólogos en ambos plásmidos que han sido correlacionados con la formación de tumores.

Una de las conclusiones principales de los estudios, utilizando mutantes de delección, es que ninguno de los genes codificados por el ADN-T es esencial para transferir o integrar el ADN-T. La transferencia de ADN-T ocurrió con todos los mutantes probados, incluso con aquellos que fueron incapaces de inducir formación de tumores. En este último caso, utilizando mutantes de plásmidos Ti con una gran delección que elimina la mayor parte interna del ADN-T y que contenía sólo uno de los genes que codifica la síntesis de opina y los extremos del ADN-T, se encontró que las células del lugar de la lesión eran aún capaces de sintetizar opinas, indicando ello que había ocurrido transferencia e integración de ADN-T (Leemans *et al.*, 1982; Joos *et al.*, 1983a; Zambryski *et al.*, 1983).

Por analogía con lo que se conoce de los reguladores del crecimiento de las plantas, la función del gen 4 puede correlacionarse con un efecto de tipo citoquinina. Por tanto, un mutante en el gen 4 resultaría en un bajo nivel de citoquinina, mientras que el nivel de auxinas se elevaría por la expresión de los genes 1 y 2, y por ello se formarían raíces y proliferarían éstas. De modo similar, los efectos combinados de los genes 1 y 2 pueden correlacionarse con un efecto de tipo auxínico, de modo que los mutantes en estos genes implicarían la formación de retoños a causa de la expresión del gen 4 solo (Skoog y Miller, 1957) (fig. 2).

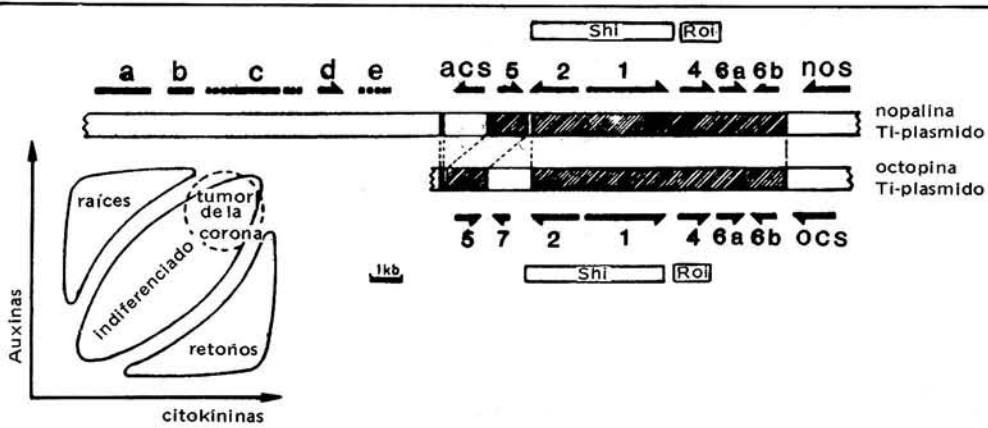


FIG. 2. Mapa transcripcional de los ADN-T de nopalina y de octopina. Las regiones de homología entre dos ADN-T (regiones comunes) están marcadas como áreas oscuras. La posición, longitud y dirección de los transcritos de ADN-T es como fue descrita por Willmitzer *et al.*, 1982, 1983. Los transcritos 1, 2, 3, 4, 5, 6a y 6b son comunes a ambos ADN-T. *Shi* indica los transcritos que controlan la inhibición de retoños; *Roi* indica el transcripto que controla la inhibición de raíces; *nos*, la nopalina sintetasa; *ocs*, la octopina sintetasa; *acs*, la agrocinopina sintetasa. El diagrama de la relación auxina/citocinina es una representación esquemática de cómo el balance hormonal puede influir en la morfología del callo tal como fue descrito por Skoog y Miller (1957).

Recientemente se ha demostrado que los genes 1 y 2 codifican las enzimas implicadas en la ruta metabólica de la producción de auxinas. Se ha demostrado que el gen 2 es expresado no sólo en las células vegetales, sino también en *E. coli* y *Agrobacterium*. En bacterias, este gen codifica para una proteína de 49 000 dalton, capaz de convertir la indol-3-acetamida en ácido indol-3-acético, que es la auxina natural activa presente en las plantas. Cuando se analizaron los tejidos de plantas independientes de hormonas no transformados y los tumores de la corona, se encontró que la conversión de la indol-3-acetamida en el ácido indol-3-acético es específica del tejido transformado por el ADN-T (Schröder *et al.*, 1983, 1984). Evidencias posteriores, apoyando el papel de los genes 1 y 2 en la producción de auxinas, se derivaron de experimentos que demuestran que la adición externa de auxina sintética, en particular el ácido alfa naftalen acético, restablece el fenotipo salvaje de los tumores inducidos por mutantes en el gen 1 ó 2, probablemente restableciendo el alto nivel de auxinas normalmente presentes en los tumores de la corona. También se encontró que la alfa naftalen acetamida, que es un compuesto químico sin actividad hormonal, puede restablecer el fenotipo de los mutantes del gen 1, pero no en mutantes del gen 2, indicando ello que la proteína codificada por el gen 2 participa en la conversión de la alfa naftalen acetamida en la auxina biológicamente activa, presumiblemente el ácido naftalen acético (ANA). El hecho que el ANA, pero no la alfa naftalen acetamida, pueda también restablecer el fenotipo de los mutantes en el gen 2, sugiere que el gen 1 está implicado en un paso temprano en la ruta de la producción de auxinas presentes en los tumores de la corona (Inzé *et al.*, 1984). Como el sustrato propuesto para la enzima codificada por el gen 2 (indol-3-acetamida) no se encuentra presente normalmente en las células vegetales (Schröder, *et al.*, 1984) el gen 1 es un candidato razonable para la producción de tal sustrato. Al reunir todos estos resultados, se sugiere que el gen 2 codifica para una amino hidrolasa directamente implicada en la biosíntesis de las auxinas. Como dato destacable, este gen aparece

expresado tanto en la *Agrobacterium* como en las células vegetales. Esta es la primera indicación de que el ADN-T induce la formación del tumor mediante la introducción de una nueva ruta enzimática en el tejido vegetal, la cual probablemente no es controlada por el mecanismo regulador del hospedero y que resulta en la formación de factores estimuladores del crecimiento (Schröder *et al.*, 1984). Resulta interesante igualmente que una actividad enzimática similar a la codificación por el gen 2 se ha encontrado en la *Seudomonas savastanoi* (Comai y Kosuge, 1982), una bacteria que también puede inducir crecimiento tumoral en algunas plantas.

## INTEGRACION DEL ADN-T

El mecanismo por el cual la *Agrobacterium* transfiere el ADN-T al genoma de la célula vegetal aún no se conoce. Probablemente, la interacción de la *Agrobacterium* con las células vegetales competentes, inicia una serie de sucesos que quizás conducen a la activación específica de genes tanto en la bacteria como en el hospedero. Para comprender cómo ocurre la transferencia del ADN-T, primero es necesario localizar precisamente las regiones del plásmido Ti que se integran dentro del genoma de la planta y determinar cuáles de ellas son esenciales para la transferencia e integración de esta región.

Se han analizado en detalle cuatro líneas tumorales inducidas por el plásmido Ti productor de nopalina (Zambryski *et al.*, 1982). Los datos obtenidos de estos análisis demuestran que existe poca variación del ADN-T integrado en el genoma de las diferentes líneas tumorales analizadas. Algunas de estas líneas tumorales parecen tener una copia única del ADN-T, mientras que otras tienen copias múltiples; de ellas algunas aparecen organizadas en sucesión. El clonaje molecular de los extremos del ADN-T del genoma de células vegetales transformadas demostró que algunos fragmentos de ADN contienen secuencias derivadas sólo del extremo izquierdo o del extremo derecho del ADN-T, mientras que otros contienen secuencias derivadas de ambos extremos. Ello confirma la presencia de copias en sucesión del ADN-T en las células transformadas (Zambryski *et al.*, 1980; Yadav *et al.*, 1982; Holsters *et al.*, 1983).

La determinación de la secuencia de nucleótidos en los fragmentos de unión ha permitido conocer con precisión los extremos del ADN-T presentes en el genoma. En todos los casos, la homología entre las secuencias en el ADN tumoral y en el ADN presente en el plásmido Ti, terminan en o cerca de una región de 25 pares de bases adyacentes a la región T en el plásmido Ti como secuencias repetidas en la misma dirección (Simpson *et al.*, 1982; Yadav *et al.*, 1982; Zambryski *et al.*, 1982; Holsters *et al.*, 1983). Dentro de estos 25 pares de bases de esta secuencia repetida, 12 pares de bases muestran total homología y el resto una homología imperfecta (fig. 3). Estas secuencias terminales repetidas están no sólo presentes en los terminales de la región T de los plásmidos productores de nopalina, sino también en los terminales de la región T izquierdos (TL) y derechos (TR) del plásmido productor de octopina (Holsters *et al.*, 1983; Barker *et al.*, 1983) (fig. 3). La figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos de los 25 pares de bases presentes en la ADN-T de nopalina y octopina. El análisis de los extremos TL de octopina reclonados a partir de células transformadas, muestra que la integración de TL es bastante similar a la encontrada para el ADN-T de nopalina, incluida la presencia de copias múltiples de ADN-T dispuestos en sucesión. El análisis detallado de una de las uniones entre dos copias de ADN-T en sucesión muestra que la unión consiste en una unidad de 40 pares de bases de origen vegetal repetido 6 veces. La presencia de ADN vegetal entre las copias de ADN-T sucesivas sugiere que la generación de ellas en este tumor particular tuvo lugar durante la inserción de una copia original del ADN-T en el genoma de la planta o después de ella (Holsters *et al.*, 1983).

GCTGG	TGGCAGGATATATTG	TG	GTGTA AAC	AAATT	Nopalina L
GTGTT	TGACAGGATATATTG	GC	GGGTA AAC	CTAAG	Nopalina R
AGCGG	CGGCAGGATATATTC	AA	TTGTAAAT	GGCTT	Octopina A
CTGAC	TGGCAGGATATATAC	CG	TTGTAAT	TGAGC	Octopina B
AAAGG	TGGCAGGATATATCG	AG	GTGTA AAA	TATCA	Octopina C
ACTGA	TGGCAGGATATATGC	GG	TTGTAAT	CATTT	Octopina D

FIG. 3. Comparación de la secuencia terminal de 25 pares de bases en los ADN-T de octopina y en los ADN-T de plásmidos Ti de octopina y nopalina. Las cajas indican las regiones con alto grado de homología entre estas repeticiones terminales. Los dos pares de bases dentro de las cajas no son conservados. La nopalina L (izquierda) y R (derecha) son las repeticiones en los extremos del ADN-T de los plásmidos tipo nopalina pTiC58 o pTiT37. Octopina A/B y C/D (izquierda/derecha) representa las repeticiones terminales de las regiones TL o TR, respectivamente, presente en el plásmido Ti de tipo octopina pFiAch5 y pTi15955 (datos de Zambryski *et al.*, 1982; Yadav *et al.*, 1982; Simpson *et al.*, 1982; Holsters *et al.*, 1983; Barker *et al.*, 1983).

La búsqueda efectuada en dos bancos de datos de secuencias nucleotídicas reveló que los 12 pares de bases de homología total dentro de los 25 pares de bases de los extremos repetidos del ADN-T solamente se encuentra presente en el plásmido Ti, pero no en ninguna otra secuencia de ADN conocida hasta ahora (Barker *et al.*, 1983). Se ha encontrado que el extremo derecho del ADN-T en la planta aparece, ya sea en la primera base o una base antes de la secuencia repetida de 25 nucleótidos en al menos tres líneas tumorales diferentes. El límite izquierdo del ADN-T integrado parece ser más variable que el derecho, pero de todas maneras este aparece dentro de 100 pares de bases a partir de la secuencia de 25 pares de bases izquierdas (Zambryski *et al.*, 1982).

Aunque la secuencia de 25 pares de bases está presente en ambos extremos del ADN-T, el análisis genético utilizando mutantes de delección ha demostrado que los terminales del ADN-T son funcionalmente distintos. La delección del extremo derecho del ADN-T de nopalina hace al plásmido Ti virtualmente avirulento en la mayoría de las especies vegetales, sin embargo, en contraste con ello, las delecciones del extremo izquierdo tienen poco o ningún efecto en la transferencia y en la integración del ADN-T (Joos *et al.*, 1983a).

Recientemente, un conjunto de experimentos ha demostrado que el extremo derecho del ADN-T de nopalina es suficiente para dirigir la transferencia e integración de las secuencias bacteriales en el genoma de la planta. Se encontró que el gen de la sintetasa de nopalina que está unido al extremo derecho del ADN-T puede ser transferido eficientemente, aun cuando se inserte en una parte diferente del plásmido Ti, o cuando se inserte en un replicón independiente (A. Caplan, comunicación personal).

Se introdujeron marcadores seleccionables dominantes unidos al extremo derecho del ADN-T entre los extremos normales del ADN-T (Herrera-Estrella, 1984)\*. Este produjo un ADN-T con dos extremos externos en orientación normal y con un marcador seleccionable unido a la secuencia del extremo derecho, que quedaba en posición invertida en la construcción. En estos experimentos se observó que el marcador seleccionable se integra en el genoma de la planta a una frecuencia alta sin estar unido al resto del ADN-T. Esto confirma que el extremo derecho puede dirigir la transferencia de ADN independientemente de su orientación y que la transferencia o la integración es direccional, de modo que en relación con la orientación normal

del extremo derecho, las secuencias a su izquierda siempre serán transferidas e integradas. Estos experimentos, en unión con las diferencias observadas entre el extremo izquierdo y el derecho, sugieren que la secuencia reconocida como extremo derecho del ADN-T también dirige la transferencia de ADN de la bacteria a la planta o bien que actúa como punto de partida del proceso de integración replicativa.

También se ha demostrado que para su transferencia el ADN-T no necesita estar unido físicamente a la región *Vir*. La formación de tumor por *Agrobacterium* conteniendo dos plásmidos compatibles, uno que contiene la región *Vir* y el otro el ADN-T, es indistinguible de la formación del tumor por *Agrobacterium* que contiene el plásmido Ti salvaje. Sin embargo, la *Agrobacterium* que contiene sólo uno de estos plásmidos no es oncogénica. Esto demuestra que la región *Vir* actúa de forma trans en relación con las funciones necesarias para la transferencia de ADN-T (De Framond *et al.*, 1983; Hoekema *et al.*, 1983). Se encontró que la región *Vir* de octopina puede complementar con el ADN-T de nopalina y viceversa. Ello demuestra que no existen funciones de virulencias específicas a plásmidos.

Hay varias hipótesis que pueden explicar cómo se efectúa el proceso actual de transferencia del ADN-T. Una posibilidad es que la región *T* es separada del plásmido Ti en la *Agrobacterium* durante el proceso de infección; en esta hipótesis, la región *T* se separaría mediante enzimas que están probablemente codificadas por la región *Vir* y que reconocerían específicamente los extremos de ADN-T. Como sólo la región del ADN-T entra en la célula vegetal y ninguno de sus genes están implicados en la integración, entonces el hospedero debe proveer las funciones necesarias para efectuar la integración. Una segunda hipótesis sugiere que el plásmido Ti completo entra en la célula vegetal, y que después que el ADN-T ha sido insertado dentro del cromosoma, el resto del plásmido Ti se pierde. En este caso, las funciones necesarias para la escisión precisa y la integración del ADN-T son proveídas por la planta hospedera y reconocen específicamente los extremos del ADN-T, o parte de la región *Vir* es expresada de forma transitoria en el vegetal, proveyendo las funciones necesarias para efectuar la inserción del ADN-T dentro del genoma de la planta.

Como la región *Vir* y el ADN-T no necesitan estar unidos físicamente en el mismo replicón para permitir la transferencia de ADN-T, esto sugiere que para la integración de ADN-T no se requiera la transferencia de todo el plásmido Ti en la célula vegetal, a menos que partes de más de un replicón puedan entrar en el hospedero. Sin embargo, se ha demostrado que, con cierta frecuencia, segmentos mayores que el ADN-T, o todo el plásmido Ti pueden entrar en la célula vegetal (Joos *et al.*, 1983b).

Uno puede asumir que los extremos del ADN-T derechos sirven como origen de transferencia, y que la transferencia continúa hasta que se alcance una segunda señal para la terminación de la transferencia; esta señal es el extremo izquierdo. Como el extremo izquierdo tiene una señal menos exacta, también pudiera asumirse que algunas veces la transferencia no termina en el extremo izquierdo y que prosigue, permitiendo que otras partes del plásmido Ti entren en la célula vegetal.

Muchas mutaciones en la región *Vir* disminuyen o eliminan la oncogenicidad del plásmido Ti. Los estudios de complementación utilizando clones de cósmidos que solapan estas mutaciones, han demostrado que los genes *Vir* están agrupados en 10 grupos de complementación (Klee *et al.*, 1982, 1983), y si asumimos que el cósmido no es transferido al hospedero, esto sugiere que la mayoría, o todos los genes codificados por la región *Vir*, son funcionales en la bacteria. Se sabe que cuando una planta está coinfectada en la misma lesión con bacterias que contienen dos plásmidos Ti diferentes, el ADN-T de ambos plásmidos puede integrarse en



la misma célula (Ooms *et al.*, 1982). Cuando se utilizaron diferentes mutantes *Vir* para coinfectar la misma lesión, no pudieron complementarse recíprocamente (Iyer *et al.*, 1982). Ello sugiere primero que ninguno de los productos de la región *Vir* se difunde rápidamente dentro de la bacteria, y también sugiere que si el plásmido Ti íntegro entra en la célula vegetal, la región *Vir* no se expresa allí, pues las mutaciones no pueden complementarse recíprocamente.

## TRANSFERENCIA DE SECUENCIAS DE ADN FORANEO EN LAS CELULAS VEGETALES

Una vez que se estableció firmemente que la interacción entre la *Agrobacterium* y la célula vegetal lesionada resulta en la transferencia de un segmento del plásmido Ti (ADN-T) dentro del genoma de la célula de la planta, se planteó entonces la necesidad de investigar si otras secuencias de ADN insertadas experimentalmente dentro del ADN-T pudieran ser eficientemente cotransferidas. El análisis genético de la región *T* mediante mutagénesis con transposones, proveyó mutantes de plásmidos Ti con secuencias bacterianas insertadas en la región *T*, que hicieron posible probar esta hipótesis. Una inserción Tn7 en el sitio de la sintetasa de nopalina produjo un mutante del plásmido Ti aún capaz de transferir ADN-T. El análisis de ADN de estos tumores demostró que toda la región de ADN-T incluida la secuencia de inserto Tn7, ha sido transferida e integrada como un segmento único de  $38 \times 10^3$  pares de bases dentro del genoma de las células de tabaco (Hernalsteens *et al.*, 1980). Desde entonces varias secuencias diferentes de ADN han sido introducidas en diferentes sitios de la región *T* de los plásmidos Ti. El análisis del ADN transferido por estos plásmidos Ti mutados condujo a la conclusión de que probablemente cualquier secuencia del ADN insertada dentro del ADN-T puede ser cotransferida o integrada sin ningún reordenamiento detectable. Hasta ahora no se ha encontrado límite al tamaño de ADN que puede ser transferido e integrado cuando se inserta entre dos extremos de ADN-T. Se han introducido en el genoma del tabaco secuencias de hasta 50 kb como segmentos simples de ADN.

Los primeros intentos para expresar genes foráneos en las plantas, utilizando genes resistentes a antibióticos codificados por los transposones utilizados para efectuar mutagénesis en la región *T*, mostraron que los genes procarióticos no son expresados en las células vegetales, presumiblemente porque las señales transcripcionales procarióticas de estos genes no son reconocidas por la maquinaria transcripcional del vegetal. Se hicieron otros intentos de expresar genes heterólogos en las plantas, utilizando genes de otros organismos eucarióticos, tales como el gen de la deshidrogenasa alcohólica de levadura (Barton *et al.*, 1983), o genes de células de mamíferos, tales como la  $\beta$ -globina, el interferón, y genes bajo control del promotor SV40\*. El análisis de los ARN mensajeros de los tejidos que contienen genes reveló que ninguno de ellos se expresó.

Ello sugiere que los factores específicos o las señales requeridas para su expresión, están presentes sólo en las células o tejidos específicos de su hospedero original y que no se encuentran presentes en las células vegetales. Esto puede correlacionarse con proteínas que puedan interactuar con segmentos específicos de ADN en la región del promotor, tales como los amplificadores (Benoist y Chambon, 1981), o las secuencias que determinan expresión diferencial o expresión específica tisular, tal como ha sido demostrado para algunos genes animales (Walker *et al.*, 1983).

\* Resultados de la tesis de Doctorado

En esta estrategia resultó obvio que el requisito esencial para la expresión de los genes heterólogos en las plantas es el de utilizar la señal transcripcional de un gen que se conoce, que puede ser expresado en plantas. La mayoría de los genes vegetales clonados hasta ahora son altamente regulados y se expresan solamente en una etapa particular del desarrollo de la planta. Por ejemplo, las familias de genes que codifican para las proteínas de almacenamiento del maíz o frijol, sólo se expresan durante la formación de semillas y las leghemoglobinas sólo se inducen durante la interacción entre las leguminosas y el *Rhizobium* (Geraghty *et al.*, 1981; Brisson y Verma, 1982; Wiborg *et al.*, 1982; Pedersen *et al.*, 1982). Los mejores candidatos para los genes constitutivos expresados resultaron ser los codificados por el ADN-T, particularmente los que codifican la nopalina o la octopina sintetasa. Se ha demostrado que estos genes se expresan normalmente tanto en tejido de callos como en todos los tejidos diferenciados de las plantas que han sido regenerados a partir de los callos que contienen genes de opina (De Greve *et al.*, 1982a; Wöstemeyer *et al.*, 1983).

Las secuencias nucleotídicas de los genes de nopalina sintetasa y de octopina sintetasa, así como otros genes de ADN-T, revelaron que ellos tienen señales potenciales transcripcionales bastante similares a las secuencias consensuales que son importantes para la señal de inicio y de terminación de la transcripción de otros genes eucarióticos. En la región del extremo 5' los genes contienen secuencias homólogas a la caja TATA o a la caja Goldberg-Hogness, con 30 a 40 nucleótidos por encima del inicio de la transcripción y con una secuencia similar a la caja CAT, con 60 u 80 nucleótidos por encima del terminal 5' del transcripto. Además, ellos poseen secuencias similares a la AATAAA entre 20-100 nucleótidos en dirección 5' al sitio de poliadenilación, la cual es muy semejante a la secuencia consensual encontrada en los genes animales (Depicker *et al.*, 1982; De Greve *et al.*, 1982b; Bevan *et al.*, 1983; Barker *et al.*, 1983; Gielen *et al.*, 1984).

Por lo demás, la mayoría de la información referente a las señales transcripcionales utilizadas en las células vegetales ha sido obtenida a partir de estudios que utilizan genes codificados en la ADN-T. Así se ha podido demostrar que para los genes *ocs*, las secuencias anteriores a la posición -170, a partir del sitio de inicio de la transcripción, son esenciales para la transcripción eficiente de este gen. El promotor *ocs* funcional está situado dentro de las 294 pares de bases de la región 5' del punto de inicio de la transcripción (Koncs *et al.*, 1983).

El gen *ocs* produce transcriptos que son poliadenilados en una de las dos posiciones de la región 3' no traducida de este gen, aunque se encontró que el transcripto mayor era el más abundante. Se encontró que un mutante del *ocs* con delección en la región 3' no traducida es aún activo. Esta delección termina 19 pares de bases anterior al sitio de mayor poliadenilación dentro del transcripto salvaje, eliminando la señal AATAAA que precede este sitio. El gen mutante *ocs* produce transcriptos con una cola poliadenilada añadida a cuatro posiciones diferentes (Dhaese *et al.*, 1983). El más abundante de estos transcriptos es poliadenilado en la misma posición que el menor en el gen salvaje. Todos estos resultados sugieren que la señal AATAAA en las plantas está implicada fundamentalmente en el proceso post-transcripcional de los transcriptos, de modo similar a lo que se encontró previamente en las células animales.

(1) Este trabajo forma parte de la tesis de Doctorado en Ciencias presentada por el autor en 1984.

## REFERENCIAS

- BARKER, R. F.; K. B. IDLER; D. V. THOMPSON y J. D. KEMP (1983). *Nucleotide sequence of the T-DNA region from the Agrobacterium tumefaciens octopine Ti plasmid pTi15955*. Plant Mol. Biol. **2**, 335-350.
- BARTON, K. A.; A. N. BINNS; A. J. M. MATZKE y M. D. CHILTON (1983). *Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny*. Cell **32**, 1033-1043.
- BENOIST, C. y P. CHAMBON (1981). *In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region*. Nature (London) **290**, 304-310.
- BEVAN, M. W. y M. D. CHILTON (1982). *Multiple transcripts of T-DNA detected in nopaline crown gall tumors*. J. Mol. Appl. Genet. **1**, 539-546.
- BEVAN, M.; W. M. BARNES y M. D. CHILTON (1983). *Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA*. Nucl. Acids Res. **11**, 369-385.
- BRAUN, A. C. (1943). *Studies on tumor inception in crown gall disease*. Amer. J. Bot. **30**, 674-677.
- BRAUN, A. C. (1978). *Plan tumours*. Biochim. Biophys. Acta **516**, 167-191.
- BRAUN, A. C. (1982). *A history of the crown gall problem*. En: "Molecular Biology of Plant Tumors" (Eds. G. Kahl y J. Schell). New York, Academic Press, 155-210.
- BRISSON, N. y D. P. VERMA (1982). *Soybean leghemoglobin gene family: normal, pseudo, and truncated genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4055-4059.
- CHILTON, M. D.; H. J. DRUMMOND; D. J. MERLO; D. SCIAKY; A. L. MONTOYA; M. P. GORDON y E. W. NESTER (1977). *Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis*. Cell **11**, 263-271.
- CHILTON, M. D.; M. H. DRUMMOND; D. J. MERLO y D. SCIAKY (1978). *Highly conserved DNA of Ti-plasmids overlaps T-DNA, maintained in plant tumors*. Nature (London) **275**, 147-149.
- CHILTON, M. D.; R. K. SAIKI; N. YADAV; M. P. GORDON y F. QUETIER (1980). *T-DNA from Agrobacterium Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4060-4064.
- COMAI, L. y T. KOSUGE (1982). *Cloning and characterization of iaaM, a virulence determinant of Pseudomonas savastanoi*. J. Bacteriol. **149**, 40-46.
- DE BEUCKELEER, M.; M. LEMMERS; G. DE VOS; L. WILLMITZER; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1981). *Further insight on the transferred-DNA of octopine crown gall*. Mol. Gen. Genet. **183**, 283-288.
- DE BLOCK, M.; L. HERRERA-ESTRELLA; M. VAN MONTAGU; J. SCHELL y P. ZAMBRYSKI (1984). *Expression of foreign genes in regenerated plants*. Nature (London), submitted.
- DE FRAMOND, A. J.; K. A. BARTON y M. D. CHILTON (1983). *Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering*. Bio/technology **1**, 262-269.
- DE GREVE, H.; H. DECRAEMER; J. SEURINCK; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1981). *The functional organization of the octopine Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiB6S3*. Plasmid **6**, 235-248.
- DE GREVE, H.; J. LEEMANS; J. P. HERNALSTEENS; L. THIA-TOONG; M. DE BEUCKELER; L. WILLMITZER; L. OTTEN; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1982a). *Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions*. Nature (London) **300**, 752-755.

- DE GREVE, H.; P. DHAESE; J. SEURINCK; M. LEMMERS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1982b). *Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene*. J. Mol. Appl. Genet. **1**, 499-512.
- DEPICKER, A.; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1978). *Homologous DNA sequences in different Ti-plasmids are essential for oncogenicity*. Nature (London) **275**, 150-153.
- DEPICKER, A.; S. STACHEL; P. DHAESE; P. ZAMBRYSKI y H. M. GOODMAN (1982). *Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence*. J. Mol. Appl. Genet. **1**, 561-574.
- DHAESE, P.; H. DE GREVE; J. GIELEN; J. SEURINCK; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983). *Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using Agrobacterium T-DNA genes as models*. EMBO J. **2**, 419-426.
- ELLIS, J. G. y P. J. MURPHY (1981). *Four new opines from crown gall tumours - their detection and properties*. Mol. Gen. Genet. **181**, 36-43.
- ENGLER, G.; A. DEPICKER; R. MAENHAUT; R. VILLARROEL-MANDIOLA; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1981). *Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti-plasmid of Agrobacterium tumefaciens*. J. Mol. Biol. **152**, 183-208.
- FIRMIN, J. L. y G. R. FENWICK (1978). *Agropine -- a major new plasmid -- determined metabolite in crown gall tumours*. Nature (London) **276**, 842-844.
- GARFINKEL, D. J.; R. B. SIMPSON; L. W. REAM; F. F. WHITE; M. P. GORDON y E. W. NESTER (1981). *Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis*. Cell **27**, 143-153.
- GERAGHTY, D.; M. A. PEIFER; I. RUBENSTEIN y J. MESSING (1981). *The primary structure of a plant storage protein: zein*. Nucl. Acids Res. **9**, 5163-5174.
- GIELEN, J.; M. DE BEUCKELEER; J. SEURINCK; F. DEBOECK; H. DE GREVE; M. LEMMERS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1984). *The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5*. EMBO J. **3**, 835-846.
- HEPBURN, A. G.; L. E. CLARKE; K. S. BLUNDY y J. WHITE (1983). *Nopaline Ti plasmid, pTiT37, T-DNA insertions into a flax genome*. J. Mol. Appl. Genet. **2**, 211-224.
- HERNALSTEENS, J. P.; F. VAN VLIET; M. DE BEUCKELEER; A. DEPICKER; G. ENGLER; M. LEMMERS; M. HOLSTERS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1980). *The Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells*. Nature (London) **287**, 654-656.
- HOEKEMA, A.; P. R. HIRSCH; P. J. J. HOOYKAAS y R. A. SCHILPEROORT (1983). *A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid*. Nature (London) **303**, 179-181.
- HOLSTERS, M.; B. SILVA; F. VAN VLIET; C. GENETELLO; M. DE BLOCK; P. DHAESE; A. DEPICKER; D. INZE; G. ENGLER; R. VILLARROEL; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1980). *The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58*. Plasmid **3**, 212-230.
- HOLSTERS, M.; R. VILLARROEL; J. GIELEN; J. SEURINCK; H. DE GREVE; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983). *An analysis of the boundaries of the octopine TL-DNA in tumors induced by Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. **190**, 35-41.
- INZE, D.; A. FOLLIN; M. VAN LIJSEBETTENS; C. SIMOENS; C. GENETELLO; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1984). *Genetic analysis of the individual T-DNA genes of Agrobacterium tumefaciens; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis*. Mol. Gen. Genet. **194**, 265-274.

- IYER, V. N.; H. J. KLEE y E. W. NESTER (1982). *Units of genetic expression in the virulence region of a plant tumor-inducing plasmid of Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. **188**, 418-424.
- JOOS, H.; D. INZE; A. CAPLAN; M. SORMANN; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983a). *Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls*. Cell **32**, 1057-1067.
- JOOS, H.; B. TIMMERMAN; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983b). *Genetic analysis of transfer and stabilization of Agrobacterium DNA in plant cells*. EMBO J. **2**, 2151-2160.
- KLEE, H. J.; M. P. GORDON y E. W. NESTER (1982). *Complementation analysis of Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid mutations affecting oncogenicity*. J. Bacteriol. **150**, 327-331.
- KLEE, H. J.; F. F. WHITE; V. N. IYER; M. P. GORDON y E. W. NESTER (1983). *Mutational analysis of the virulence region of an Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid*. J. Bacteriol. **153**, 878-883.
- KONCZ, C.; H. DE GREVE; D. ANDRE; F. DEBOECK; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983). *The octopine synthase genes carried by Ti plasmids contain all signals necessary for expression in plants*. EMBO J. **2**, 1597-1603.
- LEEMANS, J.; R. DEBLAERE; L. WILLMITZER; H. DE GREVE; J. P. HERNALSTEENS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1982). *Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls*. EMBO Journal **1**, 147-152.
- LEMMERS, M.; M. DE BEUCKELEER; M. HOLSTERS; P. ZAMBRYSKI; A. DEPICKER; J. P. HERNALSTEENS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1980). *Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours*. J. Mol. Biol. **144**, 353-376.
- OOMS, G.; L. MOLENDIJK y R. A. SCHILPEROORT (1982). *Double infection of tobacco plants by two complementing octopine T-region mutants of Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. **1**, 217-226.
- PEDERSEN, K.; J. DEVEREUX; D. R. WILSON; E. SHELDON y B. A. LARKINS (1982). *Cloning and sequence analysis reveal structural variation among related zein genes in maize*. Cell **29**, 1015-1026.
- SALOMON, F.; R. DEBLAERE; J. LEEMANS; J. P. HERNALSTEENS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1984). *Genetic identification of functions of TR-DNA transcripts in octopine crown galls*. EMBO J. **3**, 141-146.
- SCHRODER, G.; W. KLIPP; A. HILLEBRAND; R. EHRING; C. KONCZ y J. SCHRODER (1983). *The conserved part of the T-region in Ti-plasmids expresses four proteins in bacteria*. EMBO J. **2**, 403-409.
- SCHRODER, G.; S. WAFFENSCHMIDT; E. W. WEILER y J. SCHRODER (1984). *The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid*. Eur. J. Biochem. **138**, 387-391.
- SIMPSON, R. B.; P. J. O'HARA; W. KROOK; A. L. MONTOYA; C. LICHTENSTEIN; M. P. GORDON y E. W. NESTER (1982). *DNA from the A6S/2 crown gall tumors contains scrambled Ti-plasmid sequences near its junctions with the plant DNA*. Cell **29**, 1005-1014.
- SKOOG, F. y C. O. MILLER (1957). *Chemical regulation of growth and origin formation in plant tissues cultured in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. **11**, 118-131.
- TATE, M. E.; J. G. ELLIS; A. KERR; J. TEMPE; K. MURRAY y K. SHAW (1982). *Agropine: a revised structure*. Carbohid. Res. **104**, 105-120.

- TEMPE, J. y A. PETIT (1982). *Opine utilization by Agrobacterium*. En: "Molecular Biology of Plant Tumors, (Eds. G. Kahl y J. Schell). New York, Academic Press, 451-459.
- THOMASHOW, M. F.; R. NUTTER; A. L. MONTOYA; M. P. GORDON y E. W. NESTER (1980). *Integration and organisation of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors*. Cell **19**, 729-739.
- URSIC, D.; J. L. SLIGHTOM y J. D. KEMP (1983). *Agrobacterium tumefaciens T-DNA integrates into multiple sites of the sunflower crown gall genome*. Mol. Gen. Genet. **190**, 494-503.
- VAN LAREBEKE, N.; G. ENGLER; M. HOLSTERS; S. VAN DEN ELSACKER; I. ZAENEN; R. A. SCHILPEROORT y J. SCHELL (1974). *Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability*. Nature (London) **252**, 169-170.
- WALKER, M. D.; T. EDLUND; A. M. BOULET y W. J. RUTTER (1983). *Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes*. Nature (London) **306**, 557-561.
- WATSON, B.; T. C. CURRIER; M. P. GORDON; M. D. CHILTON y E. W. NESTER (1975). *Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. **123**, 255-264.
- WIBORG, O.; J. HYLDIG-NIELSEN; E. JENSEN; K. PALUDAN y K. MARCKER (1982). *The nucleotide sequences of two leghemoglobin genes from soybean*. Nucl. Acids Res. **10**, 3487-3494.
- WILLMITZER, L.; M. DE BEUCKELEER; M. LEMMERS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1980). *DNA from Ti-plasmid is present in the nucleus and absent from plastids of plant crown-gall cells*. Nature (London) **287**, 359-361.
- WILLMITZER, L.; W. SCHMALENBACH y J. SCHELL (1981). *Transcription of T-DNA in octopine and nopaline crown gall tumours is inhibited by low concentrations of  $\alpha$ -amininitin*. Nucl. Acids Res. **9**, 4801-4812.
- WILLMITZER, L.; G. SIMONS y J. SCHELL (1982). *The TL-DNA in octopine crown gall tumours codes for seven well-defined polyadenylated transcripts*. EMBO J. **1**, 139-146.
- WILLMITZER, L.; P. DHAESE; P. H. SCHREIER; W. SCHMALENBACH; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983). *Size, location, and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; evidence for common transcripts present in both octopine and nopaline tumors*. Cell **32**, 1045-1056.
- WOSTEMEYER, A.; L. OTTEN; H. DE GREVE; J. P. HERNALSTEENS; J. LEEMANS; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983). *Regeneration of plants from crown gall cells*. En: "Genetic Engineering in Eukaryotes", (NATO ASI Series A, Vol. 61) (Ed. P. Lurquin y A. Kleinhofs). New York, Plenum Press, 137-151.
- YADAV, N. S.; J. VANDERLEYDEN; D. R. BENNETT; W. M. BARNES y M. D. CHILTON (1982). *Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 6322-6326.
- ZAENEN, I.; N. VAN LAREBEKE; H. TEUCHY; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1974). *Supercoiled circular DNA in crown gall inducing Agrobacterium strains*. J. Mol. Biol. **86**, 109-127.
- ZAMBRYSKI, P.; M. HOLSTERS; K. KRUGER; A. DEPICKER; J. SCHELL; M. VAN MONTAGU y H. M. GOODMAN (1980). *Tumor DNA structure in plant cells transformed by A. tumefaciens*. Science **209**, 1385-1391.
- ZAMBRYSKI, P.; A. DEPICKER; K. KRUGER y H. GOODMAN (1982). *Tumor induction by Agrobacterium tumefaciens: analysis of the boundaries of T-DNA*. J. Mol. Appl. Genet. **1**, 361-370.