

Capítulo 12

Transformación genética de plantas

Juan Pablo Martínez Vázquez
Eugenio Pérez Molphe Balch

*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

La posibilidad de modificar la información genética que posee y expresa una planta es una de las herramientas más importantes de la biotecnología vegetal. Estas técnicas permiten tanto introducir nueva información, como eliminar o editar la existente. En este capítulo se describe qué es y para qué se aplica la transformación genética de plantas. Se describen las técnicas más utilizadas para llevar a cabo este proceso, con énfasis en los métodos biológicos basados en el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. En este último caso se menciona tanto la obtención y usos de las raíces transformadas, como la posibilidad de regenerar plantas transgénicas completas a partir de estas. Se describen además algunos métodos físicos para la transformación genética de plantas. Por otro lado, una parte

fundamental de esta tecnología es la posibilidad de reconocer en una etapa temprana aquellos tejidos vegetales en los que se haya llevado a cabo la transformación genética, por lo que se habla del uso de genes marcadores de selección y reporteros. Finalmente, se presentan protocolos detallados para llevar a cabo la transformación genética de plantas de la familia Gesneriaceae mediante *A. tumefaciens*, así como para el ensayo histoquímico para detectar la actividad del gen reportero que codifica para la β -glucuronidasa (GUS).

Introducción

La transformación genética de plantas es la introducción en su genoma de nueva información por medio de la transferencia directa de las moléculas de ADN que la codifican. Esta información puede provenir de la misma especie vegetal, de una especie, género o grupo taxonómico diferente, e incluso de un organismo perteneciente a otro reino. En la actualidad esta técnica incluye además la posibilidad de bloquear o editar la información existente en el genoma alterando así el fenotipo. Esta modificación genética de plantas está dirigida a la mejora de sus cualidades agronómicas produciendo genotipos que expresen características de interés, también a la mejora de las propiedades nutricionales de los productos obtenidos de plantas, y más recientemente a la producción en plantas de moléculas valiosas que no son parte normal de su bioquímica. A la fecha se han demostrado ya los varios efectos benéficos de la transformación genética de plantas. Estos efectos no tienen que ver sólo con ventajas agronómicas que se reflejan en una mayor producción, también se han visto efectos positivos en el ambiente, y en la salud humana y animal, por la reducción en el uso de pesticidas relacionado con las plantas resistentes a plagas y enfermedades. La generación de alimentos de origen vegetal con un mayor valor nutricional también ha sido un logro notable de esta tecnología. Por otro lado, la gran mayoría de los numerosos estudios realizados a la fecha demuestran la ausencia de daños asociados a las plantas transgénicas. Por el contrario, muestran ventajas en comparación con las estrategias actuales que pretenden el incremento de la producción agrícola sustentado en el uso de pesticidas, fertilizantes y otras tecnologías nocivas para la salud y el medio ambiente. Asimismo, la situación actual en la que una gran cantidad de ecosistemas naturales han sido dañados de forma muy severa, hace inviable el

pensar en un incremento en la producción agrícola basada en la apertura de nuevas zonas al cultivo.

Se ha reportado ya la transformación genética en gran cantidad de especies de interés, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Esto se ha logrado mediante el uso de diversos protocolos de transformación. Las plantas modificadas genéticamente, o transgénicas, ya se usan de manera extensiva en la agricultura mundial. En 2018, se sembraron 191.7 millones de hectáreas de cultivos modificados genéticamente a nivel mundial, los principales son maíz, soja, colza y algodón, pero también hay superficies importantes cultivadas con alfalfa, remolacha azucarera, papaya, calabaza, berenjena, papa y manzana, productos transgénicos que ya están presentes en los mercados.

En lo que respecta a las características que se han mejorado o alterado en las plantas transgénicas generadas, estas han evolucionado a lo largo del tiempo atendiendo a diferentes visiones u objetivos. Las primeras plantas transgénicas generadas llevaban genes destinados a mejorar las propiedades agronómicas y por lo tanto la productividad de los cultivos. Ejemplos de esto son genes de resistencia a patógenos (virus, bacterias y hongos), resistencia a plagas, resistencia a herbicidas y resistencia al estrés ambiental (sequía, temperaturas extremas, salinidad, etc.). Todas estas estrategias benefician de manera directa al productor, incrementando las cosechas y reduciendo los costos. En una segunda generación, los esfuerzos se dirigieron en su mayoría a la mejora en las propiedades nutricionales de los productos derivados de las plantas transgénicas o en sus características de interés para el consumidor. De esta manera surgieron alimentos con mayor contenido de vitaminas, de aminoácidos esenciales, antioxidantes, o una mayor vida de anaquel. Finalmente, una tercera generación de plantas transgénicas ha sido modificadas con el objetivo de convertirlas en fábricas vivas de moléculas de utilidad, pero que normalmente no son producidas por las plantas, por ejemplo, vacunas, proteínas terapéuticas de origen humano, fármacos o biopolímeros.

De acuerdo con los avances alcanzados en el conocimiento y desarrollo de sistemas que permiten la modificación del genoma de un organismo se vislumbra que en las siguientes generaciones de plantas modificadas genéticamente se prescindirá cada vez más de la introducción de genes foráneos, y se privilegiará la edición o alteración del genoma natural con el fin de mejorar sus características. Un ejemplo de este nuevo enfoque es la generación de plantas resistentes a geminivirus a través del sistema CRISPR-Cas.

La generación de una planta transgénica es un proceso que consta de varias etapas. Una etapa previa que determina en gran medida el éxito final, es la preparación de la secuencia de ADN que será introducida al genoma vegetal. Para esto se usan las técnicas de ingeniería genética, con apoyo de otras como la bioinformática, con el fin de obtener y adecuar para su expresión en la planta, la molécula de ADN que será responsable de la incorporación de la nueva información, o de la modificación de la existente. Esto incluye la incorporación de esta información al vector, usualmente un plásmido, que servirá de vehículo para su introducción al genoma vegetal. Una vez realizada esta etapa previa, el proceso de transformación genética consta normalmente de tres pasos:

- I. Introducción de la molécula de ADN a las células vegetales, normalmente de forma tal que esta pueda integrarse y se convierta en parte del genoma de la célula. Con este fin se han desarrollado diversos métodos de transformación genética que se describirán más adelante.
- II. Regeneración de plantas completas a partir de células transformadas. Para esto se hace uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales que permiten la obtención de individuos completos a partir de células individuales. Esto se logra mediante vías como la organogénesis y la embriogénesis somática (Ver Capítulo 1 de esta obra). En el caso particular de los sistemas de transformación en planta, esta etapa del proceso se omite.
- III. Selección de los tejidos o plantas que contienen y expresan la nueva información. En general, la eficiencia de los métodos de transformación desarrollados hasta la fecha es baja. Esto quiere decir que sólo una fracción de las células tratadas recibe efectivamente la nueva información genética. Por esto es de suma importancia poder seleccionar de una forma temprana a las células, tejidos o plantas que fueron transformadas, eliminando a las que no recibieron la nueva información genética.

A continuación, se presenta información más detallada de la primera y tercera etapas del proceso mencionado.

Métodos para la transformación genética de células vegetales

Los métodos desarrollados hasta hoy para la transformación genética en plantas se pueden clasificar en tres grupos o categorías. A continuación, se presenta un esquema con la clasificación general (Fig. 12.1), y posteriormente se describen los métodos más utilizados.

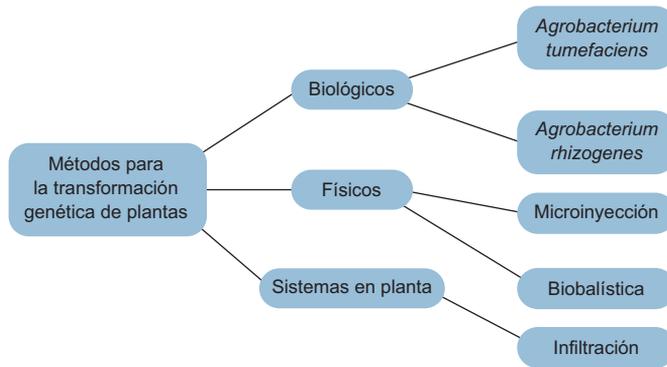


Figura 12.1. Clasificación de los métodos más utilizados para la transformación genética de plantas.

Métodos biológicos

Éstos hacen uso de bacterias fitopatógenas cuyo mecanismo natural de infección es precisamente la introducción al genoma vegetal de genes propios que alteran los patrones de desarrollo y la capacidad biosintética del tejido vegetal infectado. Estos organismos son *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. El primero es el agente causal de la enfermedad conocida como “agalla de la corona”, mientras que el segundo causa la aparición de las “raíces pilosas”. Además de estas bacterias, se ha postulado e intentado el uso de virus como vehículos de introducción de secuencias de ADN al genoma de células vegetales, sin embargo éstos han resultado poco eficientes y no se usan de manera rutinaria. Estos métodos de transformación genética también son llamados indirectos, ya que el ADN modificado es introducido en primer término a una bacteria, y posteriormente a través de ésta al genoma vegetal.

Agrobacterium tumefaciens

Se trata de una bacteria del suelo, de la familia Rhizobiaceae, Gram negativa, que tiene la capacidad natural de infectar una amplia variedad de gimnospermas y angiospermas dicotiledóneas mediante su inoculación en sitios con heridas. Esta bacteria transfiere e integra un segmento de su ADN, de aproximadamente 23 kpb, al genoma de la planta y como consecuencia induce la aparición de tumores a través de la sobreproducción de auxinas y citocininas. Además, les confiere a las células vegetales infectadas la propiedad de sintetizar opinas, única fuente de carbono y nitrógeno para las bacterias. Este segmento de ADN, llamado ADN-T (ADN transferible), se encuentra en el plásmido Ti, inductor de tumores. Las cepas *A. tumefaciens* se diferencian entre sí por el tipo de opina que pueden catabolizar. Debido a esta capacidad natural de transferir ADN al genoma vegetal, surgió la idea de utilizar este organismo como vector para la introducción de genes de interés en plantas.

Los plásmidos Ti silvestres no son usados directamente como vectores de transformación genética, antes, se deben modificar para eliminar el ADN-T (a esto se le llama desarmar). Esto debido a que los genes silvestres causan un desbalance hormonal severo en el tejido vegetal, impidiendo así la regeneración de plantas completas con morfología y funciones normales. Por esto se eliminan los oncogenes, responsables de la sobreproducción de auxinas y citocininas, y los genes responsables de la síntesis de opinas, y en su lugar pueden colocarse las secuencias de ADN de interés para introducir al genoma vegetal. Sin embargo, es importante mantener las secuencias bordes, que delimitan al ADN-T, así como la llamada región *vir* (virulencia) del plásmido Ti. En esta última están codificadas las proteínas que se encargan de reconocer el ADN-T, hacer una copia del mismo de cadena sencilla, cubrirlo para protegerlo de las nucleasas, transferirlo a la célula vegetal, introducirlo al núcleo e integrarlo al genoma de la célula vegetal. Para que este sistema funcione, no es indispensable que la región *vir* y el ADN-T se encuentren físicamente en la misma molécula de ADN (plásmido). Debido a esto se han generado dos tipos de vectores, los vectores cointegrados y los binarios. Los primeros resultan de la integración de un plásmido foráneo pequeño (genes de interés flanqueados por el borde derecho y una región homóloga al borde izquierdo) al plásmido Ti desarmado (borde derecho e izquierdo y la región *vir*) mediante un proceso de recombinación de regiones homólogas, dando como resultado un solo

plásmido que contiene tanto la región *vir* como el ADN-T de interés. Por su parte, los vectores binarios son plásmidos más pequeños que contienen sólo el ADN-T con sus bordes y las secuencias a transferir al genoma vegetal. Éstos se insertan a una cepa de *A. tumefaciens* que contenga un plásmido Ti desarmado. De esta forma, el ADN-T y la región *vir* quedan físicamente separados en plásmidos diferentes, pero esto no afecta el proceso de transferencia del ADN al genoma vegetal, ya que las proteínas codificadas en esta última región pueden actuar sobre cualquier ADN-T presente en la célula bacteriana. Estos vectores binarios resultan más fáciles de manejar ya que los plásmidos con el ADN-T son mucho más pequeños que el Ti por lo que se manipulan de una forma más sencilla en el laboratorio.

En cuanto al proceso de transformación con *A. tumefaciens*, este es relativamente sencillo y sólo requiere del equipo necesario para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Los pasos del proceso son (Ver Protocolo 12.1):

1. Se introduce el plásmido con las secuencias a transferir a la planta, y las secuencias borde, a una cepa curada de *A. tumefaciens*. El plásmido introducido funcionará como vector binario. Es fundamental incluir genes adicionales, marcadores de selección y/o reporteros, que permitan seleccionar y/o reconocer fácilmente a los tejidos transformados.
2. Se obtiene un cultivo líquido de la cepa modificada de *A. tumefaciens* y se pone en contacto con explantes de la especie de planta a transformar. El tipo de explante dependerá del método de regeneración *in vitro* previamente desarrollado para la especie en particular. Es importante que el explante presente superficies heridas, ya que éstas últimas son el sitio donde ocurre la unión de la bacteria y la subsecuente transferencia de los genes y secuencias de interés al genoma vegetal. Al período en que están en contacto el explante y la suspensión bacteriana se le denomina cocultivo y normalmente abarca de 24 a 72 horas. En este paso se puede incorporar acetosiringona al medio de cultivo. Éste es un compuesto fenólico que induce la virulencia de la bacteria, activando los genes *vir* y otros necesarios para la unión de ésta a la célula vegetal. La adición de esta molécula puede incrementar de manera significativa la eficiencia de transformación.
3. Al finalizar el período de cocultivo, la bacteria debe ser eliminada, ya que su presencia por un tiempo más prolongado provocará la necrosis

del tejido vegetal. Para esto debe emplearse un agente que sea específico, es decir que elimine a la bacteria sin dañar al explante. Por este motivo se recomienda el uso de antibióticos. Lo más recomendable en este punto es realizar un lavado de los explantes con medio de cultivo líquido, adicionado con el antibiótico, y luego transferirlos a medio de cultivo semisólido, también con antibiótico.

4. A partir de la eliminación de la bacteria, debe seguirse el protocolo de regeneración a partir de los explantes cocultivados. Esto se hace por la vía y en los medios previamente definidos para la especie. La única diferencia con respecto a la regeneración *in vitro* normal sería la adición del antibiótico o agente selectivo de acuerdo a las secuencias de ADN introducidas al genoma vegetal.

La eficiencia de transformación mediante *A. tumefaciens* varía de acuerdo a la especie vegetal y a la cepa bacteriana utilizada, pero en general depende de los siguientes factores:

- Habilidad de la cepa bacteriana para transformar a las células vegetales puestas en cocultivo. Ya se han caracterizado varias cepas de *A. tumefaciens* que difieren en cuanto a su habilidad para introducir información genética en diferentes grupos vegetales. La selección de la cepa más adecuada para una especie en particular suele ser un paso importante en la optimización de los protocolos de transformación.
- Eficiencia del sistema de selección para las células transformadas. Éste debe ser capaz de discriminar de manera precisa entre las células transformadas y las no transformadas. Si es demasiado agresivo puede detener el desarrollo de las células transformadas, mientras que un sistema muy poco agresivo permitirá el desarrollo de células, tejidos e incluso plantas no transformadas (escapes), haciendo más difícil detectar a las que llevan los genes foráneos.
- Eficiencia del sistema de cultivo *in vitro* que permita la regeneración de plantas a partir de las células transformadas. Previo al desarrollo de sistemas de transformación genética es indispensable desarrollar un sistema eficiente de regeneración *in vitro* a través de organogénesis o embriogénesis somática. Este sistema deberá iniciar del mismo tipo de explante que será usado para la transformación.

- Estabilidad del nuevo ADN incorporado al genoma vegetal. Esto depende en gran medida del tamaño del segmento de ADN a introducir. En varios grupos de plantas, la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* es poco eficiente, aun cuando se tomen en cuenta los factores antes citados. Por este motivo, se han propuesto varias modificaciones a los protocolos basados en esta bacteria, o bien su combinación con otras técnicas de transformación. Algunas de ellas son: a) Agrolística, que combina el uso de *Agrobacterium* como vector y la biobalística para facilitar su penetración al tejido, b) Agroinfiltración, que es el uso de vacío para facilitar la entrada de la bacteria al tejido; c) Método SAAT, que es la penetración de la bacteria facilitada por sonicación, y; d) La utilización de otros géneros bacterianos que también poseen la capacidad de transferir información genética al genoma vegetal, como *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*.

Como se ha mencionado antes, *A. tumefaciens* es un vehículo ampliamente usado para la introducción al genoma vegetal de nueva información genética. Además de esto, este sistema puede ser utilizado para la edición o alteración de la información genética ya existente en el genoma vegetal, esto a través de la tecnología CRISPR/Cas9.

Agrobacterium rhizogenes

Es una bacteria del suelo muy relacionada a *A. tumefaciens* identificada desde los años 30 del siglo XX como el agente causal de la enfermedad conocida como “raíces pilosas”, la cual afecta a un gran número de especies de plantas, principalmente del grupo de las Dicotiledóneas, aunque también son susceptibles algunas Monocotiledóneas e incluso Gimnospermas. Las “raíces pilosas” se caracterizan por una alta tasa de crecimiento, desarrollo plagiotrópico, un alto grado de ramificación y gran abundancia de pelos radicales, de ahí su nombre de pilosas. Este fenotipo se debe a la inserción en el genoma vegetal de los genes *rol* contenidos en el ADN-T de *A. rhizogenes*. Además, estas raíces producen metabolitos específicos denominados opinas (manopina, cucumopina y agropina), los cuales son secretados al suelo, en donde son utilizados como fuente de nitrógeno y carbono por la bacteria. *A. rhizogenes* es una especie que también puede ser usada como vehículo para la introducción de

genes foráneos al genoma vegetal. Sin embargo, en este caso lo que se genera de manera directa son raíces transformadas, que es un tejido vegetal que lleva y expresa los genes foráneos, pero también los genes silvestres de la bacteria. En este caso las cepas utilizadas no son desarmadas.

El proceso de transformación genética con *A. rhizogenes* es muy similar al mencionado para *A. tumefaciens*, y hasta donde se sabe, el mecanismo molecular a través del cual se da la transferencia e integración de los genes al genoma vegetal es casi idéntico. En el caso de *A. rhizogenes*, después del cocultivo y eliminación de la bacteria, los explantes son transferidos a medio sin reguladores del crecimiento en donde aparecerán las raíces transformadas. En muchos casos es posible mantenerlas y propagarlas por tiempo indefinido subcultivando a medio fresco. El cultivo puede hacerse en medio semisólido, o bien en medio líquido (Fig. 12.2). Esto último permite escalar los cultivos, desde pequeños matraces hasta biorreactores de gran capacidad.

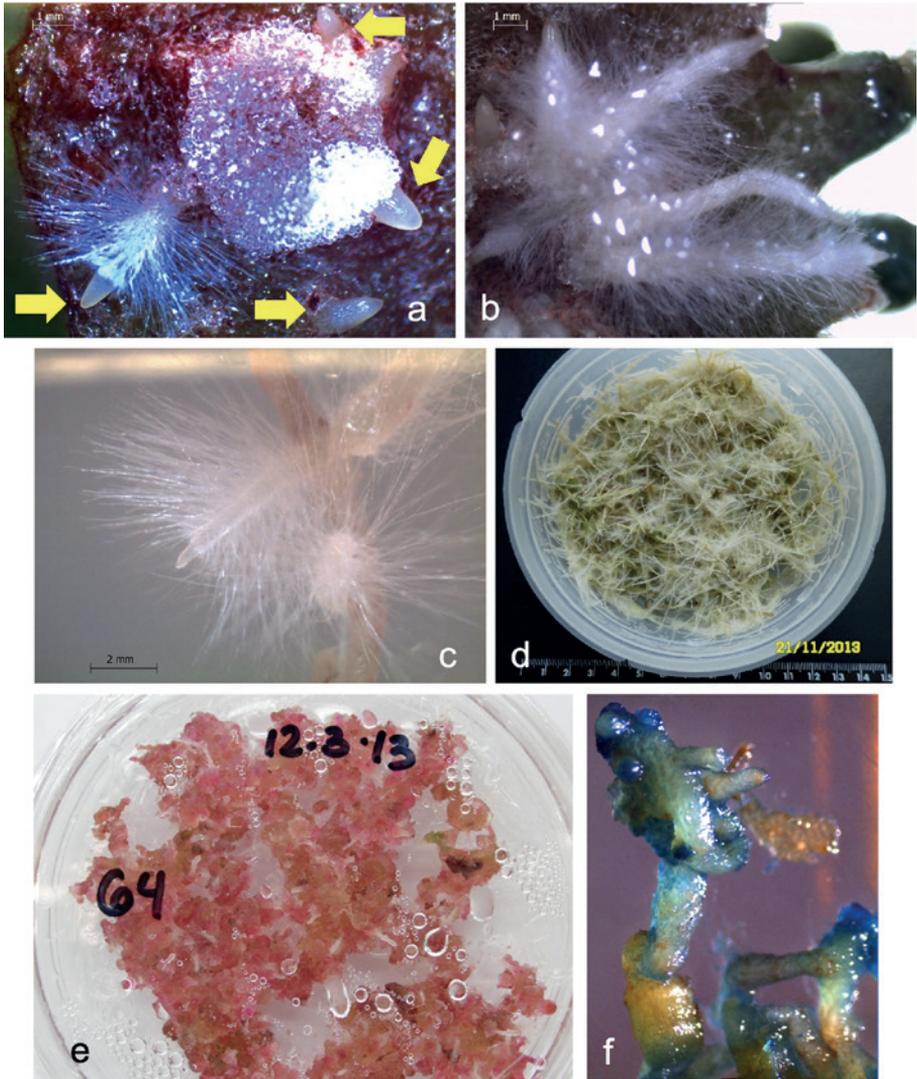


Figura 12. 2. Generación y cultivo de raíces transformadas con *A. rhizogenes* en Cactáceas. a) Aparición de raíces transformadas (flechas) sobre un corte transversal de cactáceas inoculado con *A. rhizogenes*; b) Desarrollo de las raíces transformadas sobre el explante inoculado; c) Detalle de las raíces transformadas; d) Cultivo masivo de raíces transformadas; e) Raíces transformas productoras de betalainas, y; f) Actividad de GUS en raíces transformadas.

Las raíces transformadas generadas a través del sistema *A. rhizogenes* tienen tres áreas de aplicación dentro de la biotecnología vegetales, éstas son:

I. *Producción de metabolitos secundarios*: Las raíces transformadas muestran normalmente una alta tasa de crecimiento *in vitro*. Además, al tratarse de un tejido diferenciado es estable genéticamente y conserva su capacidad biosintética. Esto hace de éstas un sistema ideal para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios. Estos tejidos son capaces de producir los mismos compuestos químicos que las raíces de la misma especie vegetal en condiciones naturales, y no suelen presentarse las notables reducciones en la concentración de los metabolitos que se han reportado para otros tipos de cultivo, como el tejido calloso o las células en suspensión. Ya se ha reportado la obtención de cultivos de raíces transformadas productores de metabolitos secundarios en una gran cantidad de especies, incluyendo varias plantas medicinales raras o amenazadas. Se han producido con éxito compuestos de interés médico como antihipertensivos, antimaláricos, analgésicos, antibióticos, antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios, antidiabéticos, antifúngicos y antivirales, así como de interés industrial como colorantes y saborizantes. También se han desarrollado varias estrategias dirigidas a incrementar la producción de los compuestos de interés. Entre estas destacan el cultivo a gran escala en biorreactores y las mejoras en el diseño de los mismos para adecuarlos a las peculiaridades de este tipo de cultivo. Otras estrategias son la selección de líneas altamente productoras, la adición de compuestos que inciten la producción del metabolito y la propia modificación genética de la ruta metabólica, esto sobreexpresando o bloqueando a los genes involucrados. Esto se puede lograr introduciendo secuencias adicionales de ADN al momento de la transformación para la generación de las raíces transformadas.

II. *Generación de plantas transgénicas*: Las raíces transformadas son tejido transgénico que puede ser obtenido y cultivado de una forma relativamente sencilla, tal como antes se describió. Estas raíces no requieren de reguladores del crecimiento para crecer, sin embargo, cuando son expuestas a los mismos pueden mostrar diversas respuestas morfogénicas. Una de estas es la formación de brotes adventicios que pueden llevar a la

obtención de plantas completas. Al originarse a partir de tejido transgénico, los brotes y plantas generadas conservarán esta característica. Esto permite usar a las raíces transformadas como un paso intermedio para la obtención de plantas transgénicas, brindando así una alternativa al uso de la transformación con cepas desarmadas (sin capacidad de inducir tumores) de *A. tumefaciens* (Figura 12.3). En el caso de *A. rhizogenes*, las cepas silvestres pueden ser usadas directamente para la generación de plantas transgénicas. Esto debido a que las raíces pilosas son capaces de regenerar plantas fértiles sin que sea necesaria ninguna modificación en el ADN-T, lo cual es prácticamente imposible partiendo de tumores producidos por cepas silvestres de *A. tumefaciens*. Las plantas transgénicas generadas a partir de raíces transformadas en ocasiones muestran un fenotipo peculiar, llamado síndrome de la raíz pilosa o fenotipo Ri, que afecta la forma, crecimiento, capacidad de enraizamiento, floración y fertilidad de la planta. Algunas de las plantas regeneradas que llevan los genes *rol* de *A. rhizogenes* se caracterizan por presentar entrenudos cortos, dominancia apical reducida y hojas arrugadas; sin embargo, otras plantas regeneradas a partir de raíces transformadas tienen un genotipo completamente normal. Las alteraciones fenotípicas causadas por los genes *rol* de las cepas silvestres de *A. rhizogenes* no son necesariamente negativas desde el punto de vista agronómico o de productividad vegetal. De hecho, se considera actualmente que los genes *rol* podrían tener un papel importante en el mejoramiento de varias especies vegetales. Por ejemplo, estos genes podrían incrementar notablemente la capacidad de enraizamiento de muchas especies recalcitrantes, o bien producir plantas con sistemas radicales más fuertes y abundantes. Por otro lado, en la parte aérea de estas plantas se puede lograr una menor dominancia apical con entrenudos más cortos.

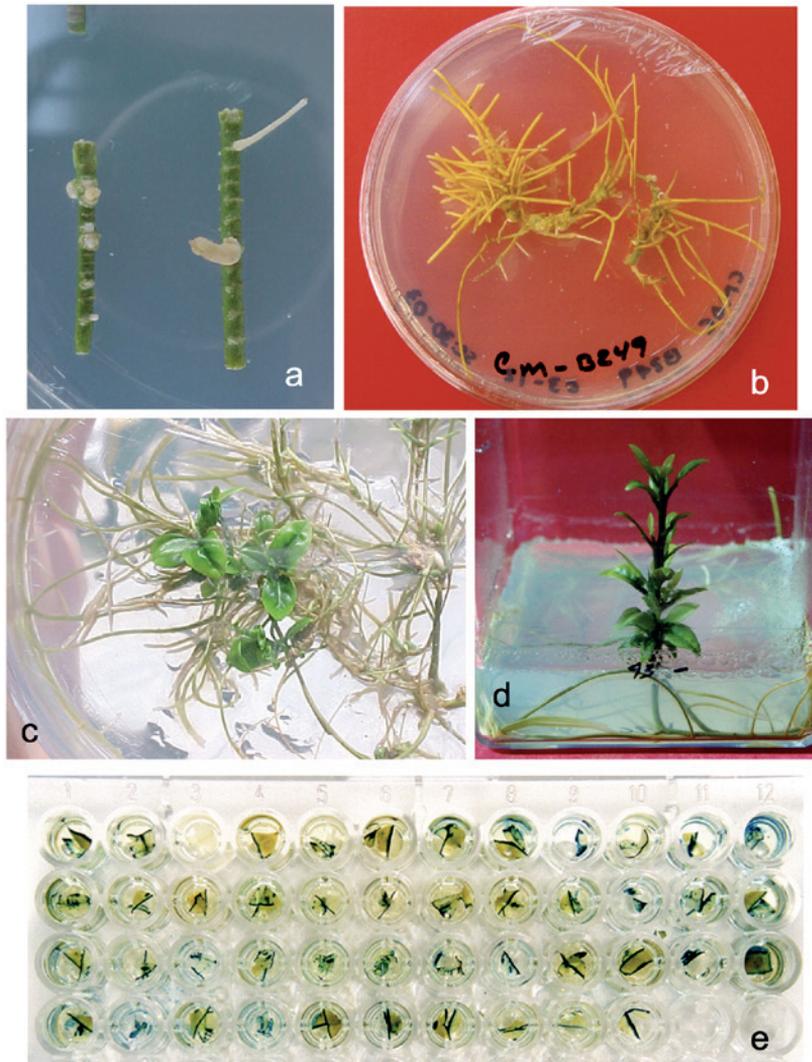


Figura 12.3. Generación de plantas transgénicas de cítricos a partir de raíces transformadas con *A. rhizogenes*. a) Generación de raíces transformadas en un segmento de tallo inoculado con *A. rhizogenes*; b) Cultivo de raíces transformadas en medio semisólido; c) Generación de brotes vía organogénesis en raíces transformadas; d) Plántula transformada generada a partir de raíces transformadas, y; e) Actividad de GUS en hojas de plantas transgénicas de cítricos generadas a partir de raíces transformadas.

III. *Generación de plantas compuestas*: Éstas se obtienen al inducir raíces transformadas inoculando con *A. rhizogenes* la parte basal de un brote vegetativo. Lo que se obtiene es una planta conformada por un sistema radical transformado y una parte área silvestre. Para esto no es esencial trabajar bajo condiciones *in vitro* ya que el proceso se puede realizar por completo *ex vitro*. Esta tecnología resulta muy útil para estudiar la expresión *in vivo* de genes de interés y también es posible insertar genes que confieran ventajas agronómicas, siempre y cuando éstos funcionen cuando se expresan sólo en el sistema radical. En este caso la parte aérea, flores y frutos incluidos, no contendrán los transgenes, pero se beneficiará de su presencia y expresión en la raíz.

Métodos físicos

Biobalística

El método de biobalística, también llamado bombardeo con microproyectiles o biolística, permite la transferencia de información genética a las células vegetales mediante microproyectiles esféricos (0.5 a 5 μm) recubiertos de ARN o ADN, y disparados a una alta velocidad (más de 400 m/s) hacia el tejido vegetal. Los microproyectiles deben cumplir varias características importantes; estar hechos de un metal inerte (oro, tungsteno o platino); tener afinidad por ARN/ADN para que este se adhiera a su superficie, y poder liberar el material genético una vez dentro de la célula. La aceleración de las partículas se logra usualmente mediante gases a presión por medio de dispositivos que permiten dirigirlos hacia el tejido vegetal. Los ácidos nucleicos se adhieren a los microproyectiles mediante tratamientos con cloruro de calcio y espermidina.

Optimizando parámetros como su velocidad y la distancia del disparo, los microproyectiles son capaces de penetrar la pared y la membrana celular sin dañar demasiado a las células vegetales, y el ADN adherido a las partículas se libera después debido a las modificaciones del entorno iónico. Una vez solubilizado en la célula, el ADN foráneo puede integrarse aleatoriamente en el genoma vegetal, aunque esto suele ser un evento poco frecuente, lo cual es el principal inconveniente de esta técnica. Una consideración importante para la biobalística es que los tejidos vegetales a bombardear deben ser sometidos a

un tratamiento osmótico pre y post bombardeo, para minimizar el daño por el procedimiento.

La transferencia de ADN a través de la biobalística ha sido ampliamente utilizada en plantas superiores, algunos éxitos importantes incluyen algodón, papaya, maíz y tabaco, arroz, trigo, avena, caña de azúcar y cebada. Cabe mencionar que esta tecnología se ha usado extensivamente con monocotiledóneas, especialmente gramíneas. Esto debido a que la transformación con *A. tumefaciens* suele ser muy poco eficiente en estos grupos. También han logrado la transformación genética de organelos celulares como los cloroplastos, bacterias, protozoos, hongos, algas, insectos, tejidos animales y plantas *in vivo*.

La biobalística presenta algunas ventajas importantes con respecto a la transformación por métodos biológicos: Es fácil, no necesita vectores especializados, por lo tanto, utiliza construcciones genéticas simples, plásmidos o moléculas lineales, y se pueden producir múltiples integraciones. Asimismo, es capaz de transformar establemente y generar líneas de plantas transgénicas. Entre sus principales desventajas, se encuentran un porcentaje de éxito normalmente muy bajo, sobre todo en lo referente a la integración estable al genoma de los genes introducidos. En algunas ocasiones, la integración al genoma si es eficiente, pero la inserción de varias copias puede causar silenciamiento génico. Además, se ha detectado la presencia de rearrreglos en el ADN transferido. Finalmente, esta tecnología es costosa por el equipo y consumibles requeridos, esto en comparación por ejemplo con la transformación vía *A. tumefaciens* que es un proceso que no requiere equipamiento especial. Además, los parámetros físicos (tipo de partícula, velocidad, distancia) deben optimizarse para cada especie y tipo de explante.

Sistemas de transformación en planta

Esta tecnología consiste en la introducción de información genética, normalmente vía *A. tumefaciens*, en células generativas o meristemáticas de una planta, para luego buscar transformantes en las generaciones posteriores derivadas de las estructuras inoculadas. Esto se hace en condiciones *ex vitro*, no requiere de sistemas de cultivo ni regeneración *in vitro*. Los tejidos a partir de los cuales se ha logrado la transformación en planta son:

- I. Yemas florales: Inmersión de inflorescencias en una suspensión de *A. tumefaciens* o colocación de gotas o aspersión de ésta sobre las yemas florales.
- II. Flores maduras: La suspensión de *A. tumefaciens* se coloca junto con el polen en el pistilo maduro.
- III. Meristemos: Inoculación de la bacteria por punción en yemas axilares.
- IV. Semillas: Inoculación por punción, vacío o sonicación.

Otros sistemas de transformación genética

Los sistemas de transformación genética antes descritos son sin duda los que mejores resultados han dado. La gran mayoría de las plantas transgénicas que se han desarrollado, analizado e incluso liberado para la producción, han sido generadas mediante alguno de ellos. Sin embargo, en la literatura se han reportado varios sistemas diferentes a los mencionados, mismos que han tenido éxito en casos específicos. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de estos sistemas.

Tabla 12.1. Resumen de algunos de los métodos para la transformación genética de plantas reportados en la literatura.

Método de transformación	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Agroinfección (Agroinoculación)	Introducción a la célula vegetal de genomas virales a través de <i>A. tumefaciens</i> .	Método muy eficiente para sobreexpresar proteínas de interés en plantas. No requiere de cultivo <i>in vitro</i> .	Sólo eficiente para expresión transitoria de genes, no hay integración al genoma.	Grimsley <i>et al.</i> , 1986
Electroforesis	Uso de la electroforesis para movilizar segmentos de ADN hacia un tejido vegetal.	Método sencillo, rápido y poco costoso.	Baja frecuencia de transformación, baja regeneración de plantas transgénicas, generación de quimeras.	Griesbach <i>et al.</i> , 1994

Método de transformación	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Electroporación	Introducción de fragmentos de ADN a protoplastos vegetales a través de descargas eléctricas de alta intensidad y corta duración.	Fácil, rápido y de simple operación. Técnica común para transformar microorganismos por lo que hay equipos disponibles.	Necesidad de protoplastos, baja tasa de transformación y de integración del ADN al genoma, difícil regenerar plantas completas.	Sorokin <i>et al.</i> , 2000
Fibras de carburo de silicio	Las células vegetales se agitan en presencia de fibras de carburo de silicio y ADN. Las fibras penetran las células facilitando la entrada del ADN.	Método fácil, rápido y poco costoso.	Baja regeneración de plantas ya que se requieren suspensiones celulares embriogénicas, baja eficiencia de transformación. Toxicidad de las fibras de carburo de silicio.	Petolino y Arnold, 2009
Liposomas	Fusión de liposomas que contienen el ADN a transferir con protoplastos.	Capacidad de portar grandes fragmentos de ADN sin un vector.	Frecuencia muy baja de transformación, inserción del ADN en tándem, problemas en la preparación de los liposomas, requiere de protoplastos y de un método de regeneración a partir de éstos.	Zhu <i>et al.</i> , 1993
Microinyección	Inyección directa de ADN al núcleo de la célula vegetal (Protoplasto).	Proceso bajo control visual, cantidades controlables de ADN a introducir, alta tasa de transformación.	Se requiere personal y equipo altamente especializados, proceso caro y lento. Requiere de protoplastos y de un método de regeneración a partir de éstos.	Holm <i>et al.</i> , 2000
Microláser	Se hacen perforaciones momentáneas en la pared y membrana celular enfocando un microláser sobre microcallos. El ADN penetra a través de estos orificios.	No requiere de vectores, inyección óptica automatizada, alta velocidad, eficiente y preciso.	Se requiere de equipo óptico especializado de gran precisión, baja frecuencia de transformación y de integración del ADN al genoma.	Badr <i>et al.</i> , 2005

Método de transformación	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Nanotubos de carbono	Introducción de ADN o ARN mediada por nanotubos de carbono capaces de atravesar la pared y membrana celular.	Facilidad, bajo costo, alta eficiencia y capacidad de introducir grandes cantidades de ácidos nucleicos a la célula.	Baja dispersabilidad de los nanotubos en medios acuosos, por lo que se requieren de pretratamientos. Baja eficiencia de integración al genoma.	Burlaka <i>et al.</i> , 2015
Transferencia hidrodinámica	Uso de una alta presión hidrostática para desestabilizar la membrana y facilitar la penetración de ADN a la célula.	No requiere de vectores. Método rápido.	Baja eficiencia de integración al genoma. Requiere de equipo especializado.	Jinturkar <i>et al.</i> , 2011
Transferencia mediada por compuestos químicos	Uso de compuestos como polietilenglicol (PEG) combinados con choques térmicos con el fin de facilitar la entrada de ADN a protoplastos.	Método fácil, rápido, no se requiere de equipo sofisticado.	Regeneración de plantas con eficiencia reducida, baja eficiencia de transformación, poca reproducibilidad, necesidad de protoplastos y toxicidad celular de los compuestos empleados.	Kohler <i>et al.</i> , 1987
Vectores virales	Uso de virus como vehículo para introducir ADN a las células vegetales.	Infecciones rápidas, fáciles y sistémicas. Producción de grandes cantidades de proteínas heterólogas, rango de hospedadores amplio, no se requiere de cultivo <i>in vitro</i> .	No se generan líneas transgénicas ya que no hay integración al genoma, tamaño del transgen limitado, síntomas específicos de enfermedad, alta frecuencia de errores durante la síntesis del ARN.	Yusibov <i>et al.</i> , 2000

Selección de los tejidos o plantas transformados

En general, la eficiencia de los métodos de transformación desarrollados hasta la fecha, y descritos antes, es baja. Esto quiere decir que sólo una fracción de las células tratadas recibe efectivamente la nueva información genética. Por esto es de suma importancia poder seleccionar de una forma temprana a las células, tejidos o plantas que fueron transformadas, eliminando a las que no

recibieron la nueva información genética. Hasta la fecha, la manera más eficiente para poder llevar a cabo esta selección es incorporar secuencias de ADN adicionales a la empleada para mejorar o alterar las características de la planta. Estos genes pueden codificar para características que faciliten la selección y/o identificación temprana de las células, tejidos o plantas transformadas. Además, existen diversas técnicas que permiten detectar la presencia, número e incluso arreglo de las secuencias introducidas al genoma vegetal.

A continuación, se mencionan los métodos más empleados para la identificación y caracterización de células, tejidos y plantas transformadas.

- A. *Identificación a través del genotipo*: En este caso se introducen, junto con los genes de interés, otros que causen cambios fácilmente detectables en el fenotipo de los tejidos transformados. Los tipos de genes que se utilizan con este fin son:
 - I. *Marcadores de selección*. Son genes que codifican para enzimas que detoxifican antibióticos o herbicidas, haciendo a los tejidos resistentes a los mismos. De esta manera, la adición de estos compuestos al medio de cultivo, o a la planta misma, permite seleccionar a los tejidos resistentes, y por tanto transformados, al eliminar a los que no lo están. Ejemplo de estos genes marcadores ampliamente usados son *npt-II* que confiere resistencia a kanamicina (antibiótico) y *bar* que confiere resistencia a fosfinotricina (herbicida).
 - II. *Genes reporteros*. Son genes cuyos productos generan una actividad no presente en los tejidos vegetales no transformados y fácilmente detectable. Ejemplo de esto son el gen *UidA* que genera una reacción enzimática colorida (GUS) o el gen *gfp*, tomado de una medusa bioluminiscente, que hace a los tejidos transformados capaces de emitir luz visible al ser estimulados con otras longitudes de onda.
- B. *Detección del ADN introducido dentro del genoma vegetal*. Para esto se hace uso de técnicas de biología molecular, como el Southern blot o la PCR para verificar la presencia de las secuencias introducidas, tanto en los tejidos directamente transformados, como en las plantas derivadas de los mismos y su progenie. Más recientemente, las técnicas de secuenciación de ADN de nueva generación han facilitado no sólo la detección de las secuencias introducidas en el genoma, sino el conocimiento del número

de copias, integridad y sitio de inserción. Además, permiten descartar la inserción de secuencias propias del vector usado para la transformación.

- C. *Detección de los productos de la transcripción y traducción de las secuencias introducidas.* Además del ADN introducido, es posible la detección del ARN producto de la transcripción del mismo, así como la proteína derivada de su traducción. En el primer caso se pueden usar las técnicas Northern blot o RT-PCR, y en el segundo el Western blot. Estas verificaciones son importantes ya que demuestran la funcionalidad de las secuencias introducidas.
- D. *Bioensayos.* Cuando la transformación genética tiene como finalidad mejorar o alterar alguna característica agronómica, la prueba más importante es la verificación mediante bioensayos, de que el cambio esperado ha sucedido. Estos bioensayos pueden hacerse sobre las plantas transformadas o su progenie.

Protocolos

Protocolo 12.1

Transformación genética de violeta africana o gloxinia mediante *Agrobacterium tumefaciens*

La violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) y la gloxínea (*Sinningia speciosa*) son plantas de ornato muy apreciadas pertenecientes a la familia Gesneriaceae. Son especies que responden muy bien al cultivo *in vitro* y se regeneran de manera rápida y muy eficiente a través de la organogénesis (Ver Capítulo 1 de esta obra). Además, son susceptibles a la transformación genética vía *A. tumefaciens*, por lo que pueden considerarse especies modelo en lo que respecta a este proceso.

Material biológico:

- Cultivos *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) o de gloxínea (*Sinningia speciosa*). Ver protocolo en Capítulo 1 de esta obra.
- Cepa bacteriana: *A. tumefaciens* (Cepa desarmada que contenga un vector binario con gen marcador de selección (*npt-II*) y gen reportero (*uid A*)).

Medios de cultivo:

Para la bacteria:

YEB + 50 mgL⁻¹ de Kanamicina + 50 mgL⁻¹ de Rifampicina¹

Medio YEB (Para 1 L).

Extracto de carne	5.0 g	pH 7.0
Peptona	5.0 g	
Sacarosa	5.0 g	
Extracto de levadura	1.0 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g	
Para medio sólido añadir 12-15 g de agar		

Para el tejido vegetal:

- Medio MS líquido, pH 5.7 con 3% de sacarosa (En frascos pequeños con 45 mL)
- Medio MS pH 5.7 con 3% de sacarosa y 8 gL⁻¹ de agar como gelificante (En cajas petri)
- Medio MS líquido, pH 5.7 con 3% de sacarosa y 500 mgL⁻¹ de Claforán² (Frasco Gerber).
- Medio MS, pH 5.7 con 3% de sacarosa, 8 gL⁻¹ de agar como gelificante, 2 mgL⁻¹ de AIA, 1 mgL⁻¹ de BA, 250 mgL⁻¹ de Claforán y 50 mgL⁻¹ Kanamicina (Frascos Gerber con 30 mL de medio)
- Medio MS, pH 5.7 con 3% de sacarosa, 8 gL⁻¹ de agar como gelificante, 250 mgL⁻¹ de Claforán y 50 mgL⁻¹ Kanamicina (Frascos Gerber con 30 mL de medio)

Para la preparación del medio MS consultar Capítulo 1 de esta obra.

1 O los antibióticos necesarios dependiendo de la cepa seleccionada.

2 Claforán: Antibiótico usado para eliminar a *A. tumefaciens* después del cocultivo.

Procedimiento

1. Para obtener la suspensión bacteriana, inocular una colonia de *A. tumefaciens* en 50 mL de medio YEB líquido e incubar a 28°C con agitación continua, esto debe hacerse 72 horas antes de la transformación.
2. Agregar 50 µL de acetosiringona 100 mM y 5 mL del cultivo bacteriano a un frasco del medio de cultivo (a).
3. Procesar los explantes y depositarlos en el medio (a) con acetosiringona y la bacteria. Para obtener los explantes: Tomar hojas de plantas de violeta africana o gloxínea establecidas *in vitro*. Eliminar los bordes y hacer 2-3 heridas por el envés de la hoja a lo largo de la lámina. Hacer cortes limpios con bisturí evitando aplastar el tejido.
4. Mantener los explantes en el medio (a) con acetosiringona y bacteria 30 minutos a partir de que se introdujo el último.
5. Sacar los explantes de la suspensión bacteriana, secar el exceso de líquido colocándolos suavemente sobre gasa estéril y transferirlos a las cajas con medio sólido sin antibióticos (b).
6. Mantenerlos por 24-72³ horas en la obscuridad a 26 °C (Cocultivo).
7. Transferir los explantes al medio (c) y mantenerlos en el mismo por 2 hrs bajo agitación suave.
8. Transferir los explantes al medio (d), máximo 2 explantes por recipiente. Incubarlos a 26 °C con fotoperiodo. En caso de observarse crecimiento bacteriano repetir los pasos 7 y 8. En caso contrario, subcultivar a medio fresco cada 12 días hasta observar la aparición de brotes, presuntamente transformados.
9. Colectar los brotes, individualizarlos y colocarlos en posición vertical en el medio medio (e) para su enraizamiento.
10. Una vez que los brotes enraícen y alcancen unos 15-20 mm de altura, coleccionar un segmento de hoja de cada uno de ellos y llevar a cabo un ensayo histoquímico para detectar actividad de GUS.

3 El tiempo de cocultivo dependerá de la cepa y concentración bacteriana utilizada. Se recomienda llevar a cabo un experimento probando 24, 48 y 72 h de cocultivo. Un tiempo corto de cocultivo genera una baja eficiencia de transformación. Un tiempo demasiado largo hace muy difícil eliminar a la bacteria una vez concluido y puede generar necrosis en el tejido.

Protocolo 12.2

Ensayo histoquímico para β -glucoronidasa (gus).

Solución de reacción

Para preparar 1 mL

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Buffer fosfatos 1M	100 μ L	100 mM
EDTA 0.25 M	40 μ L	10 mM
Ferrocianuro de potasio 5 mM	100 μ L	0.5 mM
Ferricianuro de potasio 5 mM	100 μ L	0.5 mM
Triton 10%	10 μ L	0.1 %
X-gluc 40 mM	50 μ L	2.0 mM
Agua desionizada	600 μ L	

Procedimiento

1. Tomar un fragmento de tejido vegetal y colocarlo en el fondo de un tubo para microcentrífuga.
2. Cubrir el tejido con la solución e de reacción e incubar a 37 °C hasta que aparezca un precipitado azul en el tejido transformado. Esto sucede entre las 2 y 12 horas de incubación, dependiendo de la velocidad de penetración del sustrato al tejido, normalmente la coloración comienza a aparecer en las heridas.
3. Detener la reacción eliminando la solución y cubriendo el tejido con etanol al 70%. En el caso de tejidos verdes, cambiar varias veces el etanol para eliminar los pigmentos fotosintéticos que pueden encubrir el color azul producto de la reacción.
4. El tejido se puede conservar por tiempo indefinido en etanol al 70%.

Preparación de las soluciones

Buffer fosfatos 1M.

Fosfato monobásico de Na 12.0 g disueltos en 100 mL de agua desionizada

Fosfato dibásico de Na 14.2 g disueltos en 100 mL de agua desionizada

Añadir el primero al segundo hasta alcanzar un pH de 7

EDTA 0.25 M.

0.465 g/50 ml de buffer fosfatos 100 mM pH 7

Ferrocianuro de potasio 5 mM.

105 mg disueltos en 50 mL de buffer fosfatos 100 mM pH 7

Ferricianuro de potasio 5 mM.

82.5 mg disueltos en 50 mL de buffer fosfatos 100 mM pH 7

X-Gluc 40 mM.

5.2 mg disueltos en 250 μ L de dimetilformamida⁴

Abreviaturas

ADN-T: ADN transferible. Porción del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, del Ri de *A. rhizogenes*, o de un vector binario, que se transfiere al genoma de la célula vegetal.

GUS: Enzima β -glucuronidasa.

Ri: Plásmido inductor de raíces de *Agrobacterium rhizogenes*.

rol: Genes de *Agrobacterium rhizogenes* que al ser transferidos al genoma vegetal confieren el fenotipo de raíz pilosa.

Ti: Plásmido inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*.

vir: Genes de virulencia de *Agrobacterium*.

4 Verificar la forma de solubilizar en las instrucciones del producto. Las características de solubilidad varían de acuerdo a la marca comercial del sustrato.

Bibliografía

- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molec. Breeding*, 15:305-327.
- Badr, Y., Kereim, M., Yehia, M., Fouad, O. and Bahieldin, A. (2005). Production of fertile transgenic wheat plants by laser micropuncture. *Photochem Photobiol Sci*; 4(10):803–7.
- Beranova, M.; Rakousky, S.; Vavrova, Z.; Skalicky, T. (2008). Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 94(3), 253-259.
- Bolívar-Zapata, F.G. (Coordinador). (2017). *Transgénicos: Grandes beneficios, ausencia de daños y mitos*. Academia Mexicana de Ciencias, A.C. 497 pp.
- Bower, R., Birch, R. (1992). Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J*, 2:409–16.
- Brandenberg, O., Dhlamini, Z., Sensi, A., Ghosh, K., Sonnino, A. (2011). *Introduction to molecular biology and genetic engineering*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Broothaerts, W., Mitchell, H., Weir, b., Kaines, S., Smith, l., Yang, W., Mayer, J., Rodriguez, C., Jefferson, R. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433:629-633.
- Burlaka, O.M., Pirko, Y.V., Yemets, A.I., Blume, Y.B. (2015). Application of Carbon Nanotubes for Plant Genetic Transformation. O. Fesenko, L. Yatsenko (eds.), *Nanocomposites, Nanophotonics, 233 Nanobiotechnology, and Applications*, Springer Proceedings in Physics 156, Springer International Publishing Switzerland. pp 233-255.
- Canche-Moo, R., Ku-Gonzalez, A., Burgeff, C., Loyola-Vargas, V., Rodríguez-Zapata, L. and Castaño, E. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell Tiss Org Cult*; 84(3):373–377.
- Chaparro-García, A., Kamoun, S., Nekrasov, V. (2015). Boosting plant immunity with CRISPR/Cas. *Genome Biology*, 16:254.
- Christou P., Ford T.L., Kofron, M. (1991). Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica

- varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Biotechnology*, 9:957–962.
- Chumakova, M.I., Moiseeva, E.M. (2012). Technologies of *Agrobacterium* Plant Transformation In planta. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48:657–666.
- Dandekar, A.M. (1992). Transformation. In: *Biotechnology of perennial fruit crops*. Hammerschlag, F.A., Litz, R.E. (Eds). CAB International, Cambridge. pp. 141-168.
- Danilova, S. (2007). The technologies for genetic transformation of Cereals. *Russian J. Plant Physiol.*, 54(5):569-581.
- Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X *et al.* (2015) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* 87:99–110.
- Gelvin, S. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene- Jockeying” Tool. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 67(1),16-37.
- Georgiev, M.I., A.I. Pavlov, T. Bley. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1175-1185.
- Gosal, S.S., Wani, S.H. (2018). Plant Genetic Transformation and Transgenic Crops: Methods and Applications. S. S. Gosal, S. H. Wani (eds.), *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2*, Springer International Publishing AG. pp. 1-23.
- Griesbach, R., Hammond, J. (1994). An improved method for transforming plants through electrophoresis. *Plant Sci.*; 102 (1):81–9.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T., Walden, R. (1986). “Agroinfection,” an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3282–3286. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3282>
- Hagio T., Hirabayashi T., Machii H. & Tomotsune H. (1995). Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants using the hygromycin resistance marker. *Plant Cell Rep.*, 14:329–34.
- Holm, P., Olsen, O., Schnorf, M., Brinch-Pedersen, H. and Knudsen, S. (2000). Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res.*; 9 (1):21–32.

- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2020) Disponible en internet en <http://www.isaaa.org/>. (acceso 31/01/2020).
- Jauhar, P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. *Crop Sci.*, 46: 1841-1859.
- Jinturkar, K. A., Rathi, M. N., Misra, A. (2011). Gene Delivery Using Physical Methods. In *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, pp. 83-126.
- Kavipriya, C., Yuvaraja, A., Senthil, K., Menaka, C. (2019). Genetic Transformation Methods for Crop Improvement: A Brief Review. *Agricultural Reviews*, 40(4): 281-288.
- Kim, Y.J., B.E. Wyslouzil, P.J. Weathers. (2002). Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:1-10.
- Kohler, F., Golz, C., Eapen, S., Kohn, H. and Schieder, O. (1987). Stable transformation of mothbean (*Vigna aconitifolia*) via direct gene transfer. *Plant Cell Rep.* 6: 313-7.
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., Komari, T. (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiol.*, 145:1155-1160.
- Liu, L., Fan, X.D. (2014). CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. *Plant Mol. Biol.* 85:209-218.
- Mohan Babu, R., Sajeena, A., Seetharaman, K., Reddy, M. S. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an overview. *Crop Protection*, 22(9):1071-1086.
- Pérez-Molphe-Balch, E. 2017. Capítulo V. Transformación genética: aplicaciones en la agricultura. en: *Fundamentos de Biotecnología Vegetal*. Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo Hernández, G., Castellanos-Hernández, O. (Eds). Universidad de Guadalajara, ISBN: 978-607-742-970-8. pp. 99-122.
- Petolino, J., Nicole, A. (2009). Whiskers-Mediated Maize Transformation. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 526. 59-67. 10.1007/978-1-59745-494-0_5.
- Rao, A., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A., Husnain, T., Riazuddin, S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechn. Adv.*, 27:753-763.

- Rivera, A.L., Gomez-Lim, M., Fernandez, F., Loske, A.M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Phys. Life Rev.*, 9:308–345.
- Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A.M. (2014). Genetic transformation of cells using physical methods. *J. Genet. Syndr. Gene Ther.*, 5: 237.
- Sanford, J. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 36:303-308.
- Schimpl, S., Puchta, H. (2016). Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 12:1-9.
- Somers, D.A., Rines, H.W., Gu, W., Kaeppler, H.F., ushnell, W.R. (1992). Fertile, transgenic oat plants. *Biotechnology*, 10, 1589–94.
- Sorokin, A., Ke, X., Chen, D., and Elliot, M. (2000). Production of fertile wheat plants via tissue electroporation. *Plant Sci.* 2000; 156 (2):227–33.
- Taylor, N., Fauquet, C. (2002). Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology*, 21:963-977.
- Tempe, J. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: Agrobacterium Ri plasmids. In. [Schell, J., I.K. Vasil] Eds. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 6. Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*. Academic Press. San Diego. pp. 26-51.
- Twyman, R.M., Christou, P. (2004). Plant transformation technology: particle bombardment. In *Handbook of Plant Biotechnology*, eds. Christou P., Klee H. John Wiley & Sons Inc., NY, pp. 263–89.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genetics*, 20(8):375-383.
- Valentine, L. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* and the Plant: The David and Goliath of Modern Genetics. *Plant Physiol.*, 33:948-955.
- Van der Salm, T.P.M., C.H. Hanish ten Cate, H.J.M. Dons. (1996). Prospects for application of *rol* genes for crop improvement. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14:207-228.
- Vasil, V., Castillo, A., Fromm, M., Vasil, I. (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Biotechnology*, 10:667–74.
- Veena, V., C.G. Taylor. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43:383-403.

- Yusibov V., Shivprasad S., Turpen T.H., Dawson W., Koprowski H. (2000). Plant Viral Vectors Based on Tobamoviruses. In: Hammond J., McGarvey P., Yusibov V. (eds) *Plant Biotechnology. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 240. Springer, Berlin, Heidelberg
- Zhu, Z., Sun, B., Liu, C., Xiao, G., and Li, X. (1993). Transformation of wheat protoplasts mediated by cationic liposome and regeneration of transgenic plantlets. *Chin J Biotechnol.*, 9:257–61.