

Optimisation de la transformation génétique de la pomme de terre par *Agrobacterium tumefaciens*. Utilisation de la résistance à l'hygromycine comme marqueur sélectif

Mahmoud M'Hamdi ^(1, 2), Claire Rouvière ⁽²⁾, Jorge Rojas-Beltran ⁽²⁾,
Patrick du Jardin ⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire d'Horticulture. École supérieure du Kef. 7119 Boulifa Kef (Tunisie).

⁽²⁾ Unité de Biologie végétale. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : dujardin.p@fsagx.ac.be

Reçu le 16 mai 2003, accepté le 28 juillet 2003

Ce travail a pour objectif la mise au point d'un protocole de transformation génétique et de régénération de plantes transgéniques chez *Solanum tuberosum* cv Désirée en utilisant la résistance à l'hygromycine comme marqueur sélectif des cellules transformées. Le gène Cat2 de *Nicotiana plumbaginifolia* et le gène SU2 de *Gossypium hirsutum* codant pour des catalases ont été utilisés. Deux concentrations d'antibiotique (5 et 10 mg·l⁻¹ de milieu de culture) associées à deux durées de préculture (4 et 20 jours) sur milieu non sélectif ont été testées. Le milieu de coculture a été additionné de 10 mg·l⁻¹ d'acétosyringone pour tester son effet sur la transformation de la pomme de terre. L'addition de cette substance phénolique au milieu de coculture a affecté positivement l'aptitude à la régénération de plantules transgéniques SU2. Seule l'association d'une dose de 5 mg·l⁻¹ d'hygromycine à 20 jours de préculture sans antibiotique a permis l'obtention de plantules transformées avec le gène SU2. Le criblage par PCR des pousses enracinées montre 45 % de plantes transgéniques pour chacune des deux constructions moléculaires introduites.

Mots-clés. *Solanum tuberosum*, transformation génétique, hygromycine, acétosyringone, milieu de culture.

Optimization of potato genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* using hygromycin resistance as selective marker. The objective of this work is the optimization of a genetic transformation and a regeneration protocol of transgenic plants in *Solanum tuberosum* cv Désirée using hygromycin resistance as selective marker. The gene Cat2 of *Nicotiana plumbaginifolia* and the gene SU2 of *Gossypium hirsutum*, both coding for catalases, have been used. Two antibiotic concentrations (5 and 10 mg·l⁻¹ of culture medium) combined with two preculture periods (5 and 20 days) on non-selective medium were tested. Coculture medium was supplemented with 10 mg·l⁻¹ of acetosyringone to test its effect on potato transformation. The addition of this phenolic compound to the coculture medium affected positively the regeneration aptitude of transgenic SU2 plants. Only the combination of 5 mg·l⁻¹ of hygromycin and 20 days of preculture without antibiotic allowed the obtention of plants transformed with the gene SU2. Screening of the rooted shoots with PCR showed 45% of transgenic plants for both molecular constructions used.

Keywords. *Solanum tuberosum*, genetic transformation, hygromycin, acetosyringone, culture medium.

1. INTRODUCTION

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) occupe actuellement la quatrième place dans l'alimentation humaine après le blé, le maïs et le riz. Les caractéristiques génétiques et biologiques de cette espèce, à savoir, le grand nombre de cultivars mâles stériles, le degré élevé d'hétérozygotie et l'importante interaction génotype*environnement, limitent l'utilisation des techniques conventionnelles d'amélioration (Ross, 1986). Pour surmonter ces barrières, de nouvelles

approches ont été développées telles que l'hybridation somatique, la mutagenèse et la transgénèse (De Block, 1988 ; Kuipers *et al.*, 1994 ; Carputo *et al.*, 1998).

La transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens* est largement utilisée par de nombreux laboratoires de biotechnologie pour le transfert de gènes aux cellules végétales. Elle permet l'obtention, avec une fréquence élevée, de transformants intégrant une seule copie d'ADN-T dans leur génome ; situation favorable à la valorisation ultérieure de ces lignées en sélection par hybridation. Cependant, l'efficacité de

cette technique reste influencée par de nombreux facteurs incluant l'espèce ou la variété à transformer, la souche de bactérie utilisée, le type de matériel végétal et la présence dans le milieu de coculture de substances inductrices des gènes de virulence, plus particulièrement l'acétosyringone (Wenck *et al.*, 1999).

La résistance à la kanamycine comme marqueur sélectif des cellules végétales transformées est couramment utilisée. Récemment, Chamnongpol *et al.* (1996) ont cloné deux gènes d'intérêt agronomique Cat2 et SU2 dans les vecteurs binaires pCAT 2AS et pCATGH, qui confèrent la résistance à l'hygromycine et ont étudié l'impact de la modification d'activité catalase chez *Nicotiana tabacum*. Dans l'optique d'étudier le rôle de ces enzymes antioxydantes chez la pomme de terre, l'utilisation du protocole de transformation génétique appliqué sur *Nicotiana tabacum*, n'a pas donné de résultat chez le cultivar Désirée de pomme de terre ; la mise au point d'un protocole utilisant l'hygromycine comme marqueur de sélection s'est avérée nécessaire afin d'utiliser ces constructions.

L'ajustement de la dose d'hygromycine utilisée comme antibiotique sélectif des cellules transformées d'une part, et la détermination du stade optimum d'application de cette pression de sélection sur les explants transformés, d'autre part, constituent les principaux objectifs de cette étude.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique

Une dérivée de la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* renfermant le plasmide désarmé pGV4000 de type nopaline a été utilisée dans notre travail de transformation génétique du cultivar Désirée de *S. tuberosum* (Deblaere *et al.*, 1985 ; Koncz, Schell, 1986). Elle renferme l'un des deux vecteurs binaires pCAT2AS ou pCATGH où se trouvent clonés respectivement les gènes Cat2 et SU2. Ces deux gènes qui codent respectivement pour la catalase 2 de *N. plumbaginifolia* et pour une catalase de *Gossypium hirsutum* (Chamnongpol *et al.*, 1996) nous ont été fournis par le Dr. D. Inzé de l'Université de Gand et ont été utilisés dans nos essais de transformation génétique.

2.2. Milieux de culture (Tableau 1)

2.3. Transformation des cellules végétales

Le protocole de Beaujean *et al.* (1998) a été adopté. Une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche C58 renfermant le vecteur binaire pCAT2AS ou pCATGH a été réalisée dans 2 ml de milieu YEB (Yeast Extract Beef extract) liquide additionné de 100 mg·l⁻¹ de

Tableau 1. Composition des milieux de culture — *Composition of culture media.*

Composition (mg·l ⁻¹)	MBO	PACM	R3B	PCM	PSM
Sels	MS	MS	MS	MS	MS
Saccharose	20 10 ³	20 10 ³	20 10 ³	20 10 ³	20 10 ³
Myo-inositol	100	100	100	100	100
Thiamine HCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Pyridoxine HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Acide nicotinique	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glycine	2	2	2	2	2
2,4 D		1	-	2	-
ANA	-	-	2	-	-
ZR	-	-		0,8	1,6
AG3	-	-		-	2
BAP	-	-	1	-	-
Kinéline		0,5			
0,8 % d'agar					
pH 5,8					

ANA = acide -naphtaline acétique; ZR = zéatine riboside ;

AG3 = acide gibberellique ; BAP = benzyle aminopurine ;

2,4 D= 2,4-dichloro-phenoxy acide acétique.

streptomycine. Après agitation de la culture pendant 48 h à 28 °C, 30 ml de milieu YEB frais sont inoculés par 300 ml de la culture de bactérie de 48 h et placés dans les mêmes conditions jusqu'à atteindre une DO600 de 0,7. Après centrifugation à 4 °C durant 10 min et à une vitesse de 2500 g, le culot est solubilisé dans 10 ml de MgSO₄ 10mM. On centrifuge une deuxième fois dans les mêmes conditions et on suspend le culot dans 30 ml de sels de MS additionnés de 100 mg·l⁻¹ de myo-inositol et 30 g·l⁻¹ de glucose.

Les explants à infecter sont constitués d'entre-nœuds prélevés sur des plantes en culture *in vitro* et préalablement conditionnés 24 h avant l'infection sur papier filtre imbibé de 2 ml de milieu PACM liquide et placé sur le milieu R3B. Les entre-nœuds sont ensuite immergés pendant 10 minutes dans une solution de 18 ml de MS et 2 ml de la suspension de bactéries précédemment préparée et maintenue durant 1 h à l'obscurité. Après séchage sur papier filtre, les explants sont transférés au milieu PCM additionné de 10 mg·l⁻¹ d'acétosyringone à raison de 10 explants par boîte et maintenus durant 48 h à l'obscurité et une température de 21 °C. Au terme de deux jours, on réalise un lavage des explants par 30 ml de sels de MS additionnés de 30 g·l⁻¹ de glucose et 1 g·l⁻¹ de cefotaxime et on les transfère sur milieu frais PCM pendant 4 jours. Au terme de cette période, les explants sont transférés au milieu PSM sans hygromycine pendant 4 ou 20 jours. À une température de 23 °C et une photopériode de 16 h d'éclairement sur 24 h, des cals commencent à apparaître et les explants sont

transférés sur milieu PSM additionné de 5 ou 10 mg.l⁻¹ d'hygromycine (§ 2.4). Les pousses qui apparaissent sur milieu PSM, sont repiquées sur milieu MBO additionné de 5 mg.l⁻¹ d'antibiotique sélectif pour les transformants de Cat2 et sans hygromycine pour ceux de SU2.

2.4. Mise au point d'un protocole de transformation

Différentes doses d'hygromycine et différents stades d'application ont été testés : 5 et 10 mg.l⁻¹ ont été appliqués après 4 ou 20 jours de culture des explants sur milieu PSM non sélectif. Dans les conditions de régénération avec 5 mg.l⁻¹ d'hygromycine et 20 jours de culture sur milieu non sélectif, l'effet de l'acétosyringone sur l'amélioration du taux de transformation a été testé. Le milieu de coculture a été additionné de 10 mg.l⁻¹ de ce composé phénolique sous forme de 3,5-diméthoxy-4hydroxy-acétophone (Fluka) avec un contrôle négatif sans acétosyringone. Cette concentration a été préconisée en coculture par Wenck *et al.* (1999).

Au cours des différents essais de transformation, nos observations ont porté sur le nombre de cals formés, le nombre de pousses régénérées, le nombre de plantes enracinées et celui de plantes transgéniques pour les gènes d'intérêt.

2.5. Caractérisation des plantes régénérées

La technique de PCR a été utilisée pour caractériser le matériel végétal développé sur milieu sélectif. La détection des transgènes à partir de l'ADN total extrait des feuilles selon le protocole de Keith (1998) a été effectuée en utilisant des amorces amplifiant des fragments de 1500 pb. Les séquences des amorces employées ont été déterminées avec le logiciel PRIMER SELECTION de BEN.

Pour le gène Cat2, le couple d'amorce suivant a été utilisé :

- 1) forward 5' ATACCATGGATCCCTCTAAGTTTCGA 3'
- 2) reverse 5' ACATGCATGCATGTTTACATTGTAGG 3'

Pour le gène SU2, le couple d'amorce suivant a été utilisé :

- 1) forward 5' TCTTCTGGTACCATGGATCCTT 3'
- 2) reverse 5' AGCATGCATCAATGCTTGGTCTAACATTG 3'

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans nos essais de transformation avec le gène SU2 où les explants ont été transférés, après 4 jours de culture sur milieu non sélectif, sur celui renfermant 5 ou 10 mg.l⁻¹ d'hygromycine, aucune régénération n'a été obtenue et tous les explants ont dégénéré. Cette

dégénérescence est plus rapide sur le milieu additionné de 10 mg.l⁻¹ d'antibiotique que sur celui renfermant 5 mg.l⁻¹, où les entrenœuds peuvent former de petits cals qui finissent par dégénérer. Il s'avère donc que ces concentrations en antibiotique dans le milieu de culture, associées à une période de 4 jours de culture sur milieu non sélectif, ne permettent pas la régénération de plantules transformées.

La prolongation de la durée de culture sur milieu sans hygromycine à 20 jours a amélioré la formation des cals qui prennent naissance sur les extrémités des entrenœuds. Après cette période, les explants transférés sur milieu PSM additionné de 10 mg.l⁻¹ d'antibiotique dégénèrent rapidement, alors que ceux repiqués sur milieu PSM additionné de 5 mg.l⁻¹ d'hygromycine ont développé des cals et ont produit des plantes.

3.1. Induction de cals

La comparaison des moyennes du nombre de cals formés en utilisant le test de Student montre une différence hautement significative ($p = 0,01$) entre le témoin et les explants transformés (**Tableau 2**). Ces moyennes représentent le rapport du nombre d'entrenœuds ayant donné des cals sur le nombre total d'explants mis en culture, qui ont été de 0,96 et 0,35 respectivement pour le témoin et les transformants.

L'apparition des cals a eu lieu sur les deux extrémités des entrenœuds. Leur initiation commence plus tardivement chez les transformants que chez le

Tableau 2. Nombre de régénérations *in vitro* et pourcentage de transformation génétique avec les gènes Cat2 et SU2 — *Number of in vitro regenerations and percentage of genetic transformation with Cat2 and SU2 genes.*

Paramètres observés	Cat2	SU2	Témoin
Nombre initial d'explants utilisés	290	250	20
Nombre moyen de cals/explant	0,4 ± 0,05	0,3 ± 0,01	0,96 ± 0,03
Nombre moyen de régénérations/explant	1,9 ± 0,01	0,73 ± 0,05	9,2 ± 0,8
Nombre moyen de plantes/explant	0,82 ± 0,1	0,45 ± 0,03	8,7 ± 0,6
Pourcentage de plantes transgéniques positives en PCR pour le gène d'intérêt (%)	45 % ± 5 %	45 % ± 5 %	-
Nombre total de lignées distinctes ayant incorporé le transgène d'intérêt	23	19	-

témoin constitué d'entre-nœuds non cocultivés avec les souches de bactéries utilisées et développés sur milieu de culture non sélectif. Après leur apparition, les cals continuent à se développer pour atteindre leurs dimensions définitives au bout de 8 semaines de la mise en culture chez le témoin et au bout de 11 à 12 semaines chez les explants transformés. Le diamètre final des cals est d'environ 1,0 ; 0,7 et 0,5 cm respectivement chez le témoin, les entre-nœuds transformés par le gène Cat2 et ceux transformés par le gène SU2. La réduction de la croissance du cal chez les explants transformés est probablement un effet de l'antibiotique additionné au milieu de culture comme marqueur de sélection. Des observations similaires ont été constatées notamment par Orlikowska *et al.* (1995).

3.2. Régénération et développement de plantes

Comme l'induction de cals, l'apparition des pousses commence trois à quatre semaines plus tard chez les explants transformés par rapport au témoin. L'évolution de l'apparition des régénérations en fonction du temps aussi bien pour le témoin que les explants transformés suit une courbe avec une première phase croissante qui s'étend sur trois à quatre semaines chez le témoin et se prolonge jusqu'à 2 mois chez les transformants. La fin de cette phase est marquée par le maximum de régénération, suivie d'une phase décroissante qui dure légèrement plus longtemps chez les cals transformés par rapport au contrôle (**Figure 1**). À ce stade, les cals ont atteint leurs dimensions définitives. Les entre-nœuds commencent à dégénérer et prennent une coloration brunâtre, pouvant être associée au dégagement d'éthylène et à la reprise de la multiplication d'*Agrobacterium*, ce qui pourrait gêner les cals et la régénération (Prunhauser *et al.*, 1987). Ces

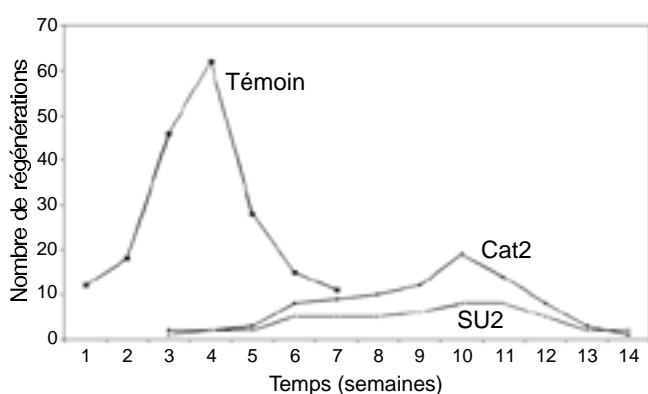


Figure 1. Évolution de l'apparition des régénérations au cours du temps chez 20 cals du témoin, de SU2 et de Cat2 (temps initial : apparition de la première pousse) - Evolution of appearance of new shoots on 20 callus from control, SU2 and Cat2 (initial time: appearance of the first shoot).

derniers auteurs préconisent l'addition au milieu de culture de composés comme le nitrate d'argent dont le cation Ag^{++} bloque l'action de l'éthylène.

La comparaison des moyennes du nombre de régénérations produites par cal en utilisant le test de Student montre une différence hautement significative entre le témoin et les cals transformés (**Tableau 2**).

L'analyse du pourcentage de plantes produites a été effectuée séparément pour les deux gènes. Ce pourcentage a été de 43 % et 62 % respectivement avec le gène Cat2 et SU2. Les différences observées entre le nombre de régénérations et de plantes produites peuvent s'expliquer en partie par le fait que les cals sont formés par un ensemble de cellules juxtaposées. Ainsi, certaines d'entre elles bien qu'elles ne soient pas transformées peuvent échapper à l'antibiotique sélectif et régénèrent des pousses. Cependant, l'enracinement s'effectue individuellement pour chaque pousse et l'effet de l'agent sélectif est plus efficace. Steikema *et al.* (1988) rapportent que les racines sont beaucoup plus sensibles aux antibiotiques que les cals et les régénérations, et que le criblage des plantes transformées est beaucoup plus fiable durant la phase d'enracinement.

L'enracinement des pousses aussi bien pour le gène Cat2 que SU2, a été réalisé séparément pour chaque cal. Les plantes transgéniques issues de cals différents sont considérées comme autant de lignées distinctes.

3.3. Caractérisation des plantes

Le criblage par PCR du matériel végétal régénéré pour les constructions introduites, révèle 45 % de plantes transgéniques tant pour le gène SU2 que pour Cat2, soit au total 19 lignées transgéniques distinctes pour la première construction et 23 pour la seconde.

Les différences notées entre le nombre de plantes produites sur milieu additionné d'hygromycine et celles positives en PCR, peuvent s'expliquer par le transfert préférentiel de l'ADN-T du bord droit au bord gauche (Wang *et al.*, 1984). En effet dans les vecteurs binaires que nous utilisons, le gène conférant la résistance à l'hygromycine se trouve plus proche du bord droit que les gènes Cat2 ou SU2 et certaines plantes ne peuvent intégrer dans leur génome que le gène de résistance à l'antibiotique.

3.4. Effet de l'acétosyringone sur l'efficacité de la transformation génétique

Dans nos études, le traitement des explants à l'acétosyringone à une concentration de $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ lors de la coculture avec *A. tumefaciens* a amélioré nettement la capacité d'induction de cals, de régénération de pousses (**Figure 2**) et a affecté positivement l'aptitude à la régénération de plantes transgéniques (**Figure 3**).

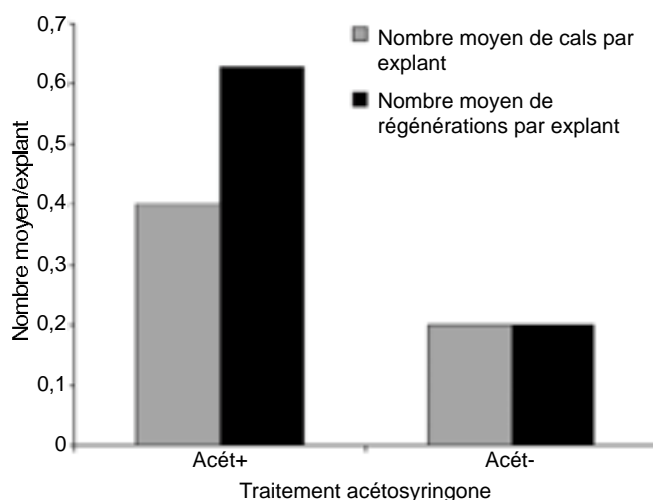


Figure 2. Effet de l'acétosyringone sur l'induction de cals et la régénération chez les explants transformés avec le gène SU2 — *Acetosyringone effect on callus induction and shoot regeneration of explants transformed with the SU2 gene.*

chez *Solanum tuberosum*, var. Désirée. Ces résultats concordent avec ceux de Wenck *et al.* (1999) qui ont testé différentes concentrations de cette substance, allant de 0 à 100 mmol.l⁻¹ de milieu de coculture, sur l'efficacité de la transformation de *Picea abies* et *Pinus taeda*. Ils indiquent qu'à concentration réduite, le taux d'amélioration de la transformation reste faible, suite probablement à une faible induction des gènes de virulence et qu'à forte dose, l'induction de cals et la régénération de plantules transformées sont contrariées par la phytotoxicité de cette substance.

En plus de son effet sur le nombre de cals induits, l'acétosyringone affecte positivement la croissance et les dimensions finales de ceux-ci (résultat non montré). Turk *et al.* (1993) rapportent que le spectre de pathogénicité limité d'*A. tumefaciens* est dû probablement à la non-induction du promoteur de virA. En outre, des composés phénoliques comme l'acétosyringone et des sucres tels que le glucose et l'acide glucuronique semblent être impliqués dans l'expression des gènes virA, virG et chvE et augmentent l'excision de l'ADN-T (Orlikowska *et al.*, 1995).

4. CONCLUSION

Seule l'association d'une concentration d'antibiotique sélectif de 5 mg.l⁻¹ de milieu de culture avec une durée de préculture de 20 jours sans hygromycine et de 10 mg.l⁻¹ d'acétosyringone au milieu de coculture a permis l'obtention de plantules transgéniques avec le gène SU2. Quant au gène Cat2 nous avons constaté une amélioration nette du taux de régénération de plantules transformées.

L'addition au milieu de coculture de l'acétosyringone à une concentration de 10 mg.l⁻¹ de milieu a

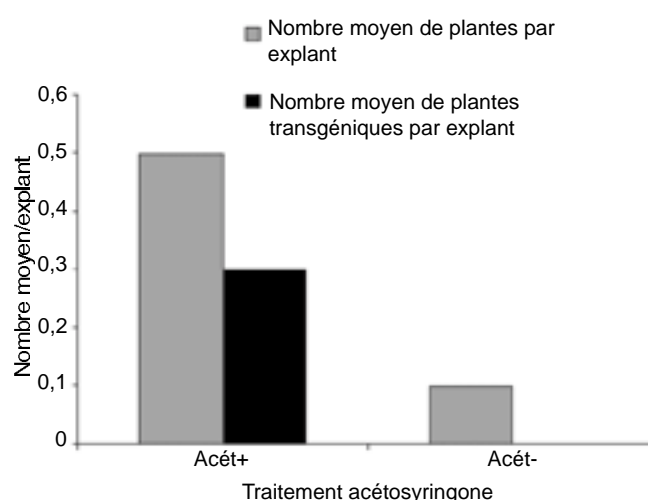


Figure 3. Effet de l'acétosyringone sur le nombre de plantes enracinées et le nombre de plantes transgéniques SU2 produites — *Acetosyringone effect on the rooting of shoots and the production of SU2 transgenic plants.*

nettement amélioré le taux d'induction de cals, de régénération et de production de plantes transformées avec le gène Cat2, et a permis l'obtention de plantes transformées avec le gène SU2.

Remerciements

M. M'Hamdi remercie le Commissariat général aux Relations internationales qui l'a pris en charge durant la réalisation de ce travail et la Région wallonne (contrat 961/3453) pour le soutien financier. Remerciements au Dr D. Inzé de l'Université de Gand qui nous a aimablement fourni les vecteurs pCATGH et pCAT2AS et à toute l'équipe de l'Unité de Biologie végétale, particulièrement R. Kissen et J. C. Martiat pour l'aide apportée.

Bibliographie

- Beaujean A., Sangwan RS., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel BS. (1998). *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *J. Exp. Bot.* **49**, p. 1589–1595.
- Carpato D., Garreffa P., Mazzei M., Monti L., Cardi T. (1998). Fertility of somatic hybrids *Solanum commersonii* (2x, 1 EBN) (+) *S. tuberosum* haploid (2x, 2 EBN) in intra and inter- EBN cross. *Genome* **41** (6), p. 776–781.
- Chamnongpol S., Willekens H., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1996). Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* **10**, p. 491–503.

- Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. (1985). Efficient octopine Ti-plasmid derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.* **13**, p. 4777–4778.
- De Block M. (1988). Genotype-independent leaf transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* **76**, p. 767–774.
- Keith JE. (1998). Miniprep procedures for the isolation of plant ADN. In A. Karp, PG. Isaac, DS. Ingram (Eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. London: Chapman & Hall.
- Koncz C., Schell J. (1986). The promotor of T_L-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, p. 383–389.
- Kuipers GJ. Anja, Soppe JJ. Win, Jacobsen E., Visser GF. Richard (1994). Field evaluation of transgenic potato plants expressing an antisense granule-bound starch synthase gene: increase of antisense effect during tuber growth. *Plant Mol. Biol.* **26**, p. 1759–1773.
- Orlikowska TK., Cranston HJ., Dyer WE. (1995). Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of the Safflower cultivar 'Centennial'. *Plant Cell Tissue Organe Cult.* **40**, p. 85–91.
- Purnhauser L., Medgyesy P., Czako M., Dix PJ., Marton L. (1987). Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep.* **6**, p. 1–4.
- Ross H. (1986). Potato breeding. Problems and perspectives. *Advances in plant breeding* **13**. Berlin, Humburg: Paul Parey, 132 p.
- Steikema WJ., Heidekamp F., Louverse JD., Verrhoeven HA., Dijkhuis P. (1988). Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Désirée using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Rep.* **7**, p. 47–50.
- Turk SCHJ., Nester EW., Hooykaas PJJ. (1993). The virA promoter is a host-range determinant in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* **7**, p. 719–724.
- Wang K., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Zambryski P. (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* **38**, p. 455–462.
- Wenck RA., Quin M., Whetten WR., Pullman G., Sederoff R. (1999). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Mol. Biol.* **39**, p. 407–416.

(15 réf.)