

## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

***Agrobacterium tumefaciens*: descubrimiento, ciclo de vida, mecanismo de acción y aplicación en el ámbito de la biotecnología.**

***Agrobacterium tumefaciens*: descubrimiento, ciclo de vida, mecanismo de acción e aplicación no ámbito da biotecnoloxía**

***Agrobacterium tumefaciens*: discovery, live cycle, mechanism of action and application in the field of biotechnology.**

**Xaime Ferrín Suárez**

Curso 2020 – 2021. Convocatoria: Enero

*Director(es) Académico: José Enrique Torres Vaamonde*

## ÍNDICE

1. Descubrimiento y aislamiento de <i>A. tumefaciens</i> .....	4
2. Ciclo de vida y mecanismo de acción .....	8
3. Aplicaciones biotecnológicas.....	12
4. Conclusiones.....	14
5. Bibliografía.....	15

## RESUMEN

El organismo *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria que parasita plantas dicotiledóneas, generando tumores en la zona del tallo y raíces.

Actualmente, *Agrobacterium tumefaciens* es un organismo con un gran potencial en el ámbito de la biotecnología debido a su capacidad de transmisión de ADN. Este mecanismo de transferencia sirve para la producción de organismos transgénicos debido a que permite seleccionar características de un organismo e introducir esos genes aunque no pertenezcan a la patogénesis.

En esta revisión bibliográfica se estudiará al organismo *Agrobacterium tumefaciens* teniendo en cuenta su descubrimiento, su ciclo vital, mecanismo de acción y sus usos en el ámbito biotecnológico.

## RESUMO

O organismo *Agrobacterium tumefaciens* é unha bacteria que parasita plantas dicotiledóneas, xerando tumores na zona do tallo e raíces.

Actualmente, *Agrobacterium tumefaciens* é un organismo cun gran potencial no ámbito da biotecnoloxía debido á súa capacidade de transmisión de ADN. Este mecanismo de transferencia serve para a produción de organismo transxénicos debido a que permite seleccionar características dun organismo e introducir ese xenes aínda que non pertenzan á patoxénese.

Nesta revisión bibliográfica estudarase ao organismo *Agrobacterium tumefaciens* tendo en conta o seu descubrimento, o seu ciclo vital, mecanismo de acción e os seus usos no ámbito biotecnolóxico.

## SUMMARY

*The Agrobacterium tumefaciens* is a bacterium that parasitizes dicotyledonous plants, generating tumors in the stem and root area.

Currently, *Agrobacterium tumefaciens* is an organism with great potential in the field of biotechnology due to its ability to transmit DNA. This transfer mechanism serves for the production of transgenic organisms because it allows the selection of characteristics of an organism and the introduction of those genes, even though they do not belong to the pathogenesis.

In this bibliographic review, the organism *Agrobacterium tumefaciens* will be studied taking into account its discovery, its life cycle, mechanism of action and its uses in the biotechnological field.

## PALABRAS CLAVE

*Agrobacterium tumefaciens, biotecnología, ciclo de vida, descubrimiento, aplicaciones*

## 1. Descubrimiento y aislamiento de *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* era un organismo desconocido hasta 1897, año en el que Fridiano Cavara trabajó en la enfermedad y publicó su trabajo, el autor describió los tumores formados en las vides de los jardines botánicos de Nápoles. Pero lo más importante fue como describió el aislamiento de una bacteria que mostró efectos similares en las plantas jóvenes. Este trabajo se publicó en *Le Stazioni Sperimentale, Agrari Italiane*.

A raíz de esto, en 1904 George C. Hedgcock (Hedgcock, 1910) informó del aislamiento de una bacteria en un tumor de una vid que describió en el Boletín del Departamento de Industria Vegetal.

Poco después, trabajos de Smith y Townsend en 1907 describieron un organismo como *Bacterium tumefaciens*. Smith había visitado a Cavara para aprender a aislar las bacterias de la vid y, junto con Townsend, publicaron sus datos obteniendo una muestra de un crisantemo llamando a esta bacteria *Bacterium tumefaciens*. Smith inoculó el organismo en numerosas plantas herbáceas, demostrando su capacidad infecciosa y su capacidad de formar tumores.

Otros estudios posteriores cambiaron el nombre de *B. tumefaciens* por *Pseudomonas tumefaciens* y más tarde por *Phytomonas tumefaciens*, seguido de *Polyomonas tumefaciens* y - finalmente - por *Agrobacterium tumefaciens* (Conn, 1942). Stapp y Bortels describieron las distintas fases del ciclo de vida de *P. tumefaciens* en 1931.

Después de demostrar que *Agrobacterium tumefaciens* era el organismo que estaba detrás de la formación de estos tumores, comenzó el estudio sobre la capacidad para poder infectar diferentes tipos de plantas y se logró infectar hasta 90 familias de plantas (Kado, 2010). En este estudio se muestra que hay 41 familias que de manera natural pueden contraer la enfermedad. La inoculación en plantas herbáceas permitió estudiar el proceso de transformación celular y el proceso de formación de los tumores.

Al principio había tres propuestas del proceso de formación de tumores: que el organismo generase sustancias químicas irritantes que generaban el tumor; que la fitohormona auxina jugaba un papel principal en la formación del tumor; y que la planta huésped iniciaba la formación del tumor inducida por *A. tumefaciens*.

Normalmente, las células vegetales crecen, se desarrollan y multiplican bajo un estricto control. Entonces, ¿qué es lo que hace que las células tumorales crezcan sin control? En 1917 Smith usó ricino (*Ricinus communis* L.) como huésped de *A. tumefaciens* para determinar el mecanismo de formación de tumores y determinó que la liberación de amonio diluido por parte de las bacterias en el interior celular genera un crecimiento anormal dando lugar a los tumores. Pero un estudio realizado por Went en 1926 (Went, 1926) señalaba a las auxinas como causantes de la formación de los tumores al observar

similitudes entre las reacciones entre plantas inoculadas con el patógeno y plantas tratadas con ácido indolacético proveniente del patógeno. No se pudo demostrar hasta 1942, en un estudio de Braun y Laskaris en el que utilizaron una cepa no virulenta que fue capaz de inducir tumores al ser tratada con  $\alpha$ -naftaleno, ácido  $\gamma$ -indolbutírico, o ácido  $\beta$ -indoleacético.

Además, en otro estudio (Locke, 1938) se descubrió que los tumores formados por la cepa virulenta carecían de clorofila y las cepas no virulentas si la poseían. Con estos resultados, los autores propusieron que la formación de tumores constaba de dos fases, en la primera se llevaba a cabo la estimulación de las células y en la segunda la estimulación continuaba hasta que daba lugar a la multiplicación celular debido a una sustancia que provocaba el crecimiento para dar lugar al tumor. Esta teoría se sostiene en la creencia de que hay una sustancia irritante y la intervención de fitohormonas.

El trabajo de White e Braun en 1942 demostraba mediante métodos serológicos que los tumores infectados derivaban de tumores secundarios no infectados, lo que quiere decir que había una transformación en el huésped a nivel genético por el patógeno. Observaron cómo los tumores tenían un crecimiento típico en ausencia de fitohormonas. Estos resultados apoyaban la teoría de que se llevase a cabo una transformación genética cuando encontraron derivados de la guanidina, como la octopina o la nopalina, en los tumores. Las cepas que sintetizaban un tipo de guanidina generaban tumores con esa sustancia de forma específica, por lo que no dependía del tipo de planta que se infectase. Posteriormente, en un estudio de Wendt-Gallitelli y Dobrigkeit en 1973 se descubrió que la octopina no es exclusiva de los tumores de este patógeno; estos descubrimientos abrieron paso a la creencia de que el patógeno transfería su ADN a sus huéspedes.

Para probar si *A. tumefaciens* era capaz de transferir su ADN se llevaron a cabo pruebas en las que se transfería directamente el material genético del patógeno al interior celular (Braun e Wood, 1966; Bieber y Sanrfert, 1968; Stroun et al., 1971; Yajkoo y Hegeman, 1971). En un estudio, Kado y Lurquin en 1976 observaron que la adición de ADN de *A. tumefaciens* en el interior celular de la planta de tabaco no tenía una forma estable - un experimento anterior demostraba que mediante la adición de una desoxirribonucleasa entre 1 e 2 horas antes de la adición del patógeno no había inhibición del tumor (Braun y Wood, 1966) - por lo que se abrió paso a la teoría de que el ADN bacteriano entraba en la célula protegido y que la entrada de ADN desnudo no era el proceso de integración y transformación del patógeno.

Todas estas pruebas fracasaron, pero en ese mismo año descubrieron en células tumorales bacteriófagos (Tourneur y Morel, 1971) y en uno de estos bacteriófagos, llamado PS8, se encontró cARN complementario al ADN de los tumores (Schilperoot, 1971).

En 1974, un estudio realizado por Drilaca y Kafo mediante una hibridación ADN:ADN en una solución enriquecida, descubrió que no había más del 0.02%

del ADN patógeno en el tumor de la planta. Estos resultados daban a entender que el ADN del patógeno se incorporó al ADN de la planta.

El problema ahora era saber cómo se integraba el ADN del patógeno a las células de las plantas, se desconocían los receptores y la sospecha era que el patógeno precisaba de una rotura en la pared vegetal para poder llevar a cabo la infección. Tras estos sucesos, se observó como los protoplastos que estaban regenerando la pared primaria de las células de tabaco podían ser transformadas por el patógeno (Krens et al, 1985) y se dedujo que las fibras bacterianas de celulosa eran las involucradas (Matthysee, 1986).

El descubrimiento de si *A. tumefaciens* utilizaba un método de conjugación fue respondida de manera indirecta en un estudio de Hamilton y Fall en 1971 en el que, utilizando diferentes cepas del patógeno, observaron que la exposición a temperaturas superiores a 31.5 °C o a bromuro de etidio generaban la delección de una gran parte del plásmido y por lo tanto la capacidad de infección. Más tarde se descubrió que a 32 °C se paraba por completo la oncogénesis.

Estos plásmidos fueron aislados y se observaba que había diferencias entre las cepas virulentas y las avirulentas; las primeras poseían un plásmido de mayor tamaño y uno más pequeño mientras que las cepas avirulentas solo poseían el plásmido menor (Zaenen et al., 1974).

Con estos resultados, comenzó la procura de este plásmido debido a que se dedujo que era el que proporcionaba la capacidad de infección por parte del patógeno y se comenzó por las células tumorales en un estudio en el que se descubrió trazas de ADN ajeno a la planta que representaban un 0.0011% del ADN encontrado en la planta (Chilton et al., 1977).

Este organismo representa el primer caso de transferencia de genes entre diferentes dominios, en este caso entre bacteria y eucariota. Por esto, se considera que utiliza un mecanismo de transferencia de genes horizontal (HGT). Unos estudios en los que se realizaba un mapeado en búsqueda de los genes involucrados en la oncogénesis descubrieron en una cepa el plásmido Ti utilizando endonucleasas de restricción. Además, se encontraron dos fragmentos de EcoRI en diferentes plásmidos y se determinó que eran los causantes de la oncogénesis (Chilton et al., 1978; Koekman et al., 1979).

El descubrimiento de un sector específico del plásmido Ti llamado T-ADN se produjo en unos estudios en los que mediante análisis e hibridación de tres cepas de *A. tumefaciens* se observó como esta región coincidía con la misma región del mapa genómico en las tres cepas (Merlo et al., 1980; Yadav et al., 1982; Wang et al., 1984). Esta se constituye por una región rodeada por una repetición de 25 pares de bases. El extremo derecho es esencial para determinar la dirección de la transferencia en el proceso de infección. Este T-ADN se encontró en el núcleo de las células huéspedes ligado al ADN de la planta (Chilton et al., 1980; Willmitzer et al., 1980).

Al conocerse el sector T-ADN se realizaron estudios más específicos en los que se intentaban conocer las funciones de esta región. Se llevaron a cabo experimentos en los que se descubrió un transcrito primeramente llamado tms-

2, posteriormente *iaaH*, que era responsable de la producción de ácido indolacético utilizando indolacetamida, que es sintetizado por la indolacetamida hidrolasa utilizando como substrato el triptófano. Otro transcrito denominado como *iaaM* codifica la producción de triptófano 2-monooxigenasa (Inze et al., 1984; Schöder et al., 1984; Van Onckelen et al., 1986).

Posteriormente, se descubrió en el plásmido la denominada como región *vir* que aportaba la virulencia al patógeno. La secuenciación de esta región determinó que había seis operones (*VirA*, *B*, *G*, *C*, *D* e *E*) que formaban un regulón (*vir regulon*). Cada operón contiene la secuencia caja (TNCAATTGAAAPy) para los plásmidos. Un gen *vir* de una cepa octopina A6 demostró que este gen confería la especificidad de huésped y la restringía al maíz para la transferencia de T-DNA (Jarchow et al., 1991).

La relación entre planta y patógeno se lleva a cabo mediante señales químicas, pudiendo ser fenoles, azúcares o condición de acidez. Para detectar estos cambios se postuló que *A. tumefaciens* debía de producir un flagelo o pilus para poder contactar con el huésped. Los análisis del operón *Vir B* aportaron resultados en los que se veían similitudes en el genoma con secuencias génicas relacionadas con la transferencia conjugativa de plásmidos de amplio espectro de hospedadores, por lo que el estudio se continuó y se descubrió que este *Vir B* sintetizaba una subunidad de pilina encargada de producir el pilus. Este pilus se observó tanto en cepas virulentas como en avirulentas, de un tamaño de 3 nm de diámetro, pero solo la virulenta producía un pilus largo con 10 nm de diámetro y con un lumen de 2 nm cuando no había interferencia de los flagelos, a este pilus se le llamó T-pilus (Lai y Kado, 1998, 2000, 2002). El operón *virB* genera productos para la oncogénesis y se asocia con la membrana de *A. tumefaciens* para dar lugar a un transporte de tipo IV por parte del complejo T-ADN-*VirD2* (Zupan et al., 1998). Además, hay 2 tipos de este transporte de tipo IV para el plásmido pAtC58 y para el locus *Trb*, que es necesario para la transferencia del plásmido *Ti* (Chen et al., 2002; Von Bodman et al., 1989; Li et al., 1999). Este tipo de transporte parece estar asociado a la virulencia del patógeno, pero no es el método principal por el que se produce, según parece este lleva a cabo la translocación de una proteína parecida a la espiga de la cola del fago en el interior de las células huésped. Esta proteína se enlaza con la actina para así perforar las membranas de las células huéspedes (Wu et al., 2008; Basler et al., 2013; Pukatzki et al., 2007).

Para finalizar el proceso, se realiza la transferencia del T-ADN y del regulón *vir* y la integración en el cromosoma vegetal gracias a la maquinaria auxiliar del cromosoma en el llamado como proceso de virulencia.

## 2. Ciclo de vida y mecanismo de acción

*A. tumefaciens* es un organismo capaz de vivir de manera saprófita en el suelo durante casi dos años. Cuando una planta cercana tiene una zona dañada cerca del suelo la bacteria es capaz de moverse mediante quimiotactismo hasta esa herida y se sitúa en el interior de la planta entre las células huésped. Estas bacterias estimulan a las células de alrededor para que comience un proceso de oncogénesis y durante dicho proceso la bacteria aprovecha para insertar parte de su ADN dentro los cromosomas de las células de la planta, causando una producción incontrolada de sustancias como citoquininas y auxinas para el crecimiento de la planta y opinas que sirven de nutrientes para el patógeno. Algunos tumores se diferencian en el interior de vasos o traqueidas, pero no están organizados y no presentan conexión con el sistema vascular. Cuando la masa tumoral aumenta de tamaño genera presión sobre los tejidos que lo rodean, pudiendo deformarlos o incluso dañarlos. La deformación de tejido como pueden ser los vasos del xilema resulta en la pérdida de los tejidos que se ven sin la irrigación parte de los vasos.

El tejido resultante es de color claro con células multinucleadas que carece de epidermis, por lo que puede ser objetivo de otros factores externos como patógenos o insectos. Con la entrada de estos invasores secundarios la masa celular se va tornando a un color oscuro que significa la degradación celular, que permite la liberación de *A. tumefaciens* al exterior para volver al suelo y repetir el ciclo (Figura 1, Collins, A. (2020)).

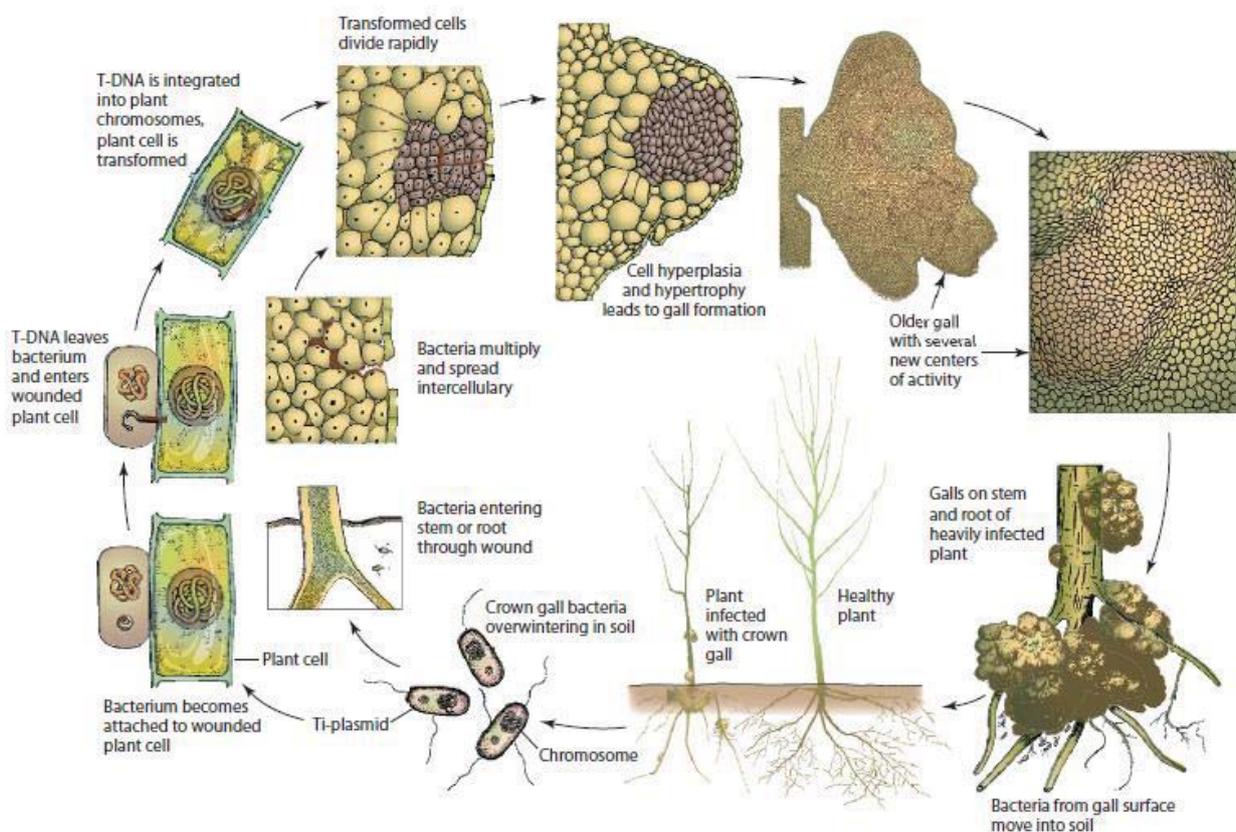
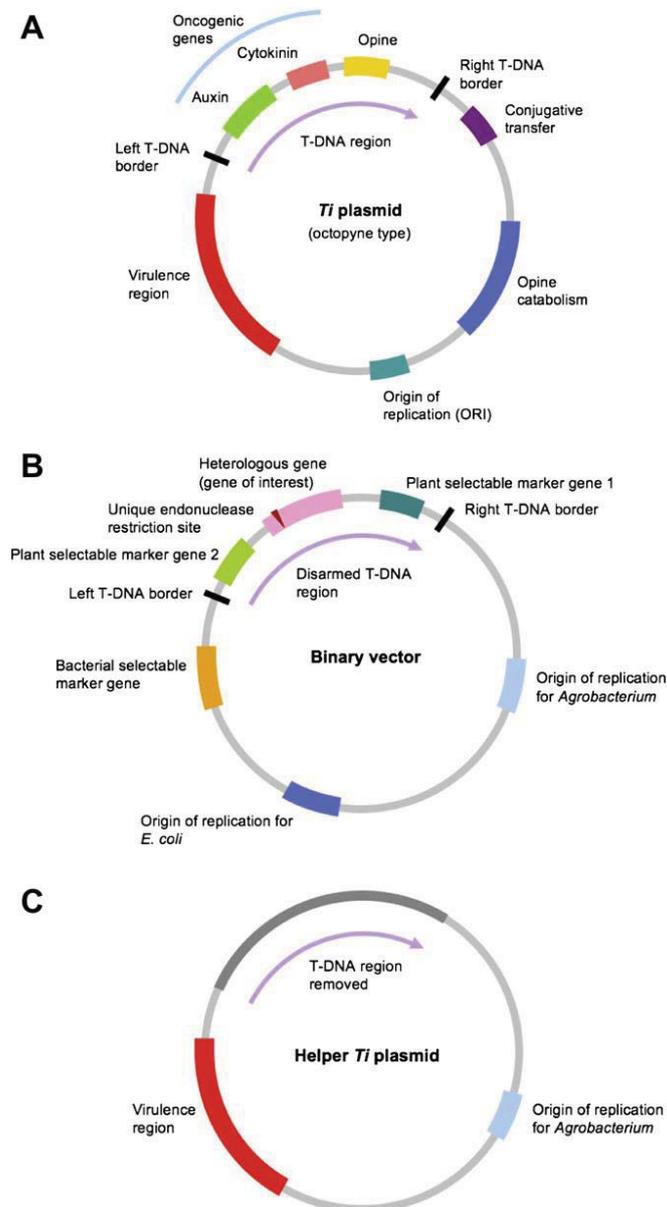


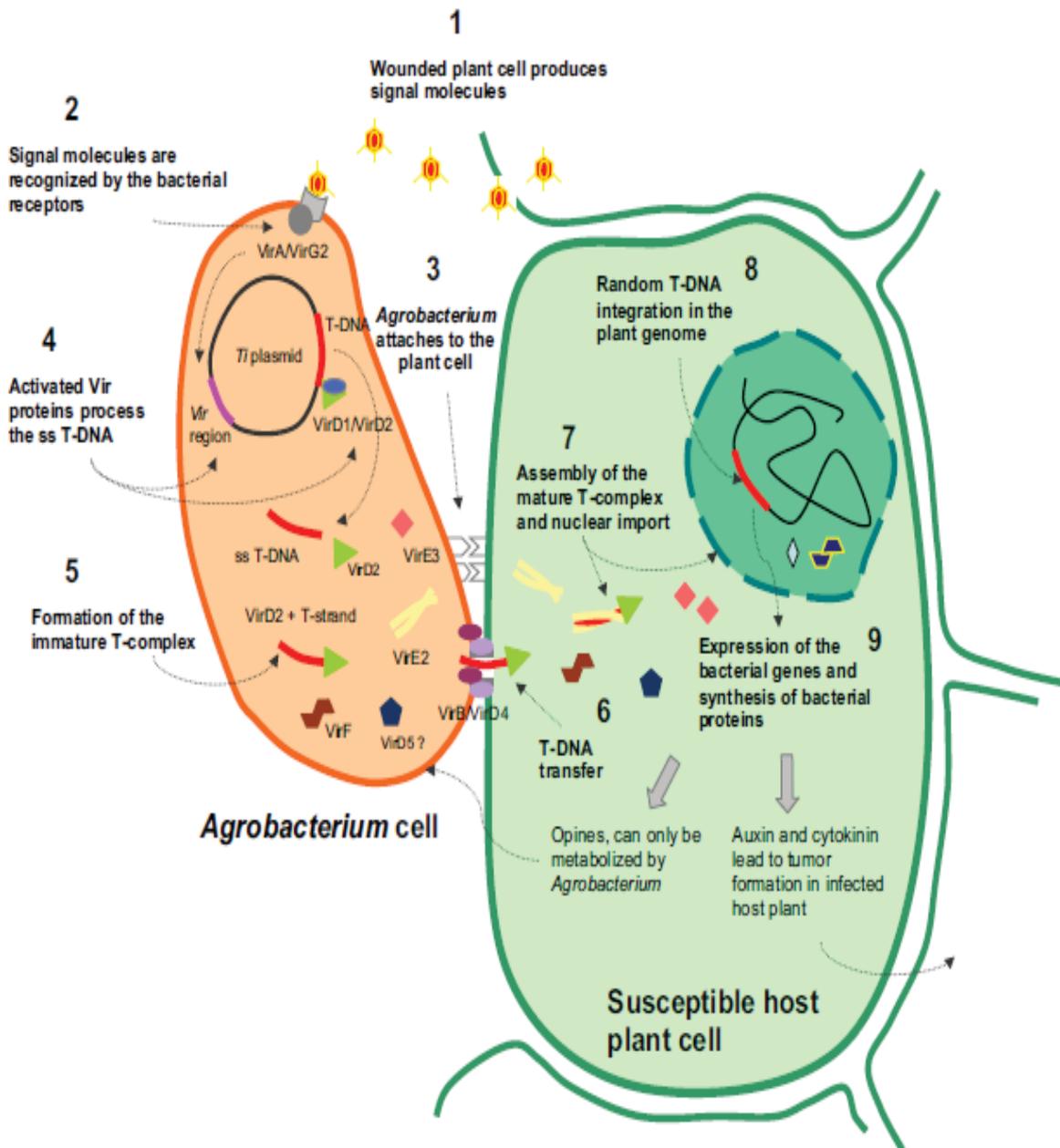
Ilustración 1. Ciclo de vida de *Agrobacterium tumefaciens*. Agrios, G. N. (2005).

Para entender el proceso de transformación primero se necesita saber cómo es la estructura del plásmido Ti que es la base molecular de este fenómeno. Este plásmido contiene una región denominada región T-DNA que es un elemento móvil responsable del proceso de oncogénesis y la producción de opinas. Además, el plásmido contiene otras dos regiones que actúan en *trans* que no son transferidas a la planta. Una es la región *vir*, que contiene factores de virulencia, y la otra es una región que contiene los genes necesarios para la producción de opinas en la planta (Figura 2, Pácurar, et al (2011)).



**Ilustración 2.** Esquema del plásmido Ti (A) y diagramas de un vector binario (B) y del plásmido ayudante en el proceso de transformación. Pácurar et al (2011).

El proceso de transformación de *A. tumefaciens* comienza con la detección de las moléculas liberadas por la planta al haber sufrido una rotura de la pared y que son reconocidas por el sistema de transducción de señal VirA/VirG2. La bacteria se adhiere a un grupo de células sanas de la planta a través de la herida de la pared y se produce la activación de los genes *vir* que producen las endonucleasas específicas de las secuencias extremo del T-DNA (VirD1 y VirD2) para procesar el T-DNA del plásmido Ti y liberar una cadena única de T-DNA (hebra ssT o “ssT-strand”) mediante un mecanismo de replicación. Al mismo tiempo, la proteína VirD2 se adhiere covalentemente al extremo 5' de la hebra ssT para formar el complejo “immature T-complex” para después transferirse al citoplasma de la planta por un modelo de secreción vía IV gracias al complejo T4SS formado por 11 proteínas VirB y VirD4 que se encuentra en el pilus bacteriano. Además del “immature T-complex” también son transportadas al interior de la célula vegetal, asociados al complejo anterior, varios factores de virulencia como VirE2, VirE3, VirF y VirD5 para formar lo que se conoce como “mature T-complex”. Las proteínas VirD2 y VirE2 protegen al complejo inmaduro de los ataques provenientes de la célula huésped al proteger el extremo 5' y guían al complejo maduro al núcleo. Al atravesar la membrana nuclear el complejo actúa sobre una zona de integración gracias a factores de la planta y bacterianos, entre ellos se cree que actúa VirF. Una vez que está integrado las proteínas que protegían la hebra ssT son liberadas por proteólisis y esta hebra se convierte en una doble hebra para integrarse en la cromatina del huésped. Si el proceso resulta satisfactorio la expresión de este T-DNA por parte de la planta provoca la síntesis de proteínas bacterianas y la oncogénesis (Figura 3, Păcurar, et al (2011)).



**Ilustración 3.** Proceso de transformación realizado por *A. tumefaciens*. Păcurar, et al (2011).

### 3. Aplicaciones biotecnológicas

El género *Agrobacterium* es un grupo muy especial de patógenos debido a su capacidad de transferir sus genes al genoma del huésped, en este caso significa la transferencia de genes desde una célula procariota a una eucariota.

El plásmido comúnmente usado en laboratorios es de gran tamaño, superior a 200 kb, y codifica más de 200 genes pudiendo ser incluso mayor. Todas estas cepas tienen siempre una o más de una región Ti y una región *vir*.

Para la utilización de *A. tumefaciens* como herramienta biotecnológica hay varios obstáculos que han de superarse. Primero la bacteria debe de ser no patogénica, para ello se eliminan los oncogenes, este proceso no tiene efecto en la capacidad de transformación de la bacteria. Después se incorporan un gen de interés en el T-DNA para su expresión en la planta, un método utilizado es añadir a la secuencia de interés secuencias de la nopalina sintasa para marcar esta secuencia. El T-DNA tiene que contener un marcador o más para que se produzca el fenómeno de transformación de manera exitosa, normalmente se utilizan genes de resistencia a antibióticos que flanqueen el gen de reconocimiento por parte de la planta.

Otro problema es el gran tamaño del plásmido Ti, que además tiene un número bajo de copias por lo que asilar el ADN resulta más complicado. Además, cuanto mayor sea la secuencia mayor probabilidad de que esta se enrede o se rompa durante la manipulación y su clonación mediante enzimas de restricción es muy complicado. Para solucionar esto se llevó a cabo el desarrollo de un vector binario en el que los genes del T-DNA y los genes *vir* se encuentran en replicones separados. Normalmente se traslada la región T-DNA a un plásmido menor para ser manipulado en *E. coli* o incluso en *Agrobacterium*. Después de la clonación este pequeño plásmido se introduce en el *A. tumefaciens* que tiene truncado el plásmido Ti al carecer de T-DNA, a este se le llama plásmido ayudante porque permite la transferencia de la región T-DNA del vector binario a la planta.

Las primeras plantas transgénicas fértiles y con un fenotipo normal se remontan a 1983. En 1985 se introduce la técnica del disco de hoja en el que se utiliza un perforador para extraer un fragmente de hoja en forma de disco e incubarlas con *A. tumefaciens* para inducir la formación de una plántula. Al principio los estudios utilizaban *Nicotiana tabacum* y *Petunia hybrida* como sujetos y posteriormente se utilizó *Arabidopsis thaliana* que resultó ser un sujeto más adecuado al desarrollar el método de inmersión floral. En esta técnica se sumergían flores en una solución con *Agrobacterium* y el T-DNA era transferido al genoma del embrión en desarrollo. Las semillas resultantes eran seleccionadas mediante sus genes de resistencia a antibióticos para después dar lugar a plantas transformadas. Yuan, Z. C., & Williams, M. (2012).

Un ejemplo es el desarrollo del arroz dorado por parte de Ingo Potrykus y sus colaboradores en el año 2000. Utilizando *Oryza sativa* se llevó a cabo la transformación mediante *A. tumefaciens* para introducir la ruta biosintética completa del beta-caroteno en el endospermo del arroz mediante el vector pB19hpc que combina la secuencia para la síntesis de la fitoeno sintasa (*psy*) proveniente de *Narcissus pseudonarcissus* con la secuencia codificante de una fitoeno desaturasa bacteriana (*crtI*) originaria de *Erwinia uredovora* con la finalidad de producir una especie de arroz con unos niveles altos de beta-caroteno destinados a zonas en las que la alimentación se basa en este y debido

a su bajo contenido nutricional se producían grandes deficiencias de vitamina A en la población. Beyer, et al. (2002).

Otro ejemplo de planta modificada mediante *A. tumefaciens* es la de *Brassica napus* en el que se le introdujo un gen para codificar oleosinas (proteínas principalmente producidas en el maíz). Dado que la función de las oleosinas es almacenar lípidos en las semillas se generó una planta que en algunos de sus tejidos expresaba dicha característica. Lee, et al. (1991).

Varios genes de resistencia a antibióticos o herbicidas han sido introducidos en la región del T-DNA de los vectores binarios para usarse en la selección de transgénicos. El gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII) para la resistencia a la canamicina y la higromicina fosfotransferasa (HPT) para la resistencia a la higromicina. son los marcadores genéticos más utilizados. Hay otros tipos de marcadores para diferentes antibióticos como puede ser el cloranfenicol, gentamicina, estreptomycin, bleomicina o blasticidina. Además, también es utilizado para la introducción en plantas de genes para la resistencia a herbicidas como puede ser la fosfonitrocina, glufosinato, glifosato o bromoxilo. La selección de transgénicos no sólo se basa en generar resistencia a diferentes sustancias, también se utiliza *A. tumefaciens* para que reaccione bajo las luciferasas bacterianas, proteína fluorescente verde (GFP) y otras proteínas fluorescentes que sirven para ensayos cuantitativos y análisis fluorimétricos incluso como marcadores *in vivo*. Mehrotra, S., & Goyal, V. (2012).

La utilidad de este organismo ha llegado a ámbitos como el desarrollo de combustibles que pueden ser una alternativa al petróleo. La cepa de *A. tumefaciens* llamada GV1303 con un vector denominado como pARTcry1A se utiliza para transformar la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) destinado a la producción de biocombustible. Esto se lleva a cabo al introducir el gen cry1Ac en la variedad gt549(C9) para producir una caña de azúcar que sea resistente a los daños realizados por los insectos, que son la mayor amenaza en las plantaciones de azúcar destinados a este fin. Dessoky, et al (2021).

Hay ejemplos en la industria alimentaria como el desarrollo de la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 que permite la transformación de manzanas (*Malus domestica*) al introducir un ORF que produce una sobreexpresión de la tiroxina descarboxilasa, lo que genera una mayor síntesis de dopamina tanto en la planta como en el fruto. Esto genera un mayor tamaño del fruto y una mayor cantidad de pigmentos fotosintéticos bajo condiciones de salinidad, lo que resulta en cultivos que dan mejor rendimiento, aunque sea en condiciones desfavorables. Wang, et al (2020).

Todos estos acontecimientos han conducido al desarrollo de técnicas para seleccionar cultivos, alimentos destinados a mejorar las condiciones de cultivo y de sus e incluso al desarrollo de biocombustibles.

## 4. Conclusiones

El descubrimiento de *Agrobacterium tumefaciens* comenzó como la búsqueda de una solución ante lo que era un problema para convertirse en la clave de uno de los mayores descubrimientos científicos. Este organismo es ahora una de las principales herramientas que nos ha permitido - y permite - generar cultivos modificados genéticamente, pudiendo ensalzar o añadir características que no tenían antes, y así obtener productos que hasta ahora eran impensables. La capacidad de este organismo de transferir ADN a organismo eucariontes abre una senda inexplorada hasta ahora y de la que no se conocen sus límites.

Los estudios de Cavara en 1897 fueron el inicio de algo que no era solamente el descubrimiento de un microorganismo porque 80 años después se afirmó mediante los estudios de Chilton en 1977 que este organismo era capaz de transferir su ADN a las plantas que infectaba. Esto se vio apoyado por el descubrimiento del plásmido Ti y el mecanismo de acción para la transferencia de genes. Este mecanismo ha sido utilizado por la industria agroalimentaria, petrolera o textil entre otras.

Por lo tanto, el descubrimiento de *Agrobacterium tumefaciens* y de su característico mecanismo de transferencia de genes se corresponde con un hito en el ámbito biotecnológico que en principio depara un prometedor futuro para el desarrollo de cultivos modificados genéticamente con el propósito de satisfacer necesidades que hasta ahora no eran posibles o eran muy difíciles de realizar.

O descubrimento de *Agrobacterium tumefaciens* comezou como a búsqueda dunha solución ante o que era un problema para convertirse na clave dun dos maiores descubrimentos científicos. Este organismo é agora unha das principais ferramentas que nos permitiu – e permite – xerar cultivos modificados xenéticamente, podendo enzalzar ou engadir características que non tiñan antes, e así obter produtos que ata agora eran impensables. A capacidade deste organismo de transferir o seu ADN a organismos eucariontes abre un sendeiro inexplorado ata agora y de que non se coñecen os seus límites.

### Conclusiones

Os descubrimentos de Cavara en 1897 foron o inicio de algo que non era soamente o descubrimento dun microorganismo porque 80 anos despois afirmouse mediante os estudos de Chilton en 1977 que este organismo era capaz de transferir o seu ADN ás plantas que infectaba. Isto viuse apoiado polo descubrimento do plásmido Ti e o mecanismo de acción para a transferencia de xenes. Este mecanismo foi utilizado pola industria agroalimentaria, petrolera e téxtil.

Polo tanto, o descubrimento de *Agrobacterium tumefaciens* e do seu característico mecanismo de transferencia de xenes corresponde a un hito no ámbito biotecnolóxico que en principio depara un prometedor futuro para o desenvolvemento de cultivos modificados xenéticamente co propósito de satisfacer necesidades que ata agora non era posible ou era moi difícil de realizar.

## 5. Bibliografia

- Agrios, G. N. (1988). *Plant Pathology*. Academic Press.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Diseases Caused by Prokaryotes: Bacteria and Mollicutes*. *Plant Pathology*, 615–703. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50018-x>
- Basler, M., Ho, B.T., and Mekalanos, J. J. (2013). Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell* 152, 884–894. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.042
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R., & Potrykus, I. (2002). Golden rice: Introducing the  $\beta$ -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin a deficiency. *Journal of Nutrition*, 132(3), 506–510. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.506s>
- Bieber, J., Sarfert, E. (1968). Zur frage der tumorbildung durch deoxyribonukleinsäure aus *Agrobacterium tumefaciens* (Smith&Townsend) conn. *Phytopath. Z.* 62, 323–326. doi:10.1111/j.1439-0434.1968.tb02354.
- Braun, A. C., Laskaris, T. (1942). Tumor formation by attenuated crown-gall bacteria in the presence of growth promoting substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 28, 468–477. doi:10.1073/pnas.28.11.468
- Braun, A.C., Wood, H.N. (1966). On the inhibition of tumor inception in the crown-gall disease with the use of ribonuclease A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1417–1422. doi:10.1073/pnas.56.5.1417
- Cavara, F. (1897a). *Eziologia di alcune malattie di piante cultivate*. *Le Stazioni Sperimentale Agraric Itliana* 30, 482–509.
- Chen, L., Chen, Y., Wood, D. W., and Nester, E. W. (2002). A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 184, 4838–4845. doi:10.1128/JB.184.17.4838-4845.2002
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., et al. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumor genesis. *Cell* 11, 263–271. doi: 10.1016/0092-8674(77)90043-5
- Chilton, M. D., Montoya, A. L., Merlo, D. J., Drummond, M. H., Nutter, R., Gordon, M. P., et al. (1978b). Restriction endonuclease mapping of a plasmid that confers on cogenicity upon *Agrobacterium tumefaciens* strain B6-806. *Plasmid* 1, 254–269.
- Chilton, M.-D., Saiki, R. K., Yadav, N., Gordon, M. P., and Quetier, F. (1980). T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4060–4064. doi: 10.1073/pnas.77.7.4060
- Collins, A. *Agrobacterium tumefaciens*. A Class project for PP728 soilborne plant pathogens. North Carolina State University Department of Plant Pathology. Retrieved December 23, 2020, from [https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Agrobacterium/Alyssa\\_Collins\\_profile.htm](https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Agrobacterium/Alyssa_Collins_profile.htm)
- Conn, H. J. (1942). Validity of the genus *Alcali* genes. *J. Bacteriol.* 44,353–360.

Dessoky, E. S., Ismail, R. M., Elarabi, N. I., Abdelhadi, A. A., & Abdallah, N. A. (2021). Improvement of sugarcane for borer resistance using *Agrobacterium* mediated transformation of cry1Ac gene. *GM Crops and Food*, 12(1), 47–56.

<https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1809318>

Drlica, K. A., Kado, C. I. (1974). Quantitative estimation of *Agrobacterium tumefaciens* DNA in crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 3677–3681.  
doi:10.1073/pnas.71.9.3677

Hamilton, R. H., Fall, M. Z. (1971). The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia* 27, 229–230.  
doi:10.1007/BF02145913

Hedgcock, G.G. (1910). *Field Studies of the Crown-Gall of the Grape*. Vol.183. (Washington, DC: U.S. Dept. Agr. Bureau of Plant Industry Bull).

Inze, D., Folin, F., Van Lijsebettens, M., Simoens, C., Genetello, C., Van Montagu, M., et al. (1984). Genetic análisis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 194,265–274.doi: 10.1007/BF00383526

Jarchow, E., Grimsley, N. H., and Hohn, B. (1991). virF, the host-range determining virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*, affects T-DNA transfer to *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10426–10430.doi: 10.1073/pnas.88.23.10426

Kado, C. I., Lurquin, P. F. (1976). Studies on *Agrobacterium tumefaciens* V. Fate of exogenously added bacterial DNA in *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Plant Pathol.* 8, 73–82.

Kado, C.I. (2010). *Plant Bacteriology*. St. Paul, MN: APS Press.

Koekman, B. P., Ooms, G., Klapwijk, P.M., and Schilperoort, R. A. (1979). Genetic map of an octopine Ti-plasmid. *Plasmid* 2, 347–357.doi:10.1016/0147- 619X(79)90018-0

Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J., Schilperoort, R. A. (1985). The role of bacterial attachment in the transformation of cell-wall-regenerating tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta* 166, 300–308.doi: 10.1007/BF00401165

Lai, E. M., and Kado, C. I. (1998). Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 180,2711–2717.

Lai, E. M., and Kado, C. I. (2000). The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* 8, 8361–8369.doi:10.1016/S0966-842X(00)01802-

Lai, E. M., and Kado, C. I. (2002). The *Agrobacterium tumefaciens* T pilus composed of cyclic T pilinis highly resilient to extreme environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 210,111–114.doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11168.x

Lee, W. S., Tzen, J. T. C., Kridl, J. C., Radke, S. E., & Huang, A. H. C. (1991). Maize oleosin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the maize oleosin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), 6181–6185. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.14.6181>

Li, P., Hwang, I., Miyagi, H., True, H., and Farrand, S. K. (1999). Essential components of the Ti plasmid *trb* system, a type IV macromolecular transporter. *J. Bacteriol.* 181,5033–5041.

Locke, S.B., Riker, A.J., Duggar, B.M. (1938). Growth substance and the development of Crown gall. *J. Agr. Res.* 57,21–39.

Matthysee, A. G. (1986). Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Crit. Rev. Microbiol.* 13,281–307. doi: 10.3109/10408418609108740

Merlo, D. J., Nutter, R. C., Montoya, A.L., Garfinkel, D. J., Drummond, M. H., Chilton, M. D., et al. (1980). The boundaries and copy numbers of Ti plasmid T-DNA vary in crown gall tumors. *Mol. Gen. Genet.* 177,637–643.

Mehrotra, S., & Goyal, V. (2012). *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer in Plants and Biosafety Considerations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(7), 1953–1975. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9910-6>

Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, M. L., & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.06.004>

Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein in to target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15508–15513. doi: 10.1073/pnas.0706532104

Schilperoort, R. A. (1971). "Integration of *Agrobacterium tumefaciens* DNA in the genome of crown gall tumor cells and its expression," in *Proceedings of the Third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* (Wageningen), 223–238.

Schröder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E. W., and Schröder, J. (1984). The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 138,387–391. doi:10.1111/j.1432-1033.1984.tb07927.x

Smith, E. F. (1917). Mechanism of tumor growth in crown gall. *J. Agr. Res.* 8, 165–186.

Smith, E. F., Townsend, C.O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671–673. doi:10.1126/science.25.643.671

Stapp, C., and Bortels, H. (1931). Der Pflanzenkrebs und sein Erreger *Pseudomonas tumefaciens*. II. Mitteilung: Über den Lebenskreislauf von *Pseudomonas tumefaciens*. *Z. Parasitenk.* 4,101–125.

Stroun, M., Anker, P., Gahan, P., Rosier, A., Greppin, H. (1971). *Agrobacterium tumefaciens* ribonucleic acid synthesis in tomato cells and crown gall induction. *J. Bacteriol.* 106,634–639.

Tourneur, J., Morel, G. (1971). Bacteriophage set crown-gall. *Physiol. Veg.* 9, 527–539.

Van Onckelen, H., Prinsen, E., Inzé, D., Rüdelsheim, P., Van Lijsebettens, M., Follin, A., et al. (1986). *Agrobacterium* T-DNA gene 1 codes for tryptophan 2-monooxygenase

- activity in tobacco crown gall cells. *FEBS Lett.* 198, 357–360. doi: 10.1016/0014-5793(86)80436-7
- Von Bodman, S. B., McCutchan, J. E., and Farrand, S. K. (1989). Characterization of conjugal transfer functions of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 171,5281–5289.
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., and Zambryski, P. C. (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38, 455 - 462. doi:10.1016/0092-8674(84)90500-2
- Wang, Y., Gao, T., Zhang, Z., Yuan, X., Chen, Q., Zheng, J., Chen, S., Ma, F., & Li, C. (2020). Overexpression of the tyrosine decarboxylase gene MdTyDC confers salt tolerance in apple. *Environmental and Experimental Botany*, 180(August), 104244. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104244>
- Wendt-Gallitelli, M. F., Dobrigkeit, I. (1973). Investigations implying the invalidity of octopine as a marker for transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Z. Naturforsch.* 28,768–771.
- Went, F. W. (1926). On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetesch.* 30, 10–19.
- White, P. R., and Braun, A.C. (1942). A cancerous neoplasm of plants autonomous bacteria-free crown-gall tissue. *Cancer Res.* 2, 597–617.
- Willmitzer, L., De Beuckeleer, M., Lemmers, M., Van Montagu, M., and Schell, J. (1980). DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells. *Nature* 287, 359–361. doi:10.1038/287359a0
- Wu, H., Chung, P.C., Shih, H. W., Wen, S. R., and Lai, E. M. (2008). Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 190,2841–2850. doi: 10.1128/JB.01775-07
- Yadav, N. W., Vanderleyden, J., Bennett, D. R., Barnes, W. M., and Chilton, M. D. (1982). Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6322–6326. doi:10.1073/pnas.79.20.6322
- Yajko, D. M., Hegeman, G. D. (1971). Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: specific transfer of bacterial deoxyribonucleic acid to plant tissue. *J. Bacteriol.* 108,973–979.
- Yuan, Z. C., & Williams, M. (2012). A really useful pathogen, *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell*, 24(10). <https://doi.org/10.1105/tpc.112.tt1012>
- Zaenen, I., van Larebeke, N., Teuchy, H., van Montagu, M., Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86,109–127. doi:10.1016/S0022-2836(74)80011-2
- Zupan, J. R., Ward, D., and Zambryski, P. (1998). Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 1,649–655.