

ACERCAMIENTO AL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE

Agrobacterium tumefaciens

LILIANA RODRÍGUEZ REYES

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

ESPECIALIZACIÓN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA

BOGOTÁ 2012

ACERCAMIENTO AL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE

Agrobacterium tumefaciens

LILIANA RODRÍGUEZ REYES

MONOGRAFÍA PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

BIOTECNOLOGÍA AGRARIA

ASESOR

LESLIE YANETH LEAL MEJÍA MSc

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

ESPECIALIZACIÓN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA

BOGOTÁ 2012

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

A mis padres,

DEDICATORIA

Es mi deseo como sencillo gesto de reconocimiento, dedicarle mi trabajo de grado plasmado en el presente documento, en primera instancia a mi familia, quienes permanentemente me apoyaron con su espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr las metas y objetivos propuestos.

A los docentes que me han acompañado durante el largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación como estudiante.

A mis amigos Diego Rodríguez, Edward Díaz, Omar Wiest , Maríluz Rodríguez, Hasbleidy Buitrago, María Fernanda Rodríguez, Rossana Rodríguez, Diana Reyes, Daniela González, Andrés Siaucho, Yaneth Dehaquiz, Leslie Leal, Gustavo Forero, Adriana Maldonado y Luz Mery Bernal, que con sus palabras de aliento no me dejaron desfallecer en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud, principalmente está dirigida al Dios por haberme dado la existencia y por permitirme llegar a esta nueva etapa de mi vida.

Igualmente agradezco muy profundamente a todos los organismos y personas que hicieron posible el diseño y ejecución de mi trabajo de grado, entre otros quisiera mencionar:

A la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD por haberme dado la oportunidad de pertenecer a ella y cumplir mis metas propuestas, a todas y todos quienes de una u otra forma han colocado un grano de arena para lograr este Trabajo de grado, agradezco de forma sincera su valiosa colaboración.

"El agradecimiento es la memoria del corazón."

Lao-tse

Tabla de contenido

_Toc335237847

<i>Introducción</i>	11
<i>1. Justificación</i>	12
<i>2. Objetivos</i>	13
2.1. Objetivo General.....	13
2.2. Objetivos Específicos	13
<i>3. Capítulo 1. Aspectos Biológicos de Agrobacterium Tumefaciens</i>	14
3.1. Clasificación Taxonómica.....	14
3.2. Clasificación en biovares.....	15
3.3. Características Fenotípicas	17
3.4. Características Genotípicas	18
3.5. Sistema de secreción tipo IV en Agrobacterium tumefaciens.....	29
<i>4. Opinas</i>	29
4.1. Catabolismo de opinas.....	29
<i>5. Mecanismos responsables de la heterogeneidad</i>	31
5.1. Intercambio Genético entre Plásmidos.....	31
5.2. Mutaciones espontáneas.....	32
5.3. Transposiciones	32
<i>6. Proceso de inducción tumoral</i>	33
6.2. Unión de la Bacteria a la Célula Vegetal	34
6.3. Bordes flanqueantes del T-DNA.....	36
6.4. Producción de una copia transferible de ADN-T	36
6.5. Transferencia del complejo-T a la célula vegetal	37
6.6. Integración del complejo-T en el genoma nuclear de la planta	38

7. Ciclo de la enfermedad agalla de corona.....	39
8. <i>CAPÍTULO 2: Implicaciones biológicas, microbiológicas biotecnológicas y manipulaciones transgénicas de Agrobacterium tumefaciens.</i>	41
8.1 Trasformación Genética de las Plantas	41
9. <i>Aplicaciones de la biotecnología vegetal</i>	45
9.1. Agrobacterium como método de transformación vegetal	47
9.2. Ingeniería genética de plantas usando T-DNA.....	48
9.4. Vectores binarios.....	50
9.5. Vectores cointegrados.....	50
<i>Conclusiones</i>	52
10. <i>Referencias</i>	54

LISTA DE TABLAS

		pág.
TABLA 1	TABLA 1 .Clasificación biovares <i>A. tumefaciens</i>	16
TABLA 2	Clasificación Científica de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en el siguiente Dominio: Bacteria, Clase, Alphaproteobacteria, Orden Rhizobiales, Familia, Rhizobiaceae, Genero, <i>Agrobacterium</i> , Especies <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	16
TABLA 3	Organización genética del plásmido T1.	20

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Fotografía electrónica de <i>A. tumefaciens</i>	17
FIGURA 2. Colonias <i>A. Tumefaciens</i>	18
FIGURA 3. Estructura del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
FIGURA 4. Plásmido Ti	24
FIGURA 5. Sistema de secreción tipo IV con <i>A. tumefaciens</i>	30
FIGURA 6. Plásmidos Ti de octopina	31
FIGURA 7. Esquema de infección <i>Agrobacterium</i>	35
FIGURA 8. Unión de la bacteria a la célula vegetal	35
FIGURA 9. Ciclo de la enfermedad	41
FIGURA 10. Transgénesis de las plantas	43
FIGURA 11. Proceso básico de transformación vegetal utilizando <i>A. tumefaciens</i>	49

INTRODUCCIÓN

Acercarse al estudio del comportamiento biológico de un organismo determinado, permite reconocer los aspectos propios de su desarrollo y de las implicaciones que puede llegar a tener en diferentes contextos.

En este caso, se presenta un acercamiento a la comprensión del comportamiento biológico de *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria que tiene la capacidad de transferir ADN entre los diferentes reinos generando plantas transgénicas, razón por la cual tiene gran importancia a nivel biotecnológico y ha sido ampliamente descrita.

De manera que en este trabajo se reconocerá el comportamiento biológico de *Agrobacterium tumefaciens* y desde allí se comprenderá sus implicaciones a nivel biotecnológico que permitirán hacer un acercamiento a la comprensión y utilización de los mecanismos de transformación de plantas y a partir de esto se podrán reconocer contextos pertinentes para proponer estrategias de enseñanza de temas como transferencia de ADN y métodos de obtención de plantas transgénicas en biotecnología, mediante el diseño de material didáctico para su comprensión.

1. Justificación

La agalla de la corona es una enfermedad vegetal que genera tumores en el cuello de plantas monocotiledóneas y es producida por *Agrobacterium tumefaciens*. Las “agallas” son tumores bulbosos que sobresalen del tallo de muchas plantas como vides, árboles y arbustos frutales entre otros, haciendo que las plantas crezcan mal de manera que provocan pérdidas en las cosechas.

Erwin Smith y C. O. Townsend en 1907, del Departamento de Agricultura de EE.UU., descubrieron que la causa de las agallas de la corona, era una bacteria del suelo con forma de bastoncillo, que posteriormente se conocería como *Agrobacterium tumefaciens*. Hasta ese momento se conocían otras bacterias que hacían que el tejido vegetal muriera, se marchitara o se decolorara, pero *A. tumefaciens* tenía la extraña capacidad de promover la proliferación de células vegetales induciendo la formación de tumores, desafortunadamente estas investigaciones tuvieron importancia solo 40 años más tarde, cuando el fitopatólogo Armin Braun de la Universidad Rockefeller, sintió curiosidad por saber cómo una bacteria podía provocar esos tumores en las plantas.

De esta manera, la inquietud planteada por Braun abrió un espacio clave para avanzar en la comprensión de los procesos que permiten relacionar un proceso patológico vegetal con el comportamiento fisiológico de un microorganismo, así el acercamiento al estudio del comportamiento biológico de *Agrobacterium tumefaciens* se enmarca en una problemática pertinente y relevante, tanto para el contexto biológico como para el contexto biotecnológico y productivo. De acuerdo con esto, generar un proceso de compilación de información y resultados de investigaciones disponibles para futuros estudios que trabajen en torno a problemáticas relacionadas con este organismo fitopatógeno facilitará acercarse a la comprensión de los factores biológicos que están implicados en la relación hospedero-patógeno establecida entre planta y bacteria.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Concretar los aspectos biológicos que intervienen en el comportamiento patógeno de *Agrobacterium tumefaciens*

2.2. Objetivos Específicos

Determinar los aspectos del comportamiento biológico de *A tumefaciens* que tiene implicaciones en su potencial biotecnológico.

Reconocer las potenciales implicaciones biotecnológicas de *Agrobacterium tumefaciens*.

3. Capitulo 1. Aspectos Biológicos de *Agrobacterium Tumefaciens*

A través de los años se han venido realizando investigaciones con bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens*, agentes causantes de cambios morfogenéticos en las plantas, entre las cuales destaca la *agalla de corona*. *A. tumefaciens* es una bacteria del suelo que induce crecimiento de tumores principalmente en plantas dicotiledóneas, provocando una transformación en la planta de manera que se establece un tipo de relación simbiótica que implica un mecanismo altamente evolucionado que permite la transferencia e integración de genes heterólogos.

3.1. Clasificación Taxonómica

De acuerdo con Llop (2003), los primeros en aislar la bacteria inductora de tumores de cuello fueron Smith y Townsend en 1907, quienes la denominaron *Bacterium tumefaciens*. En 1942 Conn indicó la existencia de dos especies cercanas y similares a esta bacteria que producía nódulos en legumbres, por ello propuso el establecimiento de un nuevo género al que denominó *Agrobacterium*. Actualmente, el género *Agrobacterium* se define como el grupo de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* que producen de hipertrofia de tejidos, y pertenecen a la clase alpha del *phylum Proteobacteria*.

Posteriormente, Keane *et al* (1970) propuso subdividir el género *Agrobacterium*, *agregando* tres biovares en atención a sus características bioquímicas y fenotípicas. Esta clasificación permitió a Sawada *et al* (1993) sugerir, que se agrupara a las cepas en tres especies según el biovar al que pertenecían. De este modo, los biovares se concretan como especie y serían nombradas de la siguiente manera *A. tumefaciens* las cepas del biovar 1, *A. rhizogenes* las del biovar 2 y *A. vitis* las del biovar 3.

La última especie fue definida por Ophel y Kerr (1990) quienes demostraron que se trataba de una especie distinguible de *A. tumefaciens* por presentar valores bajos de re-asociación ADN-ADN. Así, una vez mantenidos aparte los aislados de frambueso que se agruparían en la especie *A. rubi* y se creó la especie *A. larrymoorei* que agrupa a los procedentes de *Ficus benjamina* (Bouzar y Jones 2001 citado por Llop 2003). Cada especie puede comprender aislados patógenos y no patógenos y es definida por características codificadas por genes cromosómicos.

Según Smith *et al* (1988) la división en especies del género de *Agrobacterium* se basa en características de patogenicidad (tabla 1): *A. radiobacter*, no patógeno, *A. tumefaciens*, causante de tumores, *A. rhizogenes*, risogénico, causante de la enfermedad de raíces filiformes y *A. rubi* que causa tumores en plantas de frambueso.

3.2. Clasificación en biovares

La organización en biovares, según Belaskri (2006) derivó del análisis de caracteres cromosómicos (Ruger y Hofle, 1992), del ADN cromosomal (Chilton *et al.*, 1980) y de la comparación de los modelos electroforéticos de las proteínas (Kerters *et de Ley*, 1975), estos factores ha demostrado que la gran mayoría de de géneros de *Agrobacterium* se agrupan taxonómicamente de acuerdo a sus características patógenas como se muestra en la tabla 1.

Andrade *et al* (2003), citando a Lippincott *et al.*, (1981) concluye que el biovar 1, es el grupo más grande, que comprende la mayor parte de las cepas de *A. tumefaciens* y *A. radiobacter*. Estas cepas tienen una gran capacidad de adaptación y se pueden aislar a partir de diferentes tipos de suelo. Mientras que las cepas pertenecientes a biovar 2 son más exigentes en relación con las condiciones del suelo y están restringidas en sus asociaciones con las plantas hospederas, en este grupo, se encuentran algunas cepas de *A. tumefaciens* y un gran número de *A. rhizogenes*. El último grupo, la biovar 3, comprende básicamente *A. vitis* que infecta a la vid.

TABLA 1 .Clasificación biovares *A. tumefaciens* Organización, de acuerdo con la patogenicidad, del genero *Agrobacterium* y sus diferentes especies *tumefaciens*, *radiobacter*, *rhizogenes*, *rubi*.

BIOVARES	ESPECIES
biovar 1	<i>A. tumefaciens</i> y <i>A. radiobacter</i> .
biovar 2	<i>A. tumefaciens</i> y <i>A. rhizogenes</i>
biovar 3	<i>A. vitis</i>

Nota tomada de Andrade (2003). Fuente aplicada por el autor.

3.2.1. Clasificación científica *Agrobacterium tumefaciens*

En la actualidad la clasificación taxonómica de este grupo de bacterias se encuentra establecida como se muestra en la tabla 2. Madigan *et al* (2009).

TABLA 2. Clasificación Científica de *Agrobacterium tumefaciens* en el siguiente Dominio: Bacteria, Clase, Alphaproteobacteria, Orden Rhizobiales, Familia, Rhizobiaceae, Genero, *Agrobacterium*, Especies *Agrobacterium tumefaciens*.

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rhizobiales
Familia	Rhizobiaceae
Género	<i>Agrobacterium</i>
Especies	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .

Nota tomada de Madigan (2009). Fuente aplicada por el autor.

Es de señalar que recientemente, una nueva clasificación de las especies de *Agrobacterium* se ha realizado mediante el uso de secuenciación de RNA- r, cual ubica

a *A. tumefaciens*, *A. radiobacter* y *A. rhizogenes*, todas antiguamente como biovar 1, ahora dentro del nuevo taxón: *Agrobacterium tumefaciens* (Llop Citando a Collins (2001)).

3.3. Características Fenotípicas

Según Bergey y Holt (1994) las especies del género *Agrobacterium tumefaciens* pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*; estas bacterias son formadoras de esporas, Gram negativas y su motilidad se produce gracias que poseen de 1 a 6 flagelos peritricos; su tamaño oscila entre 0,6 - 1,0 μm de ancho a 1.5 a 3.0 μm de largo y pueden existir solas o en parejas. (Figura 1).

FIGURA 1. FOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE *A. tumefaciens*



Tomado Del Department of Plant Pathology, North Carolina State University (EE.UU) citado Llop (2003)

Según Bergey y Holt (1994) las colonias usualmente son convexas de forma circular, mucosas, son lisas no pigmentadas de color beige (figura 2). Agrios citado por Morillo (2011) indica que sobre ciertos medios las colonias son estrelladas, morfología que se ha asociado con procesos de reproducción de la bacteria.

En cuanto a las preferencias frente a concentraciones de oxígeno, Bergey y Holt (1994) han sugerido que algunas cepas son aeróbicas, aunque se han descrito

algunas con capacidad de anaerobiosis en presencia de nitrato. Es de señalar que la mayoría de las cepas son capaces de crecer en bajas concentraciones de oxígeno en el interior de los tejidos de la planta ya que son organismos quimioorganotrofos que pueden utilizar un amplio espectro de hidratos de carbono, sales de ácidos orgánicos y aminoácidos.

FIGURA 2. COLONIAS *A. tumefaciens*



Tomado Morillo (2011).

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 y 28° C. El crecimiento en medios con hidratos de carbono va acompañado de una abundante producción de polisacáridos extracelulares en forma de mucus lo cual puede relacionarse con los diversos morfotipos reportados.

3.4. Características Genotípicas

De acuerdo con Llop (2003), *A. tumefaciens* cuenta con dos cromosomas de diferente estructura, uno lineal y el otro circular. Organización bacteriana única que puede tener relaciones con el potencial patogénico del organismo. Sin embargo, a este respecto se ha sugerido que además de los dos cromosomas, se encuentran también

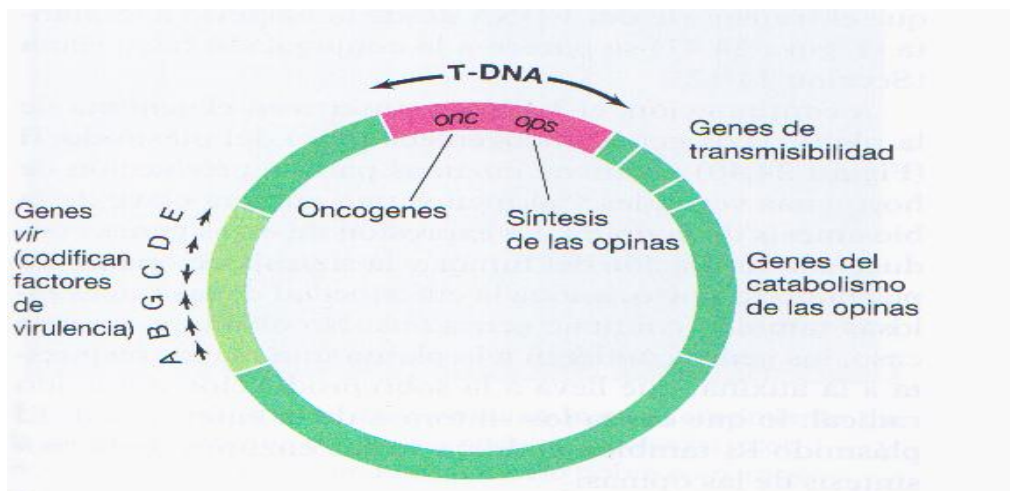
dos plásmidos (Allardent-Servent *et al.*, 1993; Wood *et al.*, 2001; Goodner *et al.*, 2001), de manera que este microorganismo puede tener implicaciones genéticas diversas que le confieran características únicas en su familia.

3.4.1. El plásmido Inductor de Tumores (Ti)

Las células de *A tumefaciens* inducen la formación de tumores solo cuando contiene el plásmido Ti, dado que en él se encuentran las regiones codificantes de una amplia gama de proteínas que la bacteria emplea en el establecimiento de la relación simbiótica con la planta, como se muestra en la figura.3.

Tras la infección, de una parte de plásmido Ti denominada el DNA de transferencia (T-DNA) se integra en el genoma de la planta. El T- DNA es el potador de los genes para la formación del tumor, y también para la producción de diferentes aminoácidos modificados denominados opinas (Madigan et al, 2009).

FIGURA 3. Estructura del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*



Tomado de Madigan (2009).

La organización genética del plásmido Ti está dispuesta en mosaico donde las regiones están más o menos bien conservadas. Globalmente, presenta una estructura modular con genes de funciones similares agrupados juntos. Así, se pueden definir cinco componentes (tabla 3):

TABLA 3. Organización genética del plásmido Ti.

Región T o ADNT
REGIÓN <i>vir</i>
LOCI <i>tra</i> y <i>trb</i>
REGIÓN <i>rep</i>
ADQUISICIÓN Y CATABOLISMO DE OPINAS

Nota tomada de Madigan, et al (2009). Fuente aplicada por el autor.

3.4.2. Región T o ADN-T

Ying 2008 citando a (DeCleene y Deley, 1976; Anderson y Moore, 1979), afirma que *Agrobacterium* transfiere ADN-T, que constituye una pequeña, región del plásmido Ti residente o del plásmido inductor de raíz (plásmido Ri) según sea el caso.

Según Chilton *et al* (1977), (citado por Llop 2003), la región T, que codifica las secuencias específicas tumorales de la planta huésped, es el segmento de ADN que se transfiere desde la bacteria a la célula vegetal. Según Joos *et al* (1983); Leemans *et al* (1982); Zambryski *et al* (1983), a diferencia de los elementos transponibles que pueden moverse repetidamente, el ADN-T una vez transferido permanece estable, y no codifica por sí mismo los productos que media su transferencia. El tamaño del ADN-T varía según el tipo de plásmidos, pero sólo los extremos, llamados bordes, se reconocen durante el proceso de transferencia Wang *et al* (1984); Peralta y Ream, (1985). Estos bordes están formados por 25 pb que flanquean la región del ADN-T como repeticiones

directas (Zambryski *et al*; 1982). Estas secuencias borde dirigen la transferencia de forma polar, en dirección derecha-izquierda, determinada por la orientación de los extremos repetidos, siendo el borde derecho imprescindible para la formación del tumor Joos *et al* (1983); Shaw *et al* (1984); Wang *et al* (1984).

3.4.3. Región vir

De acuerdo con Ying *et al* 2008, la región vir consta de aproximadamente 10 operones (dependiendo plásmido Ti o Ri plásmido) que cumplen cuatro funciones principales: (1) Detección compuestos fenólicos de las plantas para inducir la expresión de los genes vir (vir A y virG). (2) procesamiento de T-ADN en el Ti o Ri plásmido (vir D1 y vir D2), donde Vir D1 es una helicasa y vir D2 es una endonucleasa. (3) Secretor T-ADN y vir proteínas para la Bacterium a través de un sistema de secreción tipo IV (virB operón y virD4). (4) eventos dentro de la célula huésped con la participación del T-DNA citoplasmático, la orientación nuclear, y la integración en el genoma del huésped (virD2, virD5, virE2, virE3 y VirF).

3.4.4. Genes vir

Los genes de virulencia o región *vir* codificada por el plásmido Ti en una región de 35 kb localizada fuera del T-DNA, pueden llegar a 25 genes *vir* diferentes reunidos en 7 operones.

Sin embargo, para que este proceso de transferencia tenga lugar es necesario que, además de contar con una herida en la planta, ésta sintetice una serie de compuestos que induzcan su expresión (Bolton *et al*, (1986); Janssens *et al* (1986); Stachel *et al* (1986)). Dentro de estos, Stachel *et al* en 1986, trabajando con *Nicotiana*

tabacum, identificaron de un grupo de compuestos que inducían la expresión de los genes *vir* al añadir *Agrobacterium* a exudados de heridas practicadas a esta planta. Una de las sustancias más activas, identificada como acetosiringona (Winans *et al*, 1988; Ankenbauer y Nester, 1990; Canguelosi *et al*, 1990 citado por Carranza), la cual puede constituirse, dada su importancia, en un factor de estudio para al abordaje de procesos infecciosos en plantas, derivados del grupo de las agrobacterias.

Vir A y *vir G* son dos genes reguladores necesarios para la activación transcripcional de los operones *vir* según Stachel y Zambrynski (1986a), mientras que estos dos genes son expresados constitutivamente, los demás genes *vir* permanecen silenciados en ausencia de ciertos factores, producidos por la planta, que activan su síntesis.

La inducción de los genes *vir* de *Agrobacterium* implica que el sistema de reconocimiento de la bacteria detecte los compuestos fenólicos producidos por la planta y transmita la información al interior de la célula bacteriana. Este proceso es mediado por el producto de los genes *vir A* y *vir G*. Los inductores como la glucosa o la acetosiringona son reconocidos por Vir A. Según Jin *et al* (1990), la señal percibida por Vir A provoca su autofosforilación en un residuo de histidina específico y esta es transmitida posteriormente a Vir G por la fosforilación del ácido aspártico 52 del dominio receptor de este.

Según Stachel *et al* (1986), una vez se ha producido el reconocimiento y la unión a la célula vegetal susceptible, el siguiente paso en la transformación es la producción de un T-DNA intermediario denominado T-strand. La bacteria produce una copia lineal de cadena sencilla a partir del T-DNA. Juntos VirD1 y VirD2 reconocen las repeticiones directas de los bordes del T-DNA y producen dos cortes entre el tercer y cuarto nucleótido final de cada secuencia repetitiva (Yanofsky *et al* (1986); Wang *et al* (1987); Pansegrau *et al* (1993); Jasper *et al* (1994); Scheiffele *et al* (1995)).

Estos dos cortes marcan los sitios de inicio y terminación de la formación de la Tstrand. VirD1 actúa como una topoisomerasa relajando la doble hélice según Ghai y Das (1989). Tras el corte, VirD2 permanece covalentemente unida al extremo 5' final de la Tstrand (Herrera-Estrella *et al*, 1988; Young y Nester, 1988; Ward y Barnes, 1988) mediante el residuo de tirosina número 29, de esta forma protege a la T-strand de la acción de exonucleasas según Dürrenberg *et al* (1989), a esta protección se suma la proporcionada por VierE2 que también se une, pero a lo largo de toda la T-strand.

VirD2 actúa como proteína piloto impidiendo la delección de este extremo que es imprescindible para la transferencia ya que su delección abole la transferencia (Joos *et al*, 1983; Herman *et al*, 1990). Esta polaridad observada está en total concordancia con el modo en el que se genera la T-strand, ya que su síntesis no puede iniciarse sin el borde derecho mientras que la terminación puede tener lugar sin el izquierdo aunque la frecuencia sea baja.

Según Toro *et al* (1989), las proteínas VirC están implicadas en la formación del complejo de borde, al menos en el caso de los plásmidos Ti para la Octopina. VirC1 se une a la secuencia OD presente en el borde derecho, y dirige el corte realizado por VirD2 en dicho borde, sin embargo, el modo en que VirC1 media la interacción entre VirD2 y OD es desconocido.

FIGURA 4. Plásmido Ti

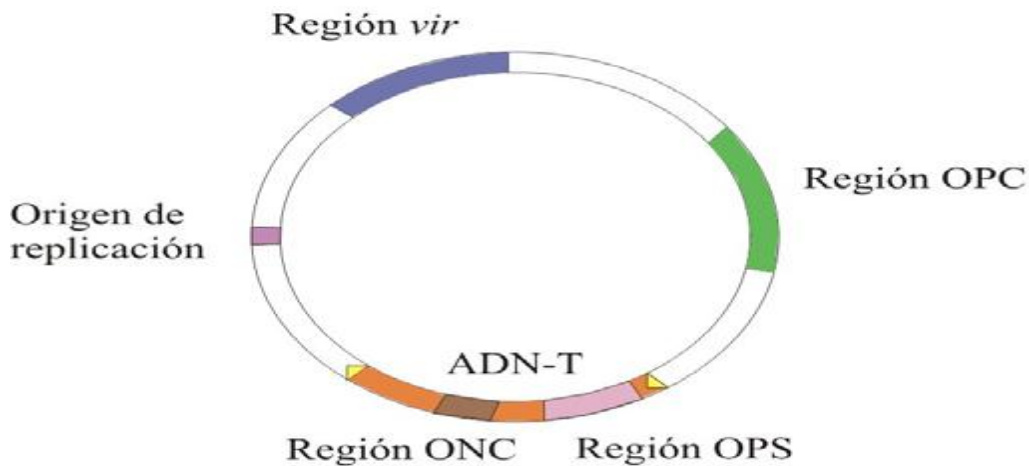


Figura 4: Esquema del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* Petri (2005).

3.4.5. Loci *tra* y *trb*

Tra y *trb* dirigen la transferencia conjugativa del plásmido Ti, los dos loci conforman el sistema de transferencia conjugativa. Basándose en la similitud con otros sistemas de conjugación, el grupo de genes *tra* se necesita, probablemente, para la transferencia y replicación del ADN, mientras que el *trb* forma el par de apareamiento y dirige la síntesis del PILUS conjugativo.

La importancia biológica de la conjugación radica en que permite la transferencia del plásmido Ti de la cepa de *Agrobacterium* a una cepa no patógena con lo que ésta adquiere, una vez transferido el plásmido, la capacidad de producir tumores (Genetello *et al.*, 1977; Kerr *et al.*, 1977 citado por Llop 2003). Este proceso es inducido por la presencia de opinas y autorregulado por un activador transcripcional (TraR). Este activador necesita una lactona específica para activar la expresión de los genes *tra* (Zhang *et al.*, 1993 citado por Llop 2003). Esta lactona superficial celular actuando como una feromona bacteriana, proporcionando un mecanismo para estimar la densidad de población (Fuqua *et al.* 1996 citado por Llop 2003).

3.4.6. Región rep

Se requiere para la replicación del plásmido Ti. Para la replicación estable del plásmido Ti en *Agrobacterium* se requieren tres genes. *RepA* y *repB* se encargan de que durante la división celular, cada célula hija herede al menos una copia del plásmido. El único imprescindible para la replicación vegetativa del plásmido es *repC*. Las funciones de incompatibilidad entre plásmidos también están reguladas por esta región. Se define como incompatibilidad la incapacidad de heredar dos plásmidos determinados de forma estable, pudiendo coexistir dentro de la misma célula antes de su replicación, así, los plásmidos del tipo Octopina son incompatibles con los de Nopalina (Hooykaas *et al*, 1980).

3.4.7. Inducción de la expresión de los genes vir

Según Kado (1991), cuando los compuestos fenólicos de bajo peso molecular están a una concentración de 10^{-5} M y el pH se encuentra entre 5.0 y 5.8 se activan los genes *vir*. La acidez es necesaria para protonar los compuestos fenólicos y así incrementar su permeabilidad de membrana. Esta inducción es un proceso lento que tarda en llegar a los máximos niveles de expresión de 8 a 16 horas según Klee *et al* (1987).

Según Umber (2004), Los genes *vir* están involucrados en la transferencia de ADN-T y cuatro loci (*Vir A*, *vir B*, *vir D* y *vir G*) son necesarios en el proceso, independientemente del huésped. En cuanto a los giros y *Vir C* ellos son importantes para la infección de ciertas especies de plantas. Estos genes son altamente conservados de una cepa a otra e incluso de una especie a otra, tal como se ha confirmado en los genes *vir* de plásmido Ri de *A. rhizogenes* que pueden complementar las realizadas por el plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Hooykaas *et al.*, 1984). Esta similitud entre las dos especies sugiere un mecanismo infección de la misma.

3.4.8 Genes *op*

Experimentos de conjugación realizados en la Universidad de Leiden por Rob A Schiperoort y sus colegas evidenciaron que este plásmido Ti le permitía a la bacteria degradar Octopina o nopalina (opinas) y crecer sobre uno de esos compuestos, además determinaba si el tumor sintetizaría una u otra opina y si era esa opina la que inducía, específicamente, la transferencia del plásmido en la conjugación. El gen *op* es el responsable de la síntesis de opinas.

Basándose en el tipo de opinas codificadas por el plásmido Ti Dessaux (1992) y Vudequin-Dransart (1995) clasificaron un amplio rango de agrobacterias en distintas variedades según indujeran la síntesis de Octopina, nopalina, agropina, succinamopina o Crisopina. Las opinas formadas en los tumores pueden ser metabolizadas por *Agrobacterium* quien lo inicia pero no por la mayoría de las bacterias del suelo según Tempe y Petit (1982). Estas opinas sirven como fuente de carbono y de nitrógeno para el *Agrobacterium* que indujo el tumor y para todos aquellos que presenten los genes para el catabolismo de la opina producida, estos genes que permiten la degradación se localizan en el plásmido Ti pero fuera del T-DNA.

Así, mediante la modificación genética de la planta, *Agrobacterium* crea un nicho favorable para sí mismo, utilizando la maquinaria de la célula vegetal para producir sustancias que no va a utilizar esta pero que permiten el crecimiento de la bacteria, el plásmido Ti simbiótico es, por tanto, el elemento central de una interrelación ecológica altamente evolucionada.

3.4.9. Genes *onc*

Varios estudios de enfermedad de la agalla de corona sugirieron que la formación mediada del tumor del *A tumefaciens* fue iniciada y mantenida por

alteraciones en el metabolismo de la hormona de planta según Binns y Constantino (1998).

Los genes implicados en la síntesis de auxinas y citoquininas dos genes T-DNA modulan las actividades de las mismas. Se trata de *5* y *6b*, el gen *5* influye en las respuestas de la planta a las auxinas mediante la síntesis autorregulada de antagonistas según Körber *et al* (1991) Los genes que regulan los niveles hormonales en la célula infectada son muy importantes puesto que niveles demasiado altos, pueden provocar la muerte de la misma, en lugar de la formación del tumor.

3.4.10. Genes cromosómicos

En el plásmido Ti están dos de los tres componentes genéticos que se requieren para la transformación de la célula vegetal: el ADN-T y la región *vir*. El tercer componente lo forman tres loci de virulencia que se encuentran en el cromosoma: *chvA*, *chvB* y *pscA* (Douglas *et al.*, 1982; 1985; Thomashow *et al.*, 1987 citado por Llop 2003). Los productos de estos loci afectan de forma especial a la composición de la superficie de las células bacterianas, y son esenciales para la unión de *Agrobacterium* a las células vegetales durante el proceso de infección. Los loci *chvA* y *chvB* están unidos en un mismo segmento del cromosoma. La porción *chvB* codifica una proteína de membrana que actúa como intermediaria en la síntesis de b-glucano Zorreguieta *et al* (1988), mientras *chvA* codifica una proteína que transporta el b-glucano al periplasma Cangelosi *et al* (1989).

La expresión del locus *pscA* es necesaria para la síntesis de los polisacáridos ácidos y neutros mayoritarios indispensables para la unión Thomashow (1987) citado por Llop 2003. Al contrario de la expresión de los genes *vir*, que está fuertemente controlada, la de los genes cromosómicos es constitutiva. La secuenciación de todo el genoma de la cepa de *A. tumefaciens* C58 ha permitido la identificación de genes cuyos productos son similares a proteínas de virulencia de patógenos de plantas que se requieren para la degradación de la pared celular, que incluyen pectinasa (gen *kdgF*),

lignasa (gen *ligE*) y xylanasa, así como reguladores de la producción de pectinasa y celulasa (genes *pecS/M*) (Wood *et al.*, 2001 citado por Llop 2003).

3.4.11. Expresión de los genes del ADN-T

Según Spielman y Simpson(1986), una vez que las copias del ADN-T se insertan establemente en el genoma vegetal, se transmiten a las células hijas mediante meiosis o mitosis, comportándose como un locus más de la planta y confiriendo el fenotipo transformado a las células que lo alojan.

Una vez integrado, los genes del ADN-T se expresan en altos niveles ya que contienen señales de transcripción eucariota (Chilton *et al.*, 1980; Willmitzer *et al.*, 1983 citado por Llop 2003). De este modo, se transcriben los genes que producen la síntesis de auxinas y citoquininas que, finalmente, provocan la aparición del tumor y también los que sintetizan las opinas que, a su vez, regulan positivamente los genes para su catabolismo, para la conjugación bacteriana y que estimulan la expresión de los genes de virulencia.

La aparición del tumor no solo depende de la expresión del ADN-T integrado, sino también de la respuesta de la célula vegetal a las hormonas sintetizadas. Esta respuesta del huésped, fenotipo TUMOR, depende en última instancia del metabolismo de las hormonas, ya que se requiere un nivel mínimo para que se produzca y, aunque se transforme la célula, si no es alcanzado éste, no se traduce en tumor.

Un fallo en cualquiera de los siete pasos del proceso que se acaba de exponer implicaría un fracaso en la transformación, en la formación del tumor o una reducción de la virulencia. Sin embargo, se ha visto que son deficiencias en la inducción de los genes *vir* o en el ADN-T los que más frecuentemente contribuyen o bien a reducir el rango de huéspedes o bien a una pérdida del poder patógeno (Kao *et al.*, 1982; Bucholz y Thomashow, 1984; Hirooka y Kado, 1986; Jin *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1990 citado por Llop 2003).

3.5. Sistema de secreción tipo IV en *Agrobacterium tumefaciens*

Según González *et al* (2003). El SSTIV es una vía recientemente identificada, homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitan la translocación de DNA. Este Sistema es un transportador versátil que secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas. El sistema modelo o prototipo para ejemplificar esta maquinaria de secreción es el del transporte de DNA oncogénico o T-DNA (DNA tumoral) y proteínas efectoras (es decir, nucleoproteínas), hacia el núcleo de células de planta, por el fitopatógeno *A. tumefaciens*. Este sistema consiste de 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4 (Fig.5), que transfieren el complejo proteína-DNA en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula eucarionte a través del pilus-T.

4. Opinas

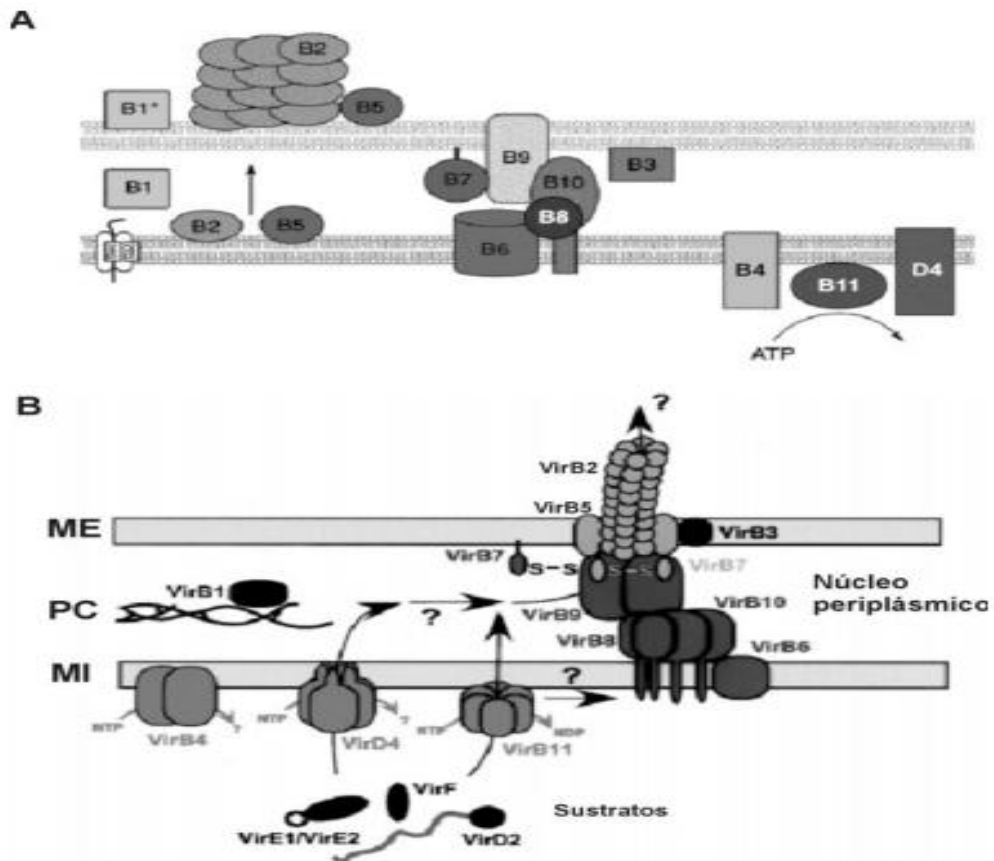
Según Madigan *et al.*, (2009) el T- ADN presente en *Agrobacterium* es el portador de los genes para la formación del tumor, las opinas son derivados de aminoácidos poco frecuentes, donde la síntesis de las opinas es una característica única de las células tumorales, los tejidos de las plantas normales no sintetizan estos compuestos, de los cuales se conocen dos grupos; las octopinas cuyo plásmido es de 194 Kb y las nopalinas con un plásmido de 213 Kb.

4.1. Catabolismo de opinas

Según Llop (2003), los tumores tienen la característica de poseer un metabolismo nitrogenado particular, debido a la posibilidad que tienen de sintetizar las opinas. De modo que todas aquellas células de las plantas que secretan opinas como

resultado de la infección, son utilizadas por la bacteria como fuente de carbono para su crecimiento y reproducción.

FIGURA 5. Sistema de secreción tipo IV con *Agrobacterium tumefaciens*



Tomado de González *et al* (2003).

FIGURA 6. Plásmidos Ti de octopina



Tomado de Mark *et al* (2008).

5. Mecanismos responsables de la heterogeneidad

Los cambios genéticos en cepas de *Agrobacterium* pueden ser debidos a tres causas principales: (Kerr, 1971; Cooksey y Moore 1982a; Otten *et al.*, 1992 citados por Llop 2003).

5.1. Intercambio Genético entre Plásmidos

La frecuencia de la transferencia de plásmidos puede ser alta en tumores debido a la presencia de las opinas que actúan como inductores de la conjugación (Petit *et al.*, 1978; Ellis *et al.*, 1982 citado por Llop 2003). La variabilidad surgiría por el intercambio entre los plásmidos Ti y conduciría a nuevos genotipos. Aunque en principio no debería haber límites para el intercambio entre plásmidos, excepto en el caso de

incompatibilidad entre los mismos, hay datos que sugieren una asociación preferente del plásmido Ti con fondos cromosómicos concretos (Guyon *et al.*, 1993 citado por Llop 2003).

5.2. Mutaciones espontáneas

Se han observado a frecuencias de 10^{-6} a 10^{-7} y si afectan a genes clave en el proceso de infección, el genotipo resultante sería no patógeno, de menor virulencia o con distinto rango de huéspedes (Cooksey y Moore, 1982a; Moore y Canfield, 1996 citado por Llop 2003). Estas mutaciones podrían involucrar tanto al plásmido como al cromosoma, que contiene la mayor parte del genoma bacteriano. Existen diferentes factores, que parecen favorecer la existencia de mutaciones.

5.3. Transposiciones

Se considera que es el tercer mecanismo para introducir variabilidad en *Agrobacterium* a raíz del trabajo de (Yamada *et al.*, 1986 citado por Llop 2003). Este grupo descubrió que los genes *iaa* del plásmido Ti de tipo Octopina de la cepa Ach5 eran homólogos a los de *Pseudomonas savastanoi*. Cada gen estaba unido a un elemento de inserción (IS51), truncado en *Agrobacterium* y a cierta distancia de los genes *iaa*. Por ello, propusieron que estos genes procedían de un transposón (IS51-*iaa*-IS51). (Otten *et al.*, 1992 citado por Llop 2003) analizando distintos elementos de inserción similares a éste y cercanos a los genes *iaa* en distintos tipos de plásmidos Ti, advirtieron que, en ninguno de los casos, las secuencias que formarían parte del transposón inicial se parecen. Aun así, es un mecanismo que no debe ser descartado, ya que existen diversos trabajos en los que se han encontrado elementos de inserción en distintas cepas de *Agrobacterium* (Bonnard *et al.*, 1989; Paulus *et al.*, 1989; De Meirsmann *et al.*, 1990; Paulus *et al.*, 1991; Wabiko, 1992; Fournier *et al.*, 1993; Ponsonnet *et al.*, 1995 citado por Llop 2003).

La frecuencia, significado y contribución de estos tres mecanismos a la variabilidad de aislados no se conoce claramente. De este modo, las cepas de *Agrobacterium* no patógenas que contienen derivados del plásmido Ti que incluyen los genes para el catabolismo de opinas podrían haber aparecido gracias a una combinación de los tres mecanismos: por cointegración del plásmido Ti con otro replicón indígena seguido de reorganizaciones moleculares, mutaciones puntuales, inserción de ADN extraño en genes esenciales para la virulencia o deleciones en esos genes. Todo ello da una imagen clara de la gran complejidad genética del género *Agrobacterium*. Sin embargo, como ya se ha dicho, a pesar de esta diversidad existe un predominio claro de las cepas no patógenas en los distintos hábitats naturales de la bacteria. Esto puede ser provocado por la existencia de una ventaja selectiva de estas cepas frente a las patógenas o a un fenómeno de pérdida de poder patógeno que sufren las cepas patógenas bien de forma espontánea o por la influencia del huésped.

6. Proceso de inducción tumoral

Los descubrimientos más importantes del proceso tumoral se basan en las siguientes características: la tumorigénesis requiere la transferencia de fragmentos de ADN oncogénico a células de la planta infectadas los cuales se encuentran en la región ADN-T de plásmido TI; este proceso evolucionó a partir de un sistema de transferencia conjugativa; los genes que dirigen este proceso se expresan en respuesta a señales químicas que libera el huésped. En la figura 7 se puede observar el diagrama de las principales etapas de la infección (Sheng y Citovsky, 1996 citado por Umber 2004).

1. Unión de las bacterias en la superficie de la célula huésped.
2. La inducción de los genes *vir* por las señales de la planta.
3. Producción de una copia de ADN-T.
4. Exportación y transporte al núcleo de la célula vegetal.
5. Integración de T-ADN en un cromosoma del huésped.

6.1 Reconocimiento de una célula vegetal susceptible

Desde los inicios del estudio de esta enfermedad se comprobó que la bacteria necesita heridas en la planta para iniciar el proceso que termina con la infección. Este hecho se podría explicar de forma simple asumiendo que las células de plantas dañadas presentan una barrera física menor a la penetración e infección que las células no dañadas quienes poseen éstas paredes celulares intactas. Sin embargo, se sabe que las células dañadas secretan compuestos fenólicos de bajo peso molecular que son reconocidos de forma específica como moléculas señal. *Agrobacterium* migra a través de un gradiente de concentración de estos compuestos hacia la herida Kado (1991 citado por Llop 2003). Estos compuestos fenólicos son principalmente acetosiringona (AS) e hidroxí-acetosiringona (OH-AS) (Stachel et al, 1985), flavonoides que incluyen una variedad de compuestos que producen aroma, color y sabor, así como moléculas antimicrobianas específicas como las fitoalexinas (Darvill y Albersheim, 1984; citados por Llop 2003). *Agrobacterium*, usa estos compuestos como señales de la presencia de una planta potencialmente hospedera.

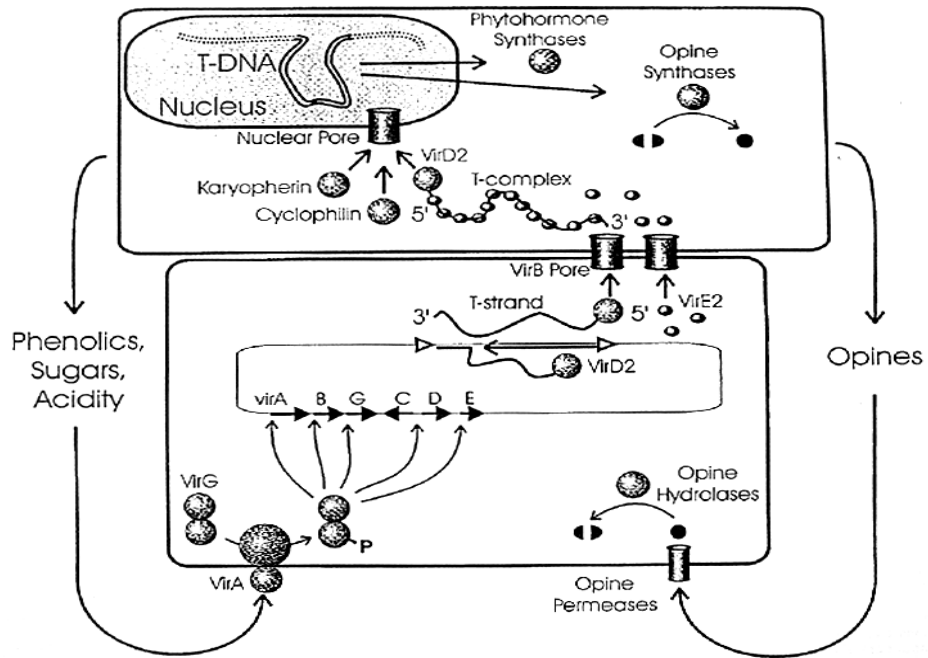
6.2. Unión de la Bacteria a la Célula Vegetal

Una vez que *Agrobacterium* llega a la herida se produce una débil unión inicial, de forma polar y que es reversible según Matthyse (1983). Posteriormente, las bacterias elaboran fibrillas (figura 8) de celulosa que las anclan firmemente a la superficie del huésped (Matthyse *et al*; 1981).

La unión bacteriana a la célula vegetal es saturable y, probablemente, está mediada por una molécula sensible a la proteasa que se encuentra en la superficie de la célula vegetal. Dos proteínas de la pared celular se han propuesto como responsables de la unión: una proteína similar a la vitronectrina según Wagner y Matthyse (1992) y según Swart et al (1994), una proteína de unión. Sin embargo, el

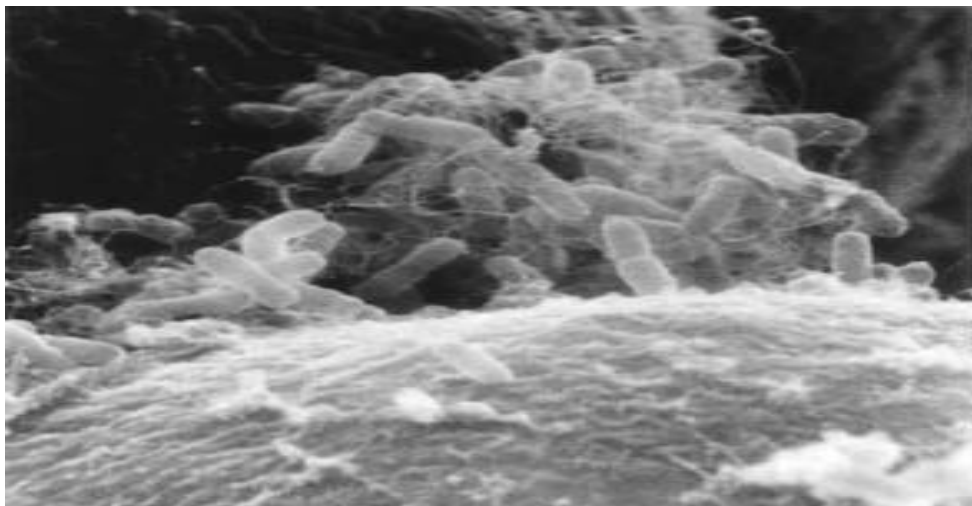
posible papel de estas proteínas vegetales aún no ha sido demostrado mediante análisis genéticos.

FIGURA 7. Esquema de infección por *Agrobacterium*



Tomado de Llop (2003).

FIGURA 8. Unión de la bacteria a la célula vegetal



Tomado de Matthyse *et al* 1981

6.3. Bordes flanqueantes del T-DNA

Según Van Haaren *et al* (1998), a la izquierda y derecha del T-DNA existen dos repeticiones directas de unos 24-25pb que flanquean y definen el T-DNA. Estos bordes son secuencias necesarias para la transferencia según Zambryski *et al* (1983) y normalmente todo el DNA contenido entre los mismos es transferido a la planta. Parece que el borde derecho es crítico en la transferencia del DNA y en el proceso tumorigénico mientras que el izquierdo no afecta a la formación del tumor.

6.4. Producción de una copia transferible de ADN-T

Según Yanofsky *et al* (1986), una vez que los operones *vir* empiezan a transcribirse se produce el proceso de síntesis de la cadena-T, las proteínas codificadas por el operón *virD* reconocen las secuencias terminales que delimitan el ADN-T. La proteína VirD1 pasa el ADN superenrollado a la forma desplegada de acuerdo con Ghai y Das (1989) y, a continuación, VirD2 corta la cadena de ADN inferior por los extremos repetidos en el plásmido del tipo Octopina cada borde es cortado exactamente a cuatro nucleótidos de su extremo izquierdo y se une covalentemente, a través de un residuo de tirosina 29, al extremo 5' de cada cadena rota (Ward y Barnes, 1988; Vogel y Das 1992). Mientras la cadena superior permanece en forma de dúplex, aproximadamente la mitad de las inferiores están en forma lineal de cadena simple y se denominan cadena-T (Stachel *et al*, 1986). Se piensa que la cadena-T se forma por desplazamiento durante la síntesis del ADN mediante el mecanismo de círculo giratorio "rolling-circle" que se inicia a partir del extremo 3' de cada borde derecho. La proteína VirD2, que está fuertemente unida a la cadena-T, le confiere polaridad asegurando que el extremo 5' sea el que entre primero en el núcleo de la célula vegetal. Este complejo ácido nucleico / proteína está compuesto por una única molécula VirD2 que actúa de piloto gracias a sus secuencias tipo NLS unida a un ADN de cadena simple que se denomina complejo-T (Howard *et al*, 1992; Narasimhulu *et al*, 1996 y Zupan *et al*, 2000; citados por Llop 2003).

6.5. Transferencia del complejo-T a la célula vegetal

En este proceso un segmento de ADN específico, el complejo-T, es reconocido y movilizado, hasta la membrana bacteriana, para esto debe atravesar en primer lugar la membrana y pared bacteriana y, posteriormente, la pared celular y la membrana de la célula vegetal. Una vez en la célula vegetal debe moverse a través del citoplasma y cruzar la membrana nuclear hasta llegar al núcleo de la célula vegetal.

VirD2 guía a la cadena-T a través del PILUS compuesto por las proteínas VirB y la proteína VirD4. Aunque se sabe que la formación del PILUS es imprescindible para la transformación, no se sabe si el complejo pasa a través del él o si el PILUS simplemente serviría como un gancho para acercar la bacteria a la célula vegetal (Gelvin, 2000, citado por Llop 2003).

Citovsky *et al* (1992 y Zupan *et al* (2000), proponen que la proteína VirE2 también parece jugar un papel importante como guía del complejo-T ya que posee, como VirD2, secuencias NLS siendo los tipos de secuencia señal de una proteína que median en su transporte del citoplasma al núcleo de la célula vegetal. Esta proteína se une a ácidos nucleicos de cadena simple formando filamentos cilíndricos enrollados según Citovsky *et al* (1997). Se creyó en un principio que VirE2 se unía al complejo-T dentro de la bacteria pero se han encontrado evidencias genéticas que demuestran que se transfieren de forma separada a la célula vegetal, formando un complejo en su citoplasma según Sundberg *et al* (1996); según Gelvin (1998, 2000). Por tanto, ambas proteínas VirD2 y VirE2 dirigen la cadena-T hacia el núcleo de la célula vegetal, pero también pueden hacerlo en levaduras o en células animales (Guralnick, 1996 y Relic ,1998).

En el transporte hacia el núcleo también están implicadas diferentes proteínas de las plantas como la carioferina según Ballas y Citovsky (1997) o la ciclofilina (Deng *et al.*, 1998 citado por Llop 2003) que interactúan con las secuencias NLS de las proteínas Vir. Las ciclofilinas parece que mantienen a la proteína VirD2 en una conformación adecuada para la transferencia, mientras el complejo-T se mueve por el citoplasma.

En muchos aspectos la transferencia del complejo T recuerda a la transferencia conjugativa del ADN plasmídico según Lessl y Lanka (1994) y se ha comprobado que existen grandes similitudes de secuencia entre las proteínas Vir y las Tra según (Kado, 1994; Lessl *et al.*; 1992 citado por Llop 2003) lo que sugiere que el sistema de transferencia del ADN evolucionó a partir del sistema de transferencia conjugativa.

6.6. Integración del complejo-T en el genoma nuclear de la planta

Esta etapa del proceso es poco conocida. En principio, el ADN-T se integra en el cromosoma vegetal por recombinación ilegítima, que es la forma mayoritaria de integración de ADN foráneo en plantas (Matsumoto *et al.*, 1990; Gheysen *et al.*, 1991; Mayerhofer *et al.*, 1991 citado por Llop 2003). Es probable que la mayor parte del ADN-T transferido al núcleo no se integre establemente, ya que el nivel de expresión transitoria es muy superior comparado con la estable (Castle y Morris, 1990; Janssen y Gardner, 1990; Nam *et al.*, 1997 citado por Llop 2003).

El ADN-T entra en el núcleo como una molécula de cadena simple (Tinland *et al.*, 1994; Yusibov *et al.*, 1994; Gelvin *et al.*, 2000 citado Llop 2003), se desconoce si se integra en una zona del ADN vegetal localmente desnaturalizado como cadena simple y después se sintetiza la segunda cadena o si pasa a ser de doble cadena antes de la integración.

El punto de integración parece que es al azar y que no hay requisitos de secuencia específicos en el genoma vegetal para que se produzca según Mayerhofer *et al.* (1991), aunque se ha descrito que la integración se produce preferentemente en zonas con la secuencia de ADN en estado de transcripción activa según Koncz *et al.* (1989) y Herman *et al.* (1990), citados por Llop 2003.

Además de los componentes bacterianos, hay también funciones esenciales de la planta para la integración como las enzimas para la recombinación y reparación del ADN. Actualmente, la implicación de otras proteínas vegetales en esta etapa se está investigando según Nam *et al.* (1999) y Mysore *et al.* (2000).

7. Ciclo de la enfermedad agalla de corona

La bacteria vive como organismo saprófito. Una vez que se encuentran en el interior de los tejidos, las bacterias se sitúan principalmente a nivel intracelular y estimulan a las células circundantes para que se dividan. En la corteza o en la capa del cambium aparecen uno o varios grupos o verticilios de células, hiperplásicas, dependiendo de la profundidad de la herida. Dichas células pueden tener de uno a varios núcleos. Estos se dividen con gran rapidez, produciendo células que no muestran ni diferenciación ni orientación y al cabo de 10 a 14 días después de haberse producido la inoculación, pueden observarse a simple vista por una pequeña hinchazón. Conforme la división y el crecimiento irregular de las células continúan sin interrupción, la hinchazón se agranda y se desarrolla en un tumor joven. En la parte central de los tumores no hay bacterias, pero estas pueden encontrarse intercelularmente en su periferia. En ese momento, algunas de las células se han diferenciado ya en vasos o traqueidas que, sin embargo, no muestran organización alguna y mantiene una o ninguna conexión con el sistema vascular de la planta hospedante. Conforme aumenta el tamaño y la cantidad de la célula tumorosas, ejercen cierta presión sobre los tejidos normales circundantes y subyacentes, los cuales pueden deformarse o aplastarse. La compresión de los vasos xilémicos a causa de los tumores, en ocasiones disminuye la cantidad de agua que llega a la parte superior de una planta hasta el 20 % del nivel normal Según Agrios (2007).

Los tumores jóvenes blandos y lisos no se encuentran protegidos por alguna epidermis, de ahí que sean dañados y atacados con facilidad por los insectos y microorganismos saprofitos según Agrios (2007).

Estos organismos secundarios producen la descomposición y manchado de las capas celulares periféricas de los tumores, los cuales cambian de color café a negro. La degradación de los tejidos tumorosos periféricos libera en el suelo a las bacterias que producen la agalla de corona y que posteriormente son transportadas por el agua e infectan a otras plantas (Agrios, 2007).

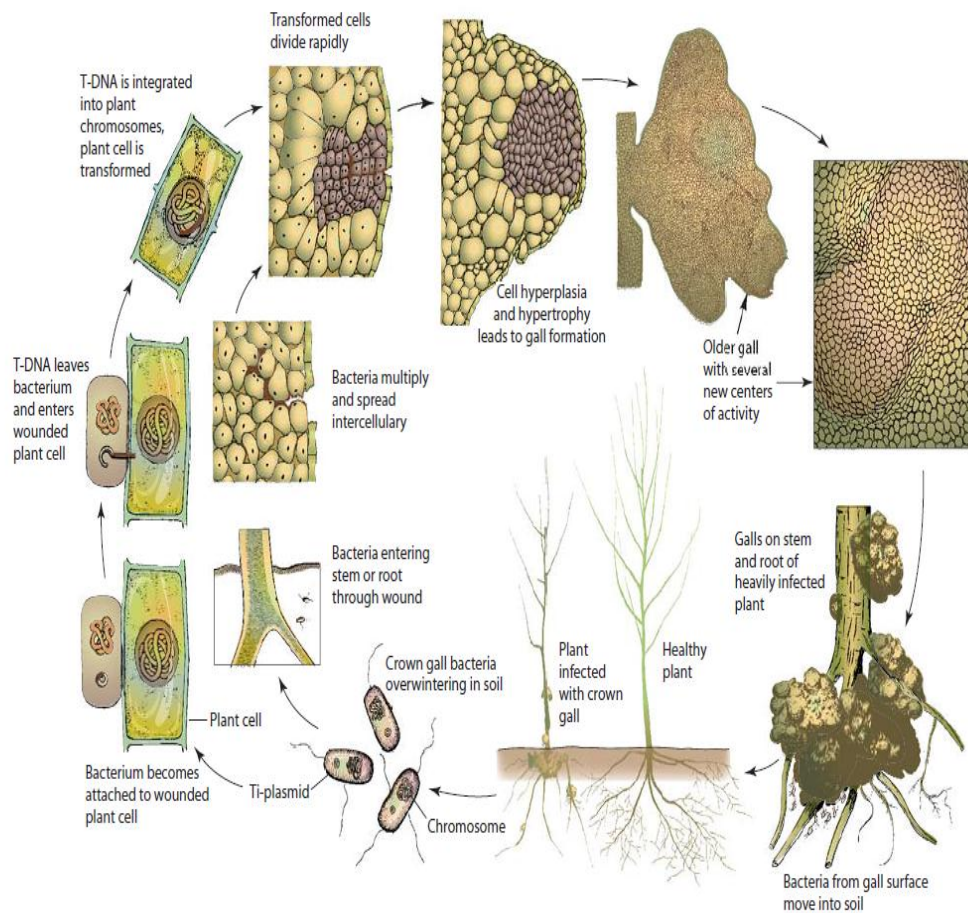
Conforme se extienden los tumores, en ocasiones se endurecen y se vuelven leñosos. Cuando los tumores son incapaces de obtener agua y los nutrientes que requieren para alcanzar un cierto nivel de desarrollo, su crecimiento se detiene, la pudrición prevalece y los tejidos necróticos se desprenden. En algunos casos el tumor deja de crecer y aparecen otros más. Sin embargo, es más frecuente que alguna porción del tumor quede vivo y forme otros tejidos tumorosos durante la misma estación o en las siguientes (Agrios, 2007)

Cuando los tejidos muy jóvenes y en proceso de crecimiento son infectados por el patógeno, además del tumor primario que se desarrolla en el punto de infección, aparecen varios tumores secundarios. Estos a menudo se forman por debajo (pero con frecuencia también por arriba) del tumor primario y a distancias variables de él. En ocasiones, esos tumores se desarrollan en las cicatrices de las hojas caídas o en las heridas producidas por varios agentes (Agrios, 2007).

En otros casos, los tumores secundarios se desarrollan en porciones del tallo que aparentemente no han sufrido daño, en pecíolos e incluso en las nervaduras principales de las hojas o en grandes nervaduras de entrenudos que se encuentran arriba del tumor primario. Su punto de origen es, al parecer, el xilema de los haces vasculares y se encuentran libres de bacterias, debido a que hasta ahora éstas no se han podido aislar cuando se siembran en medios nutritivos (Agrios, 2007)

Cuando los fragmentos de dicho tumores libres de bacterias se injertan en plantas sanas, se desarrollan en grandes tumores de forma y estructura similar a los tumores primarios, pero nunca contienen bacterias. Esto indica que dichas bacterias son importantes solo al principio de la enfermedad, quizás debido al efecto irritante que despliegan sobre las células vegetales. Una vez que las células de la planta se han vuelto malignas, producen sus propios compuestos irritantes y su crecimiento fuera de control se vuelve autónomo (Fig. 9). (Agrios, 2007).

FIGURA 9. Ciclo de la enfermedad



Tomado de Agrios, 2007.

8. CAPÍTULO 2: implicaciones biológicas, microbiológicas biotecnológicas y manipulaciones transgénicas de *Agrobacterium tumefaciens*.

8.1 Trasformación Genética de las Plantas

Agrobacterium tumefaciens tiene la capacidad de transferir ADN entre reinos diferentes. El impacto de este hallazgo ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología. El conocimiento básico sobre el mecanismo de transferencia del ADN ha permitido el desarrollo de vectores para la

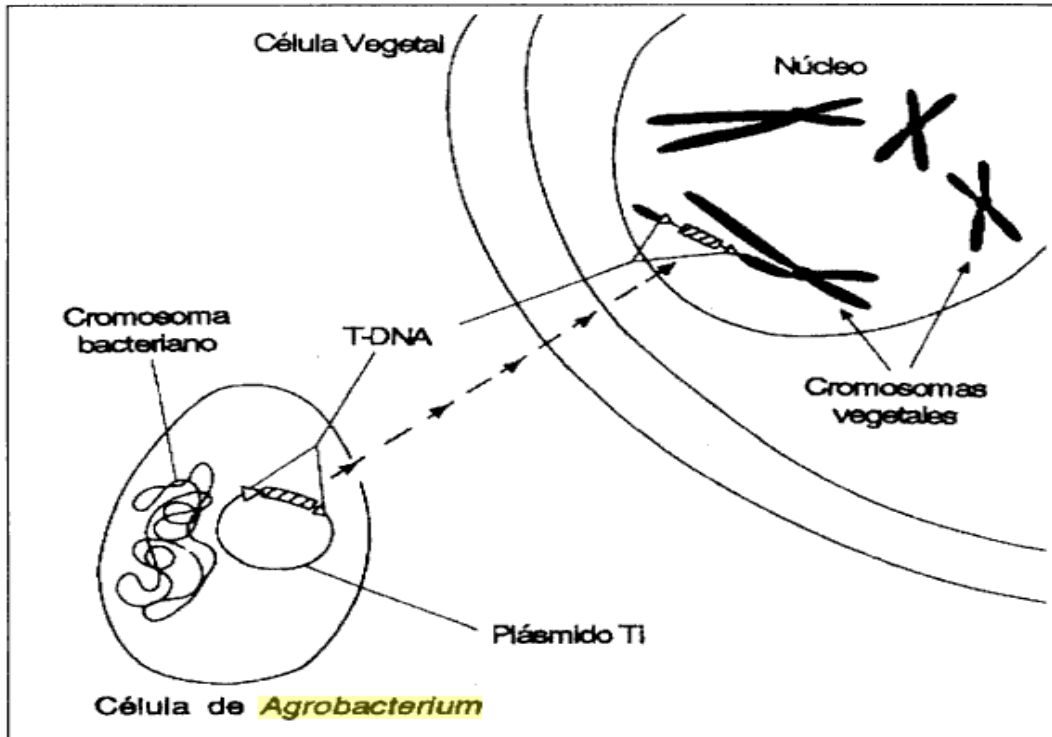
introducción de genes foráneos, dentro de los cuales se describen los 2 tipos de vectores utilizados en la actualidad: co-integrados y binarios. Así mismo se existen algunos factores importantes que median la transformación y algunas de las principales aplicaciones de la transformación de plantas y hongos mediada por *Agrobacterium* (Valderrama 2005).

La transformación por *Agrobacterium* puede realizarse en una célula vegetal aislada a la que se ha desnudado, eliminando su pared celular (protoplasto), en un trozo de tejido foliar en cultivo (explante) o, incluso, en una planta en desarrollo. Este último método, que hasta ahora sólo se ha puesto a punto en *Arabidopsis*, es el más fácil ya que sólo requiere sumergir una planta con su botón floral en una suspensión de la bacteria portadora del T- ADN deseado y hacer un breve vacío. Esto conduce a la transformación de algunas de las células germinales de los tejidos florales. En la descendencia se identifican las plantas portadoras de T-ADN (Olmedo, 2001).

Los tumores producidos por *Agrobacterium tumefaciens*, son el resultado de un evento de ingeniería genética, en el que una región específica de plásmido (ADN bacterial organizado en forma circular adicional al lineal de la bacteria), inductor de tumores se integra a la célula.

En la figura 10 se muestra la región que se transfiere, llamada T-ADN, contiene genes responsables para biosíntesis de dos hormonas vegetales una auxina (ácido Indol acético) y una citoquinina (ribóxido de zeatina), responsables del sobrecrecimiento del tejido infectado (FAO, 2001)

FIGURA 10. Transgénesis de las plantas



Tomado de la Política y Programas en América Latina y el Caribe. FAO (2001)

Los plásmidos Ti son los utilizados como vectores para la introducción del ADN foráneo en las plantas mediante la remoción ONC (oncogene) “plásmido desarmado” y en su reemplazo se coloca un gen portando la secuencia de interés que se va a transferir al genoma de la planta. Según Olmedo, el método de transformación más utilizado hasta la fecha es el basado en la habilidad de la bacteria para transferir e integrar ADN propio en un tramo concreto, denominado T-ADN en la célula vegetal a la que infecta. Los genes incluidos en el T-ADN son capaces de perturbar la regulación del crecimiento de la célula infectada (se multiplica como si fuera un tumor), y de hacer que esta célula fabrique unas sustancias que sirven de alimento exclusivo para la bacteria porque sólo ella está equipada para digerirlas. Si se eliminan estos genes, pero se respetan los extremos del T-ADN, éste retiene la capacidad de ser transferido a la planta aunque pierde la capacidad de formar tumores y la de producir sustancias nutritivas para la bacteria. Si introducimos genes ajenos entre los bordes del T-ADN, la bacteria introducirá estos genes en la célula vegetal y los integrará en un cromosoma de ésta. Una vez integrados, los genes se expresarán y se transmitirán a la

descendencia del mismo modo que lo hacen los que componen el genoma original (Olmedo,2001).

8.1.1 Marcadores moleculares

Aunque existen varios métodos para transformar plantas, es quizá la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* el método más natural, conveniente y sencillo para introducir genes de otro organismo en ellas. Por lo tanto, la transformación genética puede saltarse la barrera sexual de tal manera que cualquier gen de cualquier origen puede ser introducido.

Es necesario usar herramientas genéticas, bioquímicas y moleculares para identificar el gen apropiado y poder expresarlo en el lugar y momento adecuados. El método alternativo cuando la planta no es sensible a la infección por *Agrobacterium*, es la biobalística o bombardeo por partículas de tungsteno, las cuales se recubren con el ADN que lleva clonado el gene deseado. Para el caso de *A. tumefaciens*, algunos de los genes de esta bacteria se transfieren a los cromosomas de la planta, en particular los que codifican enzimas de la biosíntesis de hormonas vegetales, las cuales son heredadas a la progenie de las células transformadas.

Estudios realizados han permitido el diseño de protocolos específicos de diagnóstico en plantas con tumores para la detección de infecciones latentes, basados inicialmente en PCR convencional con control interno según Cubero (1999) y recientemente en PCR a tiempo real. Además se han diseñado técnicas de tipado específico mediante RAPD según Llop (2003), y se ha profundizado en el conocimiento de la biología de la bacteria en distintos huéspedes.

Los avances más significativos han tenido lugar en el control biológico de esta enfermedad, demostrándose la eficacia de dicho método y estudiándose los mecanismos implicados en el mismo. Ambas han resultado eficaces frente a distintas cepas patógenas, en distintos huéspedes y condiciones según Penyalver et al (2000).

Igualmente se ha demostrado la importancia de la transferencia de plásmidos entre el agente de biocontrol y el patógeno en este sistema de control biológico (Vicedo et al., 1996), y se ha estudiado el comportamiento de cepas transconjugantes según López-López et al (1999).

De igual forma se utilizan análisis del sistema de RAPDs en investigaciones de caracterización molecular de poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens* sobre una colección de cepas caracterizadas que han comprobado la validez del sistema para identificar cepas de *Agrobacterium* se escogieron 39 cepas de la colección del IVIA (Instituto valenciano de investigaciones agraria), que provinieron tanto de colecciones internacionales como de aislados obtenidos en el propio laboratorio. Las características de las cepas empleadas, los huéspedes de donde se han obtenido y sus lugares de origen. Estas cepas se escogieron con el propósito de tener una representación lo más amplia posible del género *Agrobacterium*, por lo que se incluyeron cepas patógenas y no patógenas, con distintos perfiles de plásmidos y diferentes fondos cromosómicos, provenientes de distintos orígenes geográficos y aisladas de distintos huéspedes. Los análisis se realizaron con los cuatro iniciadores empleando suspensiones bacterianas únicamente. Posteriormente se realizó un análisis de conglomerados (cluster) utilizando como algoritmo de clasificación el enlace promedio (UPGMA) para confirmar que los patrones de bandas obtenidos en cada caso diferían lo suficiente para discriminar las cepas estudiadas. Como medida de la distancia se empleó el índice de Jaccard (1908).

9. Aplicaciones de la biotecnología vegetal

Varias estrategias se aplican en biotecnología para obtener plantas tolerantes a virus, patógenos e insectos, resistentes a los herbicidas y adquirir una mayor calidad nutricional.

La introducción de genes dentro de las plantas es una técnica muy promisoría para lograr plantas tolerantes a infecciones virales. El término *Protección cruzada* ha sido utilizado para identificar la protección obtenida por una planta después de su inoculación con una cepa benigna de un virus, que la protegería de la infección causada por una cepa virulenta del mismo virus, es posible conferir tolerancia a los virus utilizando métodos que regulen la expresión de la ARN viral, una vez se halle éste dentro de la célula.

Hay dos estrategias prometedoras para inducir en las plantas resistencia a los insectos: La resistencia conferida por la toxina de la bacteria *Bacillus thuringiensis* y la acción de los inhibidores de proteasas inducidos por heridas causadas en la planta. La bacteria *B. thuringiensis* produce un polipéptido activo el cual es tóxico para muchas especies de insectos; las plantas regeneradas produjeron suficiente toxina para asegurar la protección contra el ataque de los insectos según (Roca *et al*, 1991 citado por Forero, 2009).

Aunque las plantas tienen contenidos de los aminoácidos esenciales menores que en los animales, una estrategia para corregir estos defectos es la síntesis de genes que codifiquen para proteínas homopoliméricas (que contengan un solo tipo de aminoácidos) o para proteínas conformadas por la repetición de 2 o 3 aminoácidos esenciales; se han sintetizado y clonado los genes (Sp44,Sp47) que codifican para los polipéptidos poseedores de un alto contenido de los aminoácidos esenciales más limitantes de una dieta a base de cereales y tubérculos.

Las técnicas de la manipulación genética son importantes en el contexto general de la agricultura moderna; la biotecnología agrícola se encargará de conectar áreas básicas de la biología molecular y la biología celular con las prácticas agrícolas tradicionales; esta labor de conjunto producirá las nuevas variedades de plantas que se cultivarán en los próximos años según Forero (2009).

9.1. *Agrobacterium* como método de transformación vegetal

La biología molecular y la ingeniería genética en plantas se inician con el descubrimiento y el estudio de *A tumefaciens*. Esta bacteria, Gram negativa, induce la formación de tumores, denominados agalla de la corona, generalmente en la unión del tallo con la raíz, en numerosas dicotiledóneas y en muy pocas monocotiledóneas y gimnospermas según De Cleene y De Ley (1976). Esta bacteria del suelo infecta a dicotiledóneas como parte de su ciclo vital insertando genes foráneos en las mismas y consiguiendo que se expresen en forma de proteínas.

En 1947, Armin C. Braun del instituto Rokefeller de Investigación Médica, logró cultivar tejido de la agalla libre de bacteria, pudiendo observar como los tumores crecían *in vitro* en un medio básico carente de auxinas y citoquininas (hormonas necesarias para el crecimiento de células vegetales normales). Braun concluyó que la bacteria introducía en las células un “principio tumorígeno”.

En 1965, Menagué y Morel del instituto de investigaciones agronómicas de Versailles, observaron que las células tumorígenas podían sintetizar una serie de derivados de intermediarios metabólicos de la mayoría de los aminoácidos, cetoácidos y azúcares. Denominaron a estas sustancias químicas opinas.

Fue en 1974 cuando Jeff Schell, Marc Van Montangu y sus colaboradores de la Universidad de Gante, encontraron plásmidos muy desarrollados en las cepas virulentas y observaron que eran transferidos desde estas a cepas no virulentas por conjugación.

Luego el “principio tumorígeno” del que hablaba Braun, responsable de la formación de la crown gall (en ausencia de la bacteria) era la transferencia de un fragmento de DNA llamado T-DNA que a su vez se localizaba en un plásmido al que se denominó Ti (de inductor de tumores). Tras la transferencia el T-DNA se integraba en el genoma nuclear de la planta y su expresión inducía el fenotipo tumoral (Carranza).

9.2. Ingeniería genética de plantas usando T-DNA

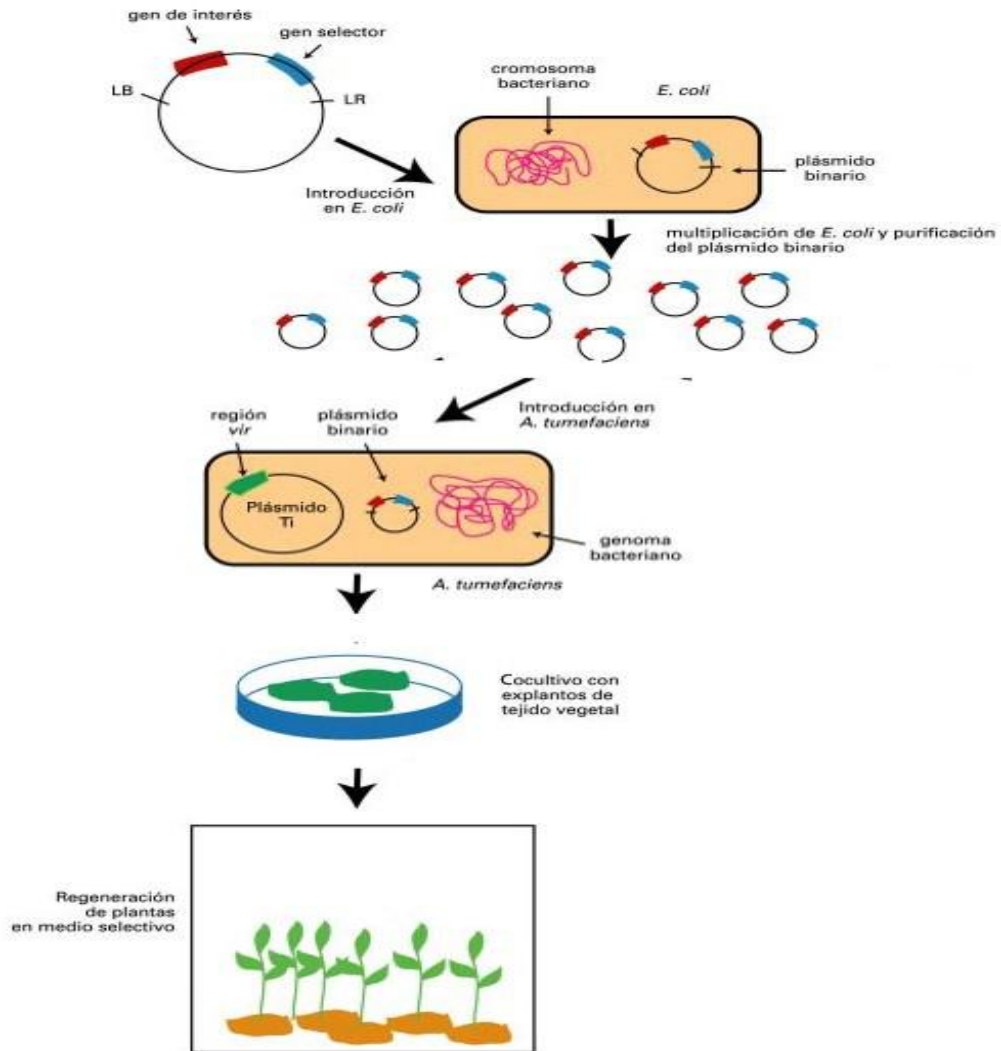
Desde el punto de vista de la microbiología y de la patología vegetal, tanto en las agallas del tallo como en las raíces pilosas existe una interacción estrecha entre la planta y la bacteria que conducen el intercambio genético desde la bacteria a la planta, esto es, Ti es el sistema natural de la transformación de plantas. De esta forma, en los últimos años el interés del estudio de las agallas del tallo ha dejado de interesar por la enfermedad y se ha pasado aplicar este proceso natural de intercambio genético en la biotecnología vegetal según Madigan (2009).

Mediante manipulación genética se han desarrollado varios plásmidos Ti que carecen de los genes que provocan la enfermedad, pero que todavía son capaces de transferir a las plantas, se han utilizado para la construcción de las plantas modificadas genéticamente (transgénicos). Hasta ahora se han construido muchos transgénicos, incluidas plantas de cultivo que resisten a los herbicidas, ataque de los insectos y al sequia según Madigan (2009).

9.3. Patentes en vectores y métodos binarios

Los sistemas binarios del vector son los sistemas más de uso general para la transferencia mediada *Agrobacterium* del gen a las plantas. En estos sistemas, el T-DNA la región, que contiene un gen del interés está situada en un vector del plásmido y la región de vir está situada en un separado, desarmó (careciendo genes del tumor) vector del plásmido de Ti. Los plásmidos co-residen en *Agrobacterium* y siguen siendo independientes según Tzifira, Citovsky (2008)

FIGURA 11. El proceso básico de transformación vegetal utilizando *A. Tumefaciens*



Tomado de Petri (2005).

Los elementos básicos de vectores binarios son demandados por Mogen (ahora Syngenta llamado Mogen B.V. y parte de Syngenta Co.) en dos unió Patentes de los estados y una patente europea que expiraron en 2004. (A “patente europea” es una no patente a nivel europeo sino algo una patente que ha sido examinada y concedida por la oficina de patentes regional, Oficina Europea de Patentes y para tener fuerza en un país particular, la patente europea se debe colocar en la oficina de patentes del país. Actualmente, 31 países han firmado encendido a la convención de patente europea.

Alternativamente, una solicitud de patente puede ser examinada y ser concedida por las oficinas de patentes individuales en europeos países (según Tzifira, Citovsky (2008)).

9.4. Vectores binarios

Estos son los vectores más usados para la transformación de plantas y se encuentran en una gran variedad. En este sistema *Agrobacterium* tiene dos vectores: uno que contiene la región del T- ADN con el gen de interés y otro vector que contiene la región vir. Los vectores binarios Ti tienen sitios de replicación para *Escherichia coli* y *A. tumefaciens*, permitiendo el desarrollo de técnicas de manipulación in vitro en *E. coli* según Hellens y Mullineaux, (2000). Dentro de los vectores simples binarios se encuentran pBIN 19, pC22, pGA482, pPCV001, pGreen y pCAMBIA entre otros. Su principal diferencia radica en el tamaño, el número de sitios de restricción del ADN-T, la presencia de genes reporteros, los orígenes de replicación y el antibiótico de selección en bacterias y plantas según Hellens y Mullineaux, (2000).

9.5. Vectores cointegrados

Estos vectores son construidos por la recombinación entre un plásmido Ti desarmado que contiene el borde izquierdo y un pequeño vector que contiene el gen de interés flanqueado por el borde derecho y una región homóloga al borde izquierdo. La recombinación se lleva a cabo por un evento de entrecruzamiento de regiones homólogas de los dos plásmidos. Un ejemplo de este sistema es el plásmido de *Agrobacterium* co-integrado R772: pTiB6 según Hille et al (1983 citado por Llop 2003). Algunos vectores cointegrados han sido modificados para tener una recombinación sitio específica como el sistema cre/lox según Vergunst; Jansen y Hooykaas (1998). En este sistema la cepa de *Agrobacterium* contiene un plásmido que codifica para una recombinasa, una secuencia para el control de su expresión, genes vir y un sitio de recombinación. Este plásmido se recombina con otro plásmido, que contiene el gen de

interés flanqueado por el borde derecho, generando un plásmido co-integrado sitio específico según Valderrama (2005).

Conclusiones

El modelo de transformación vegetal por medio de *A. tumefaciens* junto con sus modificaciones genéticas que utilizan el plasmido Ti, permite delimitar los genes vir produciendo una pérdida de poder patógeno en las plantas modificadas.

Se obtuvo una importante recolección bibliográfica donde se enmarcan las diferentes investigaciones que se han realizado a través de los años con *A. tumefaciens* poniendo en evidencia su importancia en aspectos biológicos en la biotecnología; los documentos indagados apuntan a reconocer y comprender las implicaciones biotecnológicas que *A. tumefaciens* le aporta a diferentes campos en ciencia agrícola.

En la actualidad existen varios métodos utilizados con diferentes cepas de *A. tumefaciens*, con los cuales se pueden obtener buenos resultados de lo que realmente se busca. El estudio de *A. tumefaciens* ha sobrepasado barreras inimaginables que tal vez el hombre y la agricultura jamás imagino con el uso de la biotecnología.

Se han realizado experimentos de infección de diversos huéspedes vegetales y, de los tumores producidos, se han aislado colonias de las que se ha estudiado el fenotipo patógeno, para comprobar la frecuencia de aparición de este fenómeno estudiando cambios a nivel molecular y las modificaciones que han sufrido. También se han llevado a cabo experimentos in vitro, mediante siembras sucesivas en un medio general, para ver si la pérdida del fenotipo patógeno se produce de forma espontánea.

El género *Agrobacterium* contiene un plásmido característico llamado Ti donde la mayoría de los genes que contiene juegan papeles directos o indirectos en la tumorigénesis en las plantas.

La aparición del tumor no solo depende de la expresión del ADN-T integrado, sino también de la respuesta de la célula vegetal a las hormonas sintetizadas. Esta respuesta del huésped, fenotipo TUMOR, depende en última instancia del metabolismo de las hormonas, ya que se requiere un nivel mínimo para que se produzca y, aunque

se transforme la célula, si no es alcanzado éste, no se traduce en tumor.

Referencias

Caranza D, Transformación de células vegetales Obtención de plantas transgénicas Diana Carranza. <http://ciencia-en-red.uncachodeciencia.org/> <http://ciencia-en-red.uncachodeciencia.org/biologia/Transformacion%20de%20celulas%20vegetales%20obtencion%20de%20plantas%20transgenicas.pdf>

Agrios G. (2007). Fitopatología. Segunda Edición. Limusa. México D.F. Pp 533-587.

Allardet, S. A., Michaux, C. S., Jumas, B. E., Karayan, L., Ramuz, M. 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J Bacteriol.* 175:24-7874

Andrade et al (2003). Biología molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. Brasil. Pág 466-467.

Ballas, N., y Citovsky, V. 1997. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:10723-28.

Belaski, A. (2006). Incidence de la maladie du Crown gall de l' eucalyptus dans les pépinières Forestières de l'ouest algérien. Université abou Bekr Belkaid Tlemcen. Faculté des Sciences. Pág 7.

Binns y Constantino (1998). The *Agrobacterium* Oncogenes. *Molecular biology og model plant-associated bacteria.* edición spaink, HP, Kondonosi, A; Hooykaas. 251-266

Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J.A., Lee, C.C., Theines, C., Nester, E.W. 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of β -1,2-glucan. *J Bacteriol.* 171: 1609-1615.

Chilton, M. D., Saiki, R. K. et al. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumour cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4060-4064. (FAO, 2001)

Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D., Zambryski, P. 1992. Nuclear localization of *Agrobacterium* vir E2 protein in plant cells. *Science* 256: 1802-1805.

Cubero, J., Martínez, M., Llop, P., López, M.M. 1999. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *J Appl Microbiol* 86: 591-602.

De Cleene M and Ley J.1976. The host range of crown gall. *Botanical Review* 42: 389-466.

Dürrenberger, F., Cramer, A., Hohn, B. and Koukolikova-Nicola, Z. (1989). Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 9154-9158.

FAO Organización de las Naciones Unidas para la agricultura (2001). *Política y Programas de Semillas en América Latina y el Caribe*. Ed Roma. México. Pp 149-151.

Forero, G, (2009). *Biología I. Escuela de ciencias agrícolas y de medio ambiente*. UNAD. Bogotá. Colombia. Pp 87-88.

Gelvin, S. B. (1998). *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol.* 180:4300-2.

Ghai, J. y Das, A. 1989. The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3109-3113.

González et al (2003). *Sistemas de secreción de proteínas en bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia*. Universidad nacional

autónoma de Mexico. Pag 45-63.

Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Slater, S. 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. 294: 2323-2327. Hellens y Mullineaux, (2000).

Guralnick, B., Thomsen, G., Citovsky, V. (1996). Transport of DNA into the nuclei of *Xenopus* oocytes by a modified VirE2 protein of *Agrobacterium*. *Plant cell* 8:363-373. Herman et al, 1990).

Herrera. E et al, 1988; Vir D proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA – protein complex of the 5' terminus of T-strand molecules. *EMBO J*. 7: 4055-4062.

Holt J (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Preston Street. Ninth edition. pg 74

Hooykaas, P. J., den Dulk-Ras, H., Ooms, G., Schilperoort, R. A. 1980. Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 143:1295-1306.

Jin, S., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Nester, E. W. 1990a. Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *J Bacteriol* 172:4945-4950.

Joos, H., Inzé, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M., Schell, J. 1983. Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell* 32: 1057-1067.

Kado, C. I. 1991. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 1-32. Keane et al (1970)

Kerster, K. y De Ley, J. (1975). Genus III *Agrobacterium* Conn. 1942. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol I. Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp 244-254.

Klee, H., Horsch, R. et al. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann Rev Plant Physiol.* 467-486.

Körberg, H., Strizhov, N., Staiger, D., Feldwisch, J., Olsson, O., Sandberg, G., Palme, K., Schell, J., Koncz, C. 1991. T DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxins response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *EMBO J* 10: 3983-3991.

Leemans, J., Deblaere, R. Willmitzer, L., DeGreve, H., Hernalsteens, J. P., Van Montagu, M., Schell, J. 1982. Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 1: 147-152.

Lessl, M., Balzer, D., Pansegrau, W., Lanka, E. 1992. Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti virB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J. Biol. Chem.* 267:20471-20480.

Llop, P, (2003). Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens*. Valencia. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Pp 3,31.

López-López MJ, (1999) Behavior of a virulent strain derived from *Agrobacterium radiobacter* strain K84 after spontaneous Ti plasmid acquisition. *Phytopathology* 89: 286-292.

Madigan et al (2009). *Biología de los microorganismos*. Pág 801

Mark et al, (2008). *Bioquímica*. Barcelona. Pp 157-158.

Matthyse, A. G. (1983). Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J Bacteriol.* 154: 906-915.

Matthyse, A. G.; Holmes, K. V., Gurlitz, R.H. (1981). Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol.* 145: 583-595.

Mayerhofer, R.Z., Koncz-Kalman, C., Nawrath, G., Bakkeren, A., Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz C. (1991). T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* 10:697-704.

Mysore KS, Nam J, Gelvin SB. (2000). An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* TDNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:948-53.

Nam et al (1999) *Agrobacterium*-Mediated Root Transformation Is Inhibited by Mutation of an *Arabidopsis* Cellulose Synthase-Like Gene. Departments of biological sciences and botany and plant pathology, university, west lafayette, indiana 47907, and department of biology, university of north carolina. *plant physiol.* vol 133.1000- 1009.

Ophel, K. y Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* new species for strain of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevine. *International J Syst Bacteriol.* 40: 236-241

Pansegrau, W., (1993). Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: Analogy to bacterial conjugation. *Biochemistry* 90:11538-11542.

Penyalver R, et al, (2000) Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. *J Plant Pat* 106: 801-810.

Petri, C (2005). Transformación genética del albaricoquero (*prunus armeniaca* l.), mediada por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas. Universidad de murcia departamento de biología vegetal. 83-98.

Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, Matsumoto S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised description for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *International J Syst Bacteriol.* 43: 694-702.

Scheiffele, P, et al (1995) E. Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. *En: Journal of Biological Chemistry.* Vol. 270; p. 1269-1276.

Shaw, C.H., Watson, M.D., Carter, G.H., Shaw, C.H. 1984. The right hand copy of the nopaline Ti plasmid 25 pb repeat is required for tumor formation. *Nucleic Acids Res* 12:6031-6041.

Smith, E.F y Townsend, C.O. 1988. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.

Spielmann, A., Simpson, R. B. 1986. T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites. *Mol Gene Genet* 205:34-41.

Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry* 27: 2781-2785.

Stachel, S.E., y Nester, E.W. 1986. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 5: 1445-54.

Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A., Ream W. 1996. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol* 178:1207-1212.

Swart, S., Lugtenberg, B. J. J., Smit, G., Kijne, J. W. 1994. Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *A. tumefaciens* chvB mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. *J Bacteriol* 176:3816-3819. Tempe y Petit (1982).

Toro, N., Datta, A., Carmi, O.A., Young, C., Prusti, R.K., Nester, E. W. 1989. The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *J Bacteriol.* 171: 6845-6849.

Tzifira, Citovsky (2008). *The Agrobacterium-Plant Cell Interaction. Taking Biology Lessons from a Bug* 1,2. Department of Biochemistry and Cell Biology, State University of New York, Stony Brook, New York 11794.

Umber, (2004). Etude de l'oncogene orf8 d'agrobacterium inst.itut de biologie moléculaire des plantes upr cnrs 235. 7-68.

Valderrama A, Isaza R, Afanador I. (2005). Plant transformation mediated by *Agrobacterium*: "applied natural genetic engineering". Universidad Nacional Medellín. Colombia.2575-2585.

Van Haaren, M.J.J., Pronk, J.T., Schilperoort, R.A. and Hooykaas, P.J.J. (1987). Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti-plasmid left and right T-Region border fragments. *Plant Molecular Biology* 8: 95-104.

Vergunst; Jansen y Hooykaas (1998). Positive charge is an important feature of the
Vogel, A. M. y Das A. 1992. The *Agrobacterium tumefaciens* virD3 gene is not essential for tumorigenicity on plants. *J Bacteriol* 174:5161-5164

Wagner, V. T. y Matthyse, A. G. 1992. Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. *J Bacteriol.* 174: 5999-6003
Wang et al (1984) Wang et al (1984); Peralta y Ream, (1985).

Wang, K., Genetello, C., van Montagu, M., Zambryski, P. C. 1987. Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. *Mol Gene Genet* 210:38-346.

Ward, E. R. y Barnes, W. M. 1988. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science* 242: 927-930

Wood, D. W., Setubal, J. C. Kaul, R. Monks, D. E. Kitajima, J. P. Okura, V. K. Zhou, Y. Chen, L. Wood, G. E. ... Nester, E.W. 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* :2001-2328. Yanofsky et al (1986), Ying 2008.

Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K., Goodman, H. M. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J Mol Appl Genet.* 1: 361-370.

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2:2143-2150.

Zorreguieta, A., Geremia, R. A., Cavaignac, S., Cangelosi, G. A., Nester, E. W., Ugalde, R. A. 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol Plant Microbe Inter* 1:121-127.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23: 11-28.