

Transformação de fungos filamentosos por *Agrobacterium*: O *Histoplasma* como modelo

Transformation of filamental fungi by *Agrobacterium*: *Histoplasma* as a model

Transformación de hongos filamentosos por *Agrobacterium*: *Histoplasma* como modelo

Recebido: 20/04/2022 | Revisado: 28/04/2022 | Aceito: 13/05/2022 | Publicado: 17/05/2022

Dayane Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1031-1465>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: dayanemoraes123@hotmail.com

Resumo

O *Histoplasma* é um fungo patogênico causador da histoplasmose, uma micose sistêmica endêmica devido à ocorrência/positividade em regiões específicas. A virulência desse fungo tem sido desvendada nos últimos anos auxiliados pelas técnicas de caracterização funcional genica, que utilizam da inativação gênica, por deleção, ou diminuição da produção dos produtos gênicos. Ferramentas moleculares de transformação gênica, como as transformações mediadas por *Agrobacterium* (ATMT), que favorece a formação de RNA interferência, tem garantido a expansão do conhecimento sobre mecanismos de virulência implementados por diferentes micro-organismos patogênicos, como o *H. capsulatum*. Na ATMT um fragmento de DNA é introduzido na célula alvo, quando a bactéria é estimulada por sinais químicos. O DNA se integra ao genoma e propicia o silenciamento gênico via RNAi, um método de redução do produto gênico, devido a degradação do mRNA, através da formação ou introdução de uma molécula de RNA de dupla fita no hospedeiro alvo, que são abominados pelas células eucarióticas. Para *Histoplasma* já foi amplamente demonstrada a habilidade dos RNAs de fita dupla, introduzidos pela técnica de ATMT, para desencadear depleção de muitos genes alvo, e favoreceu até o momento a melhor compreensão da flexibilidade metabólica desse patógeno.

Palavras-chave: Biologia molecular; Silenciamento; Virulência.

Abstract

Histoplasma is a pathogenic fungus that causes histoplasmosis, an endemic systemic mycosis due to the occurrence/positivity in specific regions. The virulence of this fungus has been revealed in recent years, aided by the techniques of functional gene characterization, which use gene inactivation, by deletion, or decrease in the production of gene products. Molecular tools for gene transformation, such as *Agrobacterium*-mediated transformations (ATMT), which favor the formation of RNA interference, have ensured the expansion of knowledge about virulence mechanisms implemented by different pathogenic microorganisms, such as *H. capsulatum*. In ATMT, a DNA fragment is introduced into the target cell when the bacterium is stimulated by chemical signals. DNA integrates into the genome and provides gene silencing via RNAi, a method of reducing the gene product, due to mRNA degradation, through the formation or introduction of a double-stranded RNA molecule into the target host, which are abhorred by cells eukaryotic. For *Histoplasma*, the ability of double-stranded RNAs, introduced by the ATMT technique, to trigger depletion of many target genes has been widely demonstrated, and so far has favored a better understanding of the metabolic flexibility of this pathogen.

Keywords: Molecular biology; Silencing; Virulence.

Resumen

Histoplasma es un hongo patógeno que causa histoplasmosis, una micosis sistémica endémica debido a la aparición/positividad en regiones específicas. La virulencia de este hongo se ha puesto de manifiesto en los últimos años, ayudado por las técnicas de caracterización genética funcional, que utilizan la inactivación genética, por delección o disminución de la producción de productos genéticos. Las herramientas moleculares para la transformación de genes, como las transformaciones mediadas por *Agrobacterium* (ATMT), que favorecen la formación de RNA de interferencia, han asegurado la ampliación del conocimiento sobre los mecanismos de virulencia implementados por diferentes microorganismos patógenos, como *H. capsulatum*. En ATMT, un fragmento de ADN se introduce en la célula objetivo cuando la bacteria es estimulada por señales químicas. El DNA se integra en el genoma y proporciona silenciamiento genético mediante RNAi, un método para reducir el producto genético, debido a la degradación del ARNm, mediante la formación o introducción de una molécula de RNA de doble cadena en el huésped objetivo, que las células eucariotas detestan. Para *Histoplasma*, la capacidad de los RNA de doble cadena, introducidos por la

técnica ATMT, para desencadenar el agotamiento de muchos genes diana ya ha sido ampliamente demostrada, y hasta ahora ha favorecido una mejor comprensión de la flexibilidad metabólica de este patógeno.

Palabras clave: Biología molecular; Silenciamiento; Virulencia.

1. Introdução

Os mecanismos de virulência de micro-organismos fúngicos começaram a ser elucidados apenas recentemente devido a aplicação/aprimoramento/empenho constante de técnicas/protocolos moleculares que auxiliam na caracterização funcional de genes produtores/controladores da virulência (Rappleye & Goldman, 2006). Especialmente em fungos dimórficos, como o *Histoplasma*, os detalhes que fundamentam a patogênese dessas espécies parecem incipientes em parte devido a disponibilidade limitada de metodologias genéticas por vezes onerosas ou ineficientes (Youseff, et al., 2009). O padrão ouro para provar o papel funcional, e, por consequência, a virulência de um produto gênico, está intimamente relacionado como os critérios do postulado de Koch, o qual determina que 1. a inativação do gene obrigatoriamente atenua a virulência desenvolvida pelo produto dessa sequência, enquanto 2. a restauração da virulência, a nível do tipo selvagem, necessariamente deve ocorrer após a reintrodução do gene codificador do produto virulento (Falkow, 1988). Contudo, a demonstração desses critérios depende da eliminação do gene alvo, e as técnicas de mutação por deleção em fungos dimórficos, por exemplo, resultam muitas das vezes em tentativas frustradas (devido a baixa preferência pela recombinação homóloga e alta frequência de recombinação não homóloga), impedindo avanço dos estudos a nível molecular nesses micro-organismos (Woods, et al., 1998, Youseff, et al., 2009). A técnica de interrupção de genes já foi demonstrada em *Histoplasma* (Sebghati, et al., 2000), mas permanece relativamente ineficiente proibindo a construção de bibliotecas em grande escala, como feito para *S. cerevisiae*, e dificultando a triagem fenotípica dessa espécie.

De maneira alternativa, em *Histoplasma*, já foram descritas diferentes ferramentas moleculares de transformação gênica, como através da 1. indução de células com acetato de lítio seguida da transformação com polietileno glicol (PEG-LiAc, Worsham & Goldman, 1990), ou 2. transformações mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT; Sullivan et al., 2002), ou 3. eletroporação (Woods, et al., 1998), através das quais puderam ser desenvolvidos estudos com genes repórteres (*lacZ*, *gfp*) (Kugler, et al., 2000, Gebhart, et al., 2006), RNA interferência (RNAi, Rappleye, et al., 2004, Garfoot, et al., 2017, Longo, et al., 2018), mutagênese de inserção randômica seguida de rastreamento (Marion, et al., 2006, Youseff, et al., 2009, Shen, et al., 2008) e microarranjos (Hwang, et al., 2003).

2. Metodologia

Trata-se de um trabalho descritivo, do tipo revisão narrativa. Para isso foram selecionados artigos científicos obtidos pela busca em bancos de dados (Pubmed e Google Acadêmico). Foram utilizados como critério de busca os descritores “*Agrobacterium*”, “*Histoplasma*” em associação com “transformação” ou “fungos”, nas línguas portuguesa e inglesa. Documentos não disponibilizados na íntegra ou que não fossem da língua inglesa ou portuguesa foram descartados dessa análise.

3. Resultados e Discussão

A transformação mediada por *Agrobacterium* está sendo cada vez mais usada para mutagênese de inserção aleatória, RNAi e expressão de genes repórteres em fungos que carecem de recombinação homóloga eficiente (revisado por Michelse, et al., 2005). Em fungos a transformação mediada por *Agrobacterium* foi inicialmente descrita em condições de laboratório em leveduras de *S. cerevisiae* (Bundock, et al., 1995) e desde então a ATMT foi demonstrada em várias outras espécies dos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (revisado por Michelse, et al., 2005).

A. tumefaciens é uma bactéria baciliforme gram-negativa patogênica de plantas nas quais induz a formação de tumores da doença da galha. Essa bactéria tem capacidade de manipulação genética de fungos devido a transferência de um fragmento de DNA (T-DNA: DNA transferido) do plasmídeo indutor de tumor (plasmídeo Ti) para o genoma dos seus hospedeiros. O plasmídeo Ti contém genes de virulência (genes *vir*) envolvidos na preparação do DNA para transferência e na biossíntese do sistema de transporte transmembrana da bactéria para o hospedeiro transformado. Os elementos componentes do mecanismo de transporte do T-DNA são expressos quando a bactéria é estimulada por sinais químicos (laboratorialmente se usa compostos fenólicos como acetoseringona), os quais estimulam um sistema de transdução de sinal de dois componentes, sendo inicialmente detectados por uma histidina quinase (*virA*) (*chvE* interage com *virA* na presença de monossacarídeos específicos aumentando a taxa de indução), a qual é autofosforilada e depois ativa por transfosforilação (transferência do grupo fosforil) o ativador transcricional (*virG*). Esse fator de transcrição de ativação tem propriedades de ligação ao DNA e atividade de controle na produção dos genes de virulência, isso resulta na iniciação do processamento do T-DNA (corte nas bordas flanqueadoras direita e esquerda, pelas proteínas/endonucleases *virD2* e *virD1*, após a formação do complexo de relaxamento denominado relaxossomo) e na biossíntese de um canal transmembrana, pelo qual o DNA é transferido (mecanismo de secreção do tipo IV auxiliado pelas proteínas de virulência *virB1-11* e *virD4*, nesse caso, as proteínas *virB* formam um poro e uma estrutura de superfície chamada T-pilus processado através do *virB2* que atua como conduto para transferência do T-DNA, enquanto *virD4* auxilia na interação da fita do T-DNA com o complexo *virB*). O T-DNA que viaja para o hospedeiro permanece ligado a proteínas de virulência (*virD2* e *virE2*, enquanto o *virE2* protege o T-DNA da atividade contra nucleases e auxilia na manutenção do estado dobrado para facilitar o transporte através do poro, a *virD2A* aponta a direção do núcleo, pelo sinal de localização nuclear na porção C-terminal), por fim, esse complexo de Ti e proteínas é transportado para o núcleo pelo retículo endoplasmático, quando o componente proteico é desmontado pelo sistema ubiquitina-proteassoma, auxiliado por proteínas do complexo *vir* (*virF*) (revisado por Michelse, et al., 2005, Cangelosi, et al., 1990, Bako, et al., 2003, CItovsky, et al., 1989, Kado, 2000, Regensburg-Tuink & Hooykaas, 1993, Toro, et al., 1988, revisado por Zupan, et al., 2000).

O T-DNA se integra ao genoma do hospedeiro em uma posição aleatória, mas provavelmente em locais de quebra do DNA do hospedeiro causado por estresse ambiental. A integração do T-DNA em fungos ocorre por união de extremidades não homólogas (NHEJ), mas também é possível a integração direcionada do T-DNA por recombinação homóloga (HR). Os primeiros estudos com *Histoplasma* sugeriram que a transformação mediada por *Agrobacterium* causava inserções únicas de T-DNA com distribuição relativamente aleatória (Sullivan, et al., 2002), porém mais tarde foi demonstrado que a inserção do T-DNA no *Histoplasma* parece significativamente tendenciosa para regiões não codificantes a montante dos genes (região promotora até 800 pares de base) (Youseff, et al., 2009).

A transformação fúngica mediada por *A. tumefaciens* consiste em três etapas, 1.indução de uma cultura bacteriana contendo plasmídeos apropriados, 2.co-incubação da cultura com fungos frescos e a bactéria induzida em um suporte sólido e 3.seleção de transformantes em um meio com agentes de seleção. Na etapa de co-cultivo alguns fatores determinam a eficiência da ATMT, isso inclui a 1.proporção entre *A. tumefaciens* e o fungo receptor (o aumento na quantidade de *Agrobacterium* auxilia no aumento no número de transformantes, mas dificulta a eliminação da bactéria após o co-cultivo), a 2.duração do período de co-cultivo, a 3.temperatura e o 4.pH (o pH ácido entre 5 e 6 é necessário para indução dos genes *vir*, enquanto a temperatura próxima de 22 °C e até 28 °C parece ótima para a produção da maquinaria de transferência) e a escolha dos 5.filtros/suporte sólido para o crescimento do micro-organismo transformado (nitrocelulose, celofane, Hybond N ou N+) (revisado por Hooykaas, et al., 2018, Mullins, et al., 2001, Fullner & Nester, 1996, Turk, et al., 1991, revisado por Michelse et al., 2005, Vijin & Govers, 2003, Michelse, et al., 2008).

A maioria das inserções de T-DNA por *Agrobacterium* são eventos de integração únicas/simples evitando mutações com efeitos secundários, diferentes das mutações por UV e ação de agentes químicos que induzem múltiplas alterações no

genoma. A técnica pode utilizar células intactas (conídeos, leveduras e micélios) como material de partida eliminando a necessidade de produção dos protoplastos (técnica laboriosa e dependente da qualidade da etapa de digestão enzimática) (de Groot et al., 1998). Além disso, a mutagênese por inserção do T-DNA fornece marcas moleculares com sequência conhecida que podem ser exploradas para triagem através da *Nested PCR* (Youseff et al., 2009) ou da TAIL-PCR (*Thermal asymmetric-interlaced PCR*; Kenski, et al., 2013).

A técnica de ATMT garante o silenciamento gênico via RNAi. O RNAi consiste em um método pós transcricional de redução do produto gênico, devido a degradação do mRNA, através da indução da formação ou introdução de uma molécula de RNA de dupla fita no hospedeiro alvo. O silenciamento/depleção/*knock-down* gênico por este método ocorre devido a geração de RNAs de fita dupla (dsRNAs longos, microRNAs e/ou siRNAs). Nessa estratégia, a introdução de uma sequência exógena específica complementar ao alvo (inserida a partir dos vetores e das técnicas de transformação) induz a formação de um RNA de fita dupla (dsRNA: *double stranded RNA*), devido ao pareamento das bases nitrogenadas. Em eucariotos as moléculas de dsRNA são reconhecidas pela enzima RNase III (Dicer) que cliva essas sequências em pequenos RNAs de interferência de fita dupla (siRNAs: *small interference RNA*), com tamanho entre 21 e 24 nucleotídeos, que são desdobrados em RNAs de fita simples (ssRNAs: *single stranded RNA*). Na sequência uma das fitas permanece integrada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), servindo de molde/estrutura de ligação/emparelhamento futuro com o mRNA complementar produzido pela célula hospedeira. A localização/reconhecimento de mRNA alvo (ou seja, formação de uma dupla fita de RNA) inicia a clivagem endonucleotídica pela enzima Argonata, evitando a tradução do transcrito alvo, e, conseqüentemente, provocando o silenciamento pós transcricional do gene (revisado por Geley & Muller, 2004, revisado por Hutvágner & Zamore 2002).

A base na funcionalidade dos processos de RNAi está associada à teoria do "dogma central" da biologia molecular (descrito por Francis Crick), uma vez que esse postulado descreve como ocorre o fluxo de informações do código genético. Especificamente os genes estão contidos nas molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), que podem ser transcritos em ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA), sobre isso uma molécula de DNA serve como molde para criação de uma molécula de RNA, os quais são subsequentemente traduzidos em proteínas através da união de aminoácidos de acordo com a ordem de códons apresentados no mRNA. Portanto, se houver uma interrupção/interferência na síntese do mRNA ou mudanças significativas na sequência determinante para a tradução do RNA/formação das proteínas (incluindo alterações na sequência do DNA molde), os produtos podem não ser gerados ou são gerados produtos com diferentes estruturas terciárias por vezes diferentes do convencional, assim não há produto funcional do gene e/ou ocorre uma diminuição do produto. Apesar das vantagens técnicas, o RNAi não pode gerar uma perda completa da função, portanto esse potencial de função residual impõe dificuldades na interpretação dos resultados, quando por vezes os estudos oferecem resultados com a ausência de fenótipo.

Em *H. capsulatum*, RNAs de fita dupla (dsRNAs são processados em siRNAs) podem efetivamente desencadear depleção de produtos gênicos baseada em RNAi (Rappleye, et al., 2004). Nessa espécie, diferentes estudos têm gerado cepas silenciadas, nas quais o RNA de fita dupla é gerado *in vivo*, utilizando plasmídeos específicos, pela transcrição de cópias invertidas e autocomplementares de uma região do gene alvo, o que produz um *harpin* de RNA. No *Histoplasma*, RNA de fita dupla maiores que 500 pares de base produzem um grau significativo de silenciamento (Rappleye, et al., 2004). Para gerar o RNAi *in vivo*, a construção é inserida em um vetor com o uso de enzimas de restrição, transformado em *Agrobacterium*, por eletroporação, e lançado nas leveduras de *Histoplasma* por ATMT. Os plasmídeos de RNAi são introduzidos em cepas mutantes (*ura5*) e a seleção das leveduras transformadas pode ser realizada em meio sem adição de uracila, em virtude do plasmídeo apresentar o gene codificador para URA5, que restaura a prototrofia de uracila. A construção de RNAi é colocada a jusante do promotor constitutivo de Histona-2B de *Histoplasma* para produzir altos níveis de RNA, e, conseqüente, obtenção de maiores quantidades/efeito de silenciamento. A construção desencadeadora de RNAi pode ser acoplada quiméricamente à

sequência de um gene repórter, conduzindo o *knock-down* do gene de interesse e silenciamento do gene acoplado/repórter, se aplicado em cepas que expressão o gene repórter de forma estável. O uso da proteína verde fluorescente (GFP) como co-silenciamento em *Histoplasma* constitui uma ferramenta importante como indicador da depleção do gene alvo através da avaliação da fluorescência das cepas transformadas (Youseff & Rappleye, 2012).

4. Considerações Finais

A técnica de ATMT tem auxiliado na transformação gênica de fungos patogênicos, como o *H. capsulatum*. A ATMT exige exatidão metodológica, pois o sucesso dos experimentos é minuciosamente dependente de diversas condições de cultivo. Contudo, uma vez que ainda são de difícil execução técnicas de deleção gênica, essa ferramenta deve ser explorada ao máximo, para conhecimento mais amplo sobre a virulência de diferentes micro-organismos, ainda que se apresente limitada em algumas abordagens.

Referências

- Bakó, L., Umeda, M., Tiburcio, A. F., Schell, J., & Koncz, C. (2003). The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(17):10108-13. 10.1073/pnas.1733208100.
- Bundock, P., Den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., & Hooykaas, P. J. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 14(13):3206-14.
- Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G., & Nester, E. W. (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(17):6708-12. 10.1073/pnas.87.17.6708
- Citovsky, V., Wong, M. L., & Zambryski, P. (1989). Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(4):1193-7. 10.1073/pnas.86.4.1193.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis*. 10 Suppl 2:S274-6. 10.1093/cid/10.supplement_2.s274.
- Fullner, K. J., & Nester, E. W. (1996). Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 178(6):1498-504. 10.1128/jb.178.6.1498-1504.1996.
- Garfoot, A. L., Zemska, O., & Rappleye, C. A. (2014). *Histoplasma capsulatum* depends on de novo vitamin biosynthesis for intraphagosomal proliferation. *Infect Immun*. 82(1):393-404. 10.1128/IAI.00824-13.
- Geley, S., & Müller, C. (2004). RNAi: ancient mechanism with a promising future. *Exp Gerontol*. Jul;39(7):985-98. 10.1016/j.exger.2004.03.040.
- Hooykaas, P. J. J., Van Heusden, G. P. H., Niu, X., Reza Roushan, M., Soltani, J., Zhang, X., & Van Der Zaal, B. J. (2018). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Yeast and Fungi. *Curr Top Microbiol Immunol*. 418:349-374.
- Hutvágner, G., & Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*. 12(2):225-32. 10.1016/s0959-437x(02)00290-3.
- Kado, C. I. (2000). The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. *Curr Opin Microbiol*. 3(6):643-8. 10.1016/s1369-5274(00)00154-5.
- Kemski, M. M., Stevens, B., & Rappleye, C. A. (2013). Spectrum of T-DNA integrations for insertional mutagenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Fungal Biol*. 117(1):41-51. 10.1016/j.funbio.2012.11.004.
- Kügler, S., Young, B., Miller, V. L., & Goldman, W. E. (2000). Monitoring phase-specific gene expression in *Histoplasma capsulatum* with telomeric GFP fusion plasmids. *Cell Microbiol*. 2(6):537-47. 10.1046/j.1462-5822.2000.00078.x.
- Longo, L. V. G., Ray, S. C., Puccia, R., & Rappleye, C. A. (2018). Characterization of the APSES-family transcriptional regulators of *Histoplasma capsulatum*. *FEMS Yeast Res*. 18(8): foy087. 10.1093/femsyr/foy087.
- Marion, C. L., Rappleye, C. A., Engle, J. T., & Goldman, W. E. (2006). An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Mol Microbiol*. 62(4):970-83. 10.1111/j.1365-2958.2006.05436.x.
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., Van Den Hondel, C. A., & Ram, A. F. (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nat Protoc*. 3(10):1671-8. 10.1038/nprot.2008.154.
- Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D.M., & Kang, S. (2001). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology*. 91(2):173-80. 10.1094/PHYTO.2001.91.2.173.
- Rappleye, C. A., Engle, J. T., & Goldman, W. E. (2004). RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol*. 53(1):153-65. 10.1111/j.1365-2958.2004.04131.x.

- Regensburg-Tuïnk, A. J., & Hooykaas, P. J. (1993). Transgenic *N. glauca* plants expressing bacterial virulence gene virF are converted into hosts for nopaline strains of *A. tumefaciens*. *Nature*. 363(6424):69-71. 10.1038/363069a0.
- Sebghati, T. S., Engle, J. T., & Goldman, W. E. (2000). Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science*. 290(5495):1368-72. 10.1126/science.290.5495.1368.
- Shen, Q., Beucler, M. J., Ray, S. C., & Rappleye, C. A. (2018). Macrophage activation by IFN- γ triggers restriction of phagosomal copper from intracellular pathogens. *PLoS Pathog*. 14(11):e1007444. 10.1128/MCB.21.2.534-547.2001.
- Sullivan, T. D., Rooney, P. J., & Klein, B. S. (2002). *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. *Eukaryot Cell*. Dec;1(6):895-905. 10.1128/EC.1.6.895-905.2002.
- Toro, N., Datta, A., Yanofsky, M., & Nester, E. (1988). Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(22):8558-62. 10.1073/pnas.85.22.8558.
- Turk, S. C., Melchers, L. S., Den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuïnk, A. J., & Hooykaas, P. J. (1991). Environmental conditions differentially affect vir gene induction in different *Agrobacterium* strains. Role of the VirA sensor protein. *Plant Mol Biol*. 16(6):1051-9. 10.1007/BF00016076.
- Vijn, I., & Govers, F. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol*. 4(6):459-67. 10.1046/j.1364-3703.2003.00191.x.
- Woods, J. P., Heinecke, E. L., & Goldman, W. E. (1998). Electrotransformation and expression of bacterial genes encoding hygromycin phosphotransferase and beta-galactosidase in the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 66(4):1697-707. 10.1128/IAI.66.4.1697-1707.1998.
- Worsham, P. L., & Goldman, W. E. (1990). Development of a genetic transformation system for *Histoplasma capsulatum*: complementation of uracil auxotrophy. *Mol Gen Genet*. 221(3):358-62. 10.1007/BF00259400.
- Youseff, B. H., & Rappleye, C. A. (2012). RNAi-based gene silencing using a GFP sentinel system in *Histoplasma capsulatum*. *Methods Mol Biol*. 845:151-64. 10.1007/978-1-61779-539-8_10.
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J*. 23(1):11-28. 10.1046/j.1365-313x.2000.00808.x.