

Efecto del daño con carborundum en la regeneración y expresión transitoria de β -glucuronidasa en diferentes explantes de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247

I. Bermúdez-Caraballoso^{1*}, R. Collado¹, L. R. García¹, N. Veitía¹, D. Torres¹, C. Romero¹, G. Angenon². *Autor para correspondencia

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas (UCLV). Carretera a Camajuní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: idalmis@ibp.co.cu

²Laboratory of Plant Genetics. Vrije Universiteit Brussel. Belgium

RESUMEN

El frijol, presenta serias dificultades para la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, su eficiencia puede aumentar si se realiza una adecuada preparación del explante para la infección. Con el objetivo de determinar el efecto del tratamiento con carborundum a nudos cotiledonales y callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247, en la regeneración y en la expresión transitoria de β -glucuronidasa, se realizó este trabajo. A los tres días de germinadas las semillas maduras se tomó un segmento de tallo de 5-6 mm de longitud con el nudo cotiledonal. Para los callos organogénicos se emplearon fragmentos de 4-5 mm de diámetro, a los siete días del tercer subcultivo. Se conformaron cinco tratamientos con diferentes tiempos de aplicación del carborundum (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 minutos). Los resultados mostraron que la aplicación de una solución de carborundum (0.5g/30ml de agua estéril) en agitación, produjo daños sobre los dos tipos de explantes empleados. Estos resultados permitieron concluir que la aplicación del carborundum durante 1.5 minutos, logró la regeneración de yemas múltiples en al menos un lado del nudo cotiledonal y como promedio 9.68 puntos azules. Sin embargo, en callos organogénicos con el tratamiento por 1.0 minuto, se logró aumentar el número de puntos azules mayores de 1.0 mm sin afectar la posterior regeneración en plantas de los tejidos transformados en esta variedad de frijol.

Palabras clave: callos, frijol, transformación genética

ABSTRACT

Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation is difficult in beans. Efficiency can be improved preparing explants for the infection. The aim of this research was to determine the effect of treatment with carborundum to cotyledon nodes and organogenic callus of *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247 in the regeneration and transient expression of β -glucuronidase. A stem segment of 5-6 mm length, containing the cotyledon node, was taken three days after mature seed germination. Fragments of 4-5 mm diameter on the seventh day after the third subculture were used in the case of organogenic callus. Five treatments at different times for the application of carborundum were studied (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 minutes). Results showed that the application of a carborundum solution (0.5g/30ml of sterile water) in agitation, caused damage on both types of explants used. These results concluded that the application of carborundum for 1.5 minutes achieved at least regeneration of multiple buds and an average 9.68 of blue spots. However, there was an increase GUS positive spot in organogenic callus with a treatment for 1.0 minute, without affecting subsequent plant regeneration of transformed tissues in this variety of beans.

Keywords: beans, calli, genetic transformation

INTRODUCCIÓN

De las leguminosas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica para el consumo humano en América Latina, África y Asia (Delgado-Sánchez *et al.*, 2006; Varisai Mohamed *et al.*,

2006; Gatica *et al.*, 2010). Sin embargo, su producción se ha visto limitada por patógenos fúngicos, bacterianos, virales, insectos, extrema sequía, así como deficiencias nutricionales (Aragao *et al.*, 1996). Por tales razones, es de gran interés el desarrollo de nuevos cultivares con características agronómicas mejoradas.

La biotecnología vegetal junto a las técnicas de mejoramiento genético *in vitro* por la vía de la mutagénesis o la transformación genética pueden facilitar la obtención de genotipos resistentes o tolerantes a estrés biótico o abiótico (Varisai Mohamed *et al.*, 2006).

El frijol, como otras leguminosas presenta serias dificultades para la transformación genética. Estas van desde el cultivo de tejidos, regeneración de plantas y el propio proceso de transferencia genética, hasta aplicabilidad a otros cultivares y baja frecuencia de transformantes (Aragao *et al.*, 1996; Zambre *et al.*, 2002).

La eficiencia de la transformación genética por la vía de *Agrobacterium tumefaciens* puede ser mejorada empleando diferentes explantes, cepas de la bacteria más virulentas, adición de compuestos fenólicos como la acetosiringona, la preparación del explante para la infección, y al variar otros factores como la temperatura de incubación y el tiempo de cocultivo (Guidolin, 2003).

De acuerdo con Curuk *et al.* (2005) los tratamientos físicos al tejido vegetal aumentan la posibilidad de infección por *A. tumefaciens* y ha sido referido como un factor importante para el aumento de la eficiencia de la transformación genética en diferentes especies de plantas.

Por ejemplo, Fang y Grumet (1990) sugirieron cortar los cotiledones de melón (*Cucumis melo* L.) con la ayuda de un escalpelo para aumentar los daños en el tejido y facilitar la inoculación con *A. tumefaciens*. Por otro lado, Norelli *et al.* (1996) cortaron las hojas de manzana (*Pyrus malus* L.) antes del procedimiento de infección lo que se tradujo en una alta eficiencia de la transformación. Así mismo, Trick y Finer (1997) realizaron la transformación genética mediante esta misma vía, pero combinada con la sonicación de los explantes, lo que provocó la aparición de microporos en la superficie del tejido para la colonización de la bacteria.

Otros métodos han sido aplicados para dañar los explantes antes del proceso de infección y aumentar la eficiencia de la transformación genética, como es el caso de la aplicación de *vortex* a diferentes velocidades combinado con la utilización de perlas de cristal para provocar daño mecánico o con la adición de

carborundum. También han sido utilizados el tratamiento pectolítico a los explantes y la utilización del bombardeo de partículas combinado con la infección por *A. tumefaciens* (Bidney *et al.*, 1992; Grayburn y Vick, 1995; Brasileiro *et al.*, 1996; Alibert *et al.*, 1999).

Curuk *et al.* (2005) colocaron cotiledones de melón, de los cultivares Kirkagac 637 y Noi Yarak, en una solución de agua con carborundum y les realizaron un tratamiento con *vortex* durante 0.5 a 2.0 minutos. Este trabajo facilitó la transformación genética vía *A. tumefaciens* en este material vegetal.

En *Phaseolus*, Zambre *et al.* (2005) antes del cocultivo de ejes embrionarios y callos organogénicos, realizaron punciones con una aguja. Sin embargo, este procedimiento resultó complicado al aplicarlo a cada explante por separado. Es por ello que se requiere estudiar otras variantes para producir heridas en el tejido blanco y con ello se facilite la infección con *A. tumefaciens*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del tratamiento con carborundum en la regeneración y expresión transitoria de la β -glucuronidasa en nudos cotiledonales y callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron segmentos de tallo de *Phaseolus vulgaris* variedad CIAP 7247, de 5-6 mm de longitud que contenían el nudo cotiledonal. Estos fueron obtenidos a partir de semillas maduras germinadas durante tres días en un medio de cultivo de germinación compuesto por las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100%, tiamina 1 ml l⁻¹, 6-Bencilaminopurina (6-BAP) 1.13 mg l⁻¹, sacarosa 45 g l⁻¹ y Phytigel 2.5 g l⁻¹. Las condiciones de cultivo fueron oscuridad y 27±2 °C.

Se emplearon, además, fragmentos de callos organogénicos de 4-5 mm de diámetro.

Estos fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito por Guidolin (2003).

Preparación del carborundum y tratamiento al explante

Se pesaron 0.5 g de carborundum (BDH Chemicals Ltd Poole England; 180 grit) de 0.045 mm de diámetro de las partículas y se mezclaron con 30 ml de agua destilada estéril. Se emplearon cuatro tubos de ensayo (FALCON) de 50 ml de capacidad con 10 explantes por cada tratamiento. Los explantes fueron tratados con la solución de agua con carborundum durante 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 minutos con agitación en *vortex* (Heidolph REAX 2000). Como control se utilizaron explantes sin dañar.

Posteriormente, los nudos cotiledonales fueron colocados durante cinco días en el medio de cultivo de pretratamiento en estado líquido de acuerdo con García *et al.* (2008). Para ello se emplearon dos Erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo y diez explantes en cada uno, por cada tratamiento. Finalmente, estos fueron subcultivados al medio de cultivo de inducción de brotes referido por García *et al.* (2008) y se incubaron durante 30 días en condiciones de luz solar a 27 ± 2 °C. Se colocaron cuatro explantes por frasco de cultivo. Se cuantificó el número de explantes que formaron yemas múltiples en uno o ambos lados del nudo cotiledonal.

En el caso de los callos organogénicos, luego del tratamiento con el carborundum estos fueron colocados en el medio de cultivo de multiplicación de callos compuesto por las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100%, Thidiazuron (TDZ) 0.20 mg l⁻¹, ácido indolacético (AIA) 0.05 mg l⁻¹ y agar 3.0 g l⁻¹. En este medio de cultivo se mantuvieron durante 15 días en cámaras de cultivo con luz artificial a 25 ± 2 °C. Se colocaron cinco explantes por placa de Petri de 9 mm. Se determinó la masa fresca de los callos (g) antes de colocarlos en el medio de cultivo a los 15 y 30 días de cultivo.

Transformación genética

La transformación genética se realizó con una suspensión bacteriana de *A. tumefaciens*, cepa EHA105 a $DO_{600} = 0.5$, portando el plásmido pTJK136. El T-ADN de este vector contiene el gen quimérico *uidA* interrumpido por un intron.

La infección fue durante 15 minutos y el cocultivo durante cinco días de a 25 ± 2 °C en la oscuridad.

Luego del cocultivo los explantes se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una solución de X-gluc para evaluar la actividad transitoria GUS de acuerdo con lo referido por Jefferson *et al.* (1987). En el caso del nudo cotiledonal se cuantificó, el número total de puntos azules observados en la zona de formación de las yemas múltiples.

Para los callos se hizo una clasificación entre puntos pequeños (zonas menores de 0.5 mm de diámetro) y puntos grandes (zonas mayores de 1.0 mm de diámetro) siguiendo el procedimiento descrito por De Clercq *et al.* (2002).

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda del Paquete estadístico SPSS versión 16.0 sobre Windows. Se utilizó un análisis de varianza simple y para detectar diferencias en cada una de las variables analizadas se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó que la aplicación de una solución de carborundum (0.5g/30ml de agua estéril) en agitación, produjo daños sobre los dos tipos de explantes empleados. La duración del tratamiento por 2.0 minutos afectó notablemente la zona de regeneración de yemas múltiples en los nudos cotiledonales. Cuando se aplicaron tiempos de 0.5, 1.0 y 1.5 minutos no se encontraron diferencias con el control en cuanto a la frecuencia de formación de yemas múltiples a un lado del nudo cotiledonal. Sin embargo, se logró la formación de yemas múltiples a ambos lados del explante cuando se aplicó el carborundum durante 0.5 minutos y en el control (Figura 1). Con los restantes tiempos de tratamiento (1.0, 1.5) el número de nudos cotiledonales que lograron regenerar yemas múltiples a ambos lados fue muy bajo y para el caso de 2.0 minutos ningún explante logró formarlas (Tabla 1).

Cuando se trataron los callos organogénicos, no se hallaron diferencias entre los tiempos de

tratamiento estudiados en cuanto a la masa fresca de estos a los 15 y 30 días de cultivo.

Estos resultados indicaron que para el frijol, el daño al nudo cotiledonal, al aplicarles *vortex* con la solución de agua con carborundum si afectó la regeneración de las yemas múltiples, por lo que se debe tener en cuenta su posible aplicación, en función de mejorar la eficiencia de la transformación genética.

No obstante, los callos no sufrieron ningún tipo de afectación para su multiplicación y posterior regeneración. En otros cultivos como el melón, Çürük *et al.* (2005) informaron que el tratamiento con carborundum combinado con *vortex* durante 0.5 hasta 1.5 minutos no afectó la

formación de yemas, brotes y callos en la variedad Kurkagac 637 que es referida como muy difícil para aplicar las técnicas de cultivo *in vitro*.

Además, se determinó que la duración del tratamiento de los explantes con la solución de agua con carborundum en el *vortex*, fue un factor importante para lograr la expresión transitoria GUS y en consecuencia la producción final de plantas transgénicas. En los explantes sometidos a los tiempos de agitación de 1.5 y 2.0 minutos se logró la mayor cantidad de puntos azules en la zona de regeneración de la yema múltiple, con diferencias significativas con los tiempos de 0.5, 1.0 minuto y el control (Tabla 2).

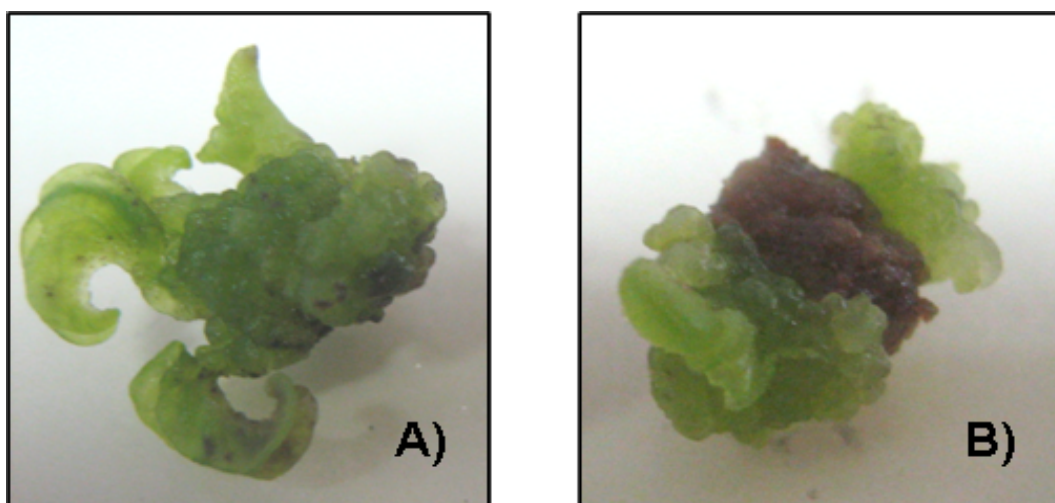


Figura 1. Nudos cotiledonales de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 72-47 a los 30 días de cultivo después de ser tratados con carborundum y *vortex*. A. Control sin tratar, B. 0.5 minutos.

Tabla 1. Efecto de la duración del tratamiento con carborundum, en la formación de yemas múltiples en nudos cotiledonales de *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247.

| Tiempo de aplicación (minutos) | Número de nudos cotiledonales con yemas múltiples regeneradas a un lado del nudo cotiledonal | | Número de nudos cotiledonales con yemas múltiples regeneradas a ambos lados del nudo cotiledonal | |
|--------------------------------|--|--------------------|--|--------------------|
| | Medias | Rangos medios | Medias | Rangos medios |
| 0.5 | 2.20 | 15.90 a \pm 1.09 | 1.80 | 18.00 a \pm 0.21 |
| 1.0 | 2.40 | 16.90 a \pm 1.14 | 0.60 | 11.50 b \pm 0.17 |
| 1.5 | 2.00 | 14.30 a \pm 1.22 | 0.20 | 9.10 b \pm 0.08 |
| 2.0 | 0.20 | 3.60 b \pm 0.44 | 0 | 7.50 b \pm 0.00 |
| Control | 2.00 | 14.30 a \pm 1.22 | 2.00 | 18.90 a \pm 0.24 |

Los datos representan los rangos medios \pm Error estándar. Valores con letras diferentes difieren significativamente ($P \leq 0.05$) según la prueba de Kruskal Wallis

Tabla 2. Expresión transitoria GUS en nudos cotiledonales de *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 tratados con carborundum y vortex.

| Tiempo de aplicación (min) | Medias | Rangos medios |
|----------------------------|--------|--------------------|
| 0.5 | 3.36 | 36.39 b \pm 0.12 |
| 1.0 | 5.11 | 44.76 b \pm 0.20 |
| 1.5 | 9.68 | 57.89 a \pm 0.36 |
| 2.0 | 9.67 | 57.88 a \pm 0.36 |
| Control | 0.65 | 14.88 c \pm 0.06 |

* Diferentes tiempos de duración del tratamiento con carborundum.

Los datos representan el rango medio \pm Error estándar del número de puntos azules por explante

Valores con letras diferentes difieren significativamente ($P \leq 0.05$) según la prueba de Kruskal Wallis

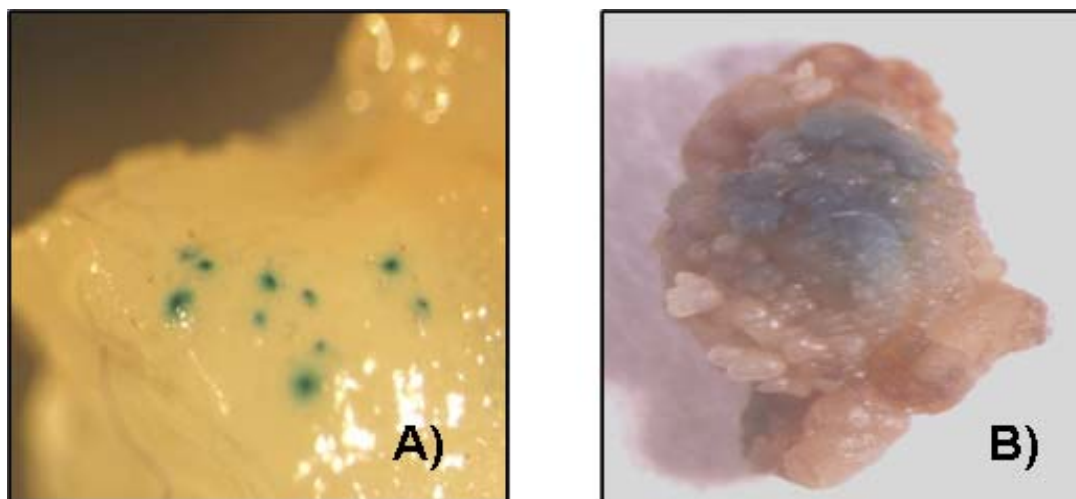


Figura 2. Expresión transitoria GUS en diferentes explantes de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247. A. Nudos cotiledonales tratados por 1.5 minutos con carborundum, B. Callos tratados por 1.0 minutos.

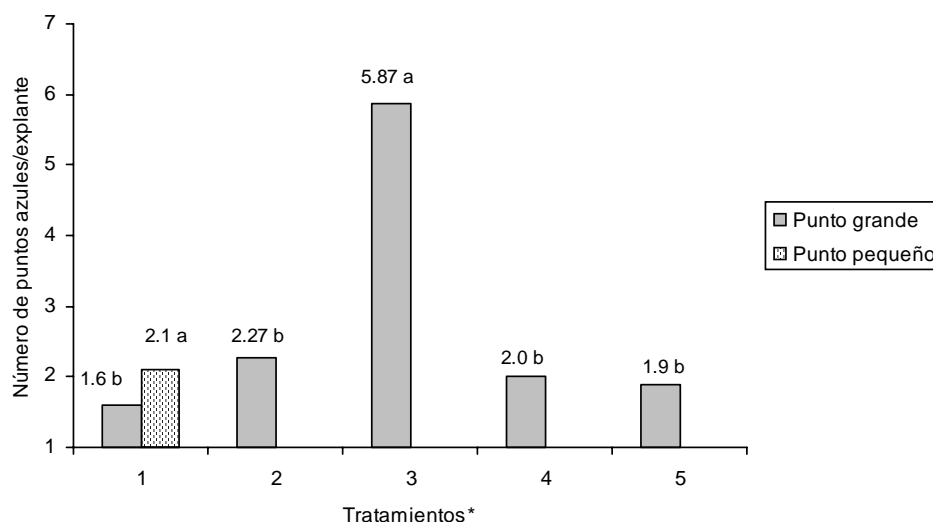
Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo fueron informados por Çürük *et al.* (2005) quienes obtuvieron una eficiencia de la transformación de 1%, luego de haber tratado los cotiledones de semillas maduras germinadas *in vitro* de dos variedades de melón, durante 1.5 minutos con una solución de agua con carborundum.

El daño al nudo cotiledonal por tiempos entre 1.5 a 2.0 minutos, produjo como promedio 9.68-9.67 puntos azules, con diferencias significativas con el control, en esta variedad de frijol, transformada genéticamente vía *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 2A).

En los callos tratados con carborundum el número de puntos azules por explante, fue

mayor en el tratamiento que se sometió a 1.0 min de agitación. Se encontraron solo zonas grandes mayores de 1.0 mm, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 2B). Es de destacar que todos los casos en los que se empleó el carborundum para producir las heridas y aumentar de esta forma las posibilidades de infección con la bacteria, aparecieron zonas grandes de expresión transitoria GUS con puntos grandes (Figura 3).

Cuando se realizan heridas en el tejido que se va a transformar, se liberan compuestos fenólicos que a su vez atraen a la bacteria por movimientos quimiotácticos positivos. Posteriormente, se movilizan los mecanismos de transferencia del T-ADN de la bacteria a la célula vegetal (Zupan *et al.*, 2000).



*Diferentes tiempos de tratamiento con carborundum y vortex (1: Control sin tratar, 2: 0.5 minutos, 3: 1.0 minutos, 4: 1.5 minutos, 5: 2.0 minutos)

Puntos grandes (zonas mayores de 1.0 mm de diámetro)

Puntos pequeños (zonas menores de 0.5 mm de diámetro)

Valores con letras diferentes difieren significativamente ($P \leq 0.05$) según la prueba de Kruskal Wallis

Figura 3. Expresión transitoria GUS en callos organogénicos de *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247 tratados con carborundum.

De acuerdo con Brasileiro *et al.* (1996) en el género *Phaseolus*, el tratamiento a los explantes antes de la infección con la bacteria, ha permitido aumentar la eficiencia de la transformación genética ya que estas pequeñas heridas son suficientes para inducir la transferencia del T-ADN y no afectan la regeneración de los explantes.

Estos resultados permitieron concluir que la aplicación de carborundum durante 1.5 minutos en el nudo cotiledonal, logró la regeneración de yemas múltiples en al menos un lado del nudo cotiledonal, en muy pocos casos en los dos y aumentó la cantidad de puntos azules. Sin embargo, al emplear callos organogénicos como tejido blanco para la transformación genética combinado con el tratamiento por 1.0 minuto, se logró aumentar el número de puntos azules sin afectar la posterior regeneración en plantas de los tejidos transformados en esta variedad de frijol, lo que se traduce finalmente en un aumento de la eficiencia del proceso.

Con el presente trabajo se confirmó la observación original de Cheng *et al.* (1996)

quienes plantearon que la eficiencia de la transformación genética puede aumentar si se daña el material vegetal, previo a la infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Este puede ser un método aplicable a otras especies de plantas recalcitrantes al proceso. Esta técnica podrá ser empleada en los programas de mejoramiento genético de *Phaseolus vulgaris* L.

REFERENCIAS

Alibert B, Lucas O, Le Gall V, Kallerhoff J, Alibert G (1999) Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression. *Physiol. Plant.* 106: 232-237

Aragao FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 93(1-2): 142-150

Bidney D, Scelonge C, Martich J, Burrus M, Sims L, Huffman G (1992) Microprojectile bombardment of plan tissue increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 18: 301-313

- Brasileiro ACM, Aragao FJL, Rossi S, Dusi DMA, Barros LMG, Rech EL (1996) Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. *Journal of American Society for Horticultural Science* 121(5): 810-815
- Cheng YH, Yang JS, Yeh SD (1996) Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. *Plant Cell Report* 16: 127-132
- Çürük BS, Çetiner S, Elman C, Xia X, Wang Y, Yeheskel A, Zilberstein L, Perl-treves R, Watad AA, Gaba V (2005) Transformation of recalcitrant Melon (*Cucumis melo* L.) cultivars is facilitated by wounding with carborundum. *Eng. Life Sci* 5(2): 169-177
- De Clerq J, Zambre M, Van Montagu M, Dillen W, Angenon G (2002) An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Report* 21: 333-340
- Delgado-Sánchez P, Saucedo-Ruiz M, Guzman Maldonado SH, Villordo-Pineda E, González-Chavira M, Fraire-Velázquez S, Acosta-Gallegos JA, Mora-Avilés A (2006) An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 170 (4): 822-827
- Fang G and Grumet R (1990) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Report* 9(2): 160-164
- García L, Collado-López R, Bermúdez-Caraballosa I, Veitía N, Torres D, Romero C (2008) Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L. *Biotecnología Vegetal* 8 (2):77-80
- Gatica AM, Muñoz JV, Ramírez PF, Valdez MM (2010) *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic journal of Biotechnology* 13(1): 1-8
- Guidolin, AF (2003) Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. PIRACICABA, São Paulo, Brazil
- Grayburn WS, Vick BA (1995) Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. *Plant Cell Report* 14: 285-289
- Jefferson, RA, Kananagh TA, Bevan M (1987) Gus fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene-fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Norelli J, Mills J, Aldwinckle (1996) Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Hort Sci.* 31: 1026-1027
- Trick HN, Finer JJ (1997) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res.* 6: 329-336
- Varisai Mohamed S, Sung JM, Wang CS (2006) Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86(2): 187-199
- Zambre M, Chowdhury B, Kuo Y-H, Van Montagu M, Angenon G, Lambein F (2002) Prolific regeneration of fertile plants from green nodular callus induced from meristematic tissues in *Lathyrus sativus* L. (grass pea). *Plant Sci* 163:1107-1112
- Zambre, M, Goossens A, Cardona C, Van Montagu M, Terry N, Angenon G (2005) A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepari bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theor Appl Genet.* 110: 914-924
- Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal* 23(1): 11-28