

Agrobacterium: cuatro décadas colaborando con la biotecnología

Agrobacterium: four decades collaborating with biotechnology

Javier Montalvo Arredondo¹, Erika Nohemi Rivas Martínez², Aida Isabel Leal Robles², Marco Adán Juárez Verdayes^{1*}

Recibido:

14/10/2024

Aceptado:

16/11/2024

Publicado:

20/11/2024

¹Departamento de Ciencias Básicas, <https://orcid.org/0000-0003-4651-5387>, <https://orcid.org/0000-0002-3948-4036>. ²Departamento de Botánica, <https://orcid.org/0000-0002-7595-7638>, <https://orcid.org/0000-0003-4420-4964>. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, CP 25315. Buenavista, Saltillo Coahuila.

*Autor de correspondencia:

relf125@hotmail.com.mx

Resumen

En la naturaleza, el proceso de transformación genética ocurre de manera natural entre diversos organismos. Desde la descripción de las Agrobacterias como el agente causal de tumores en diferentes tipos de plantas y su capacidad de transferir material genético, se ha llevado a cabo un extenso estudio para adaptar esta capacidad como una herramienta biotecnológica para la introducción de nuevas secuencias a las células susceptibles de las plantas. Actualmente, se dispone con una serie de cepas para la entrega del material genético, y su utilización para transformar plantas ha permitido el estudio de diversos procesos celulares, como la simbiosis, el desarrollo de la raíz y la respuesta a diferentes tipos de estrés. Además, el uso de esta metodología ha facilitado el desarrollo de diversas variedades de plantas con características deseables, como plantas resistentes a la sequía y la resistencia a plagas ejemplificada en el maíz y el algodón (Bt). En la actualidad existen varias metodologías para transferir la información genética a plantas, pero la utilización de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* son la primera elección. En esta revisión bibliográfica se estudiarán las principales aportaciones al descubrimiento de las Agrobacterias causantes de tumores y su posterior utilización como una herramienta en la biotecnología.

Palabras clave:

Biología, Transformación, Agrobacterium, Agrobacterias, Raíces pilosas.

Abstract

In nature, the process of genetic transformation occurs naturally among diverse organisms. Since the description of Agrobacteria as the causal agent of tumors in different types of plants and their ability to transfer genetic material, an extensive study has been carried out to adapt this ability as a biotechnological tool for the introduction of new sequences to susceptible plant cells. Currently, a number of strains are available for the delivery of genetic material, and their use to transform plants has allowed the study of various cellular processes, such as symbiosis, root development and response to different types of stress. In addition, the use of this methodology has facilitated the development of diverse plant varieties with desirable traits, such as drought-resistant plants and pest resistance exemplified in corn and cotton (Bt). Currently, there are several methodologies for transferring genetic information from other living things to plants, but the use of *A. tumefaciens* or *A. rhizogenes* are the first choice. In this review, the main contributions to the discovery of tumor-causing Agrobacteria and their subsequent use as a tool in biotechnology will be studied.

Key words:

Biotechnology, Transformation, Agrobacterium, Agrobacterias, hairy roots.

INTRODUCCIÓN

La palabra “microorganismo” suele asociarse coloquialmente con enfermedades. Sin embargo, muchos de ellos han sido utilizados a lo largo de la historia para nuestro beneficio en diversos aspectos de la vida cotidiana. Por ejemplo, la bacteria *Bacillus subtilis* se emplea en la producción de amilasa, una enzima que degrada el almidón en azúcares de menor tamaño; la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada durante siglos en procesos fermentativos para la elaboración de pan y cerveza, y la bacteria *Escherichia coli* tiene un papel importante en el área médica por su utilización en la producción de insulina recombinante. Pero la utilización de organismos se extiende incluso en la modificación genética de células vegetales, con el fin de mejorar sus características morfológicas y fisiológicas, aumentar su rendimiento en la producción y generar resistencia a condiciones bióticas y abióticas del entorno (Lahue *et al.*, 2020; Fehler *et al.*, 2022; Koul, 2022).

En plantas, los cambios en la información genética pueden tener aplicaciones tanto en la ciencia básica como en la aplicada. En la ciencia básica, se busca entender la función de una o varias secuencias genéticas (un gen o varios genes) en un proceso específico. En la ciencia aplicada, estos cambios pueden utilizarse para incorporar nuevos rasgos o funciones a las plantas, lo que conocemos como fitomejoramiento (Gao, 2021).

Las herramientas comúnmente utilizadas para la modificación genética en plantas se agrupan en métodos directos e indirectos. Los métodos directos se subdividen en físicos y químicos, mientras que los métodos indirectos incluyen el uso de *Agrobacterias* y virus.

En los métodos directos, la transferencia del transgén a la célula huésped se realiza mediante técnicas físicas o químicas. Entre estas técnicas se encuentran la electroporación, la microinyección, la sonicación, la biolística de partículas y la transferencia génica mediada por fibras de carburo de silicio, entre otras (Saifi *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2023).

En los métodos indirectos, se utilizan microorganismos para la generación de plantas transgénicas, a través de metodologías que emplean virus o bacterias. Estos métodos han sido utilizados desde principios de la década de 1980, siendo algunos de los microorganismos más empleados *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, debido a su capacidad para generar un alto porcentaje de transformaciones en una amplia variedad de especies vegetales (Saifi *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2023).

Para un análisis detallado de los métodos de transformación, se recomienda consultar las siguientes lecturas (Saifi *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2023; Koul, 2022).

Antecedentes históricos de la enfermedad de la agalla de la corona

La enfermedad de la agalla de la corona en las plantas susceptibles se caracteriza por la aparición de un crecimiento anormal en forma de tumores o agallas y que inicialmente son de color claro y aspecto esponjoso, características que cambian a medida que maduran, adquieren un color marrón oscuro y una textura leñosa.

Estas lesiones generalmente se observan en la base del tronco y en las raíces de árboles y plantas leñosas (Figura 1). Aunque la enfermedad y el proceso de transformación han sido objeto de numerosos estudios se mencionan a continuación, algunos de los trabajos más relevantes.

Se reconoce que la enfermedad fue descrita en 1679 por el fisiólogo y anatomista italiano Marcello Malpighi sin saber el agente causal, en sus ilustraciones realizadas de encinos y álamos se lograba observar los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, hasta ese momento, el agente causal de la enfermedad era desconocido y no fue hasta 1897 que Fridiano Cavara, trabajando con la planta *Vitis vinifera* (uva) en los jardines botánicos de Nápoles, describió el aislamiento de *Bacillus ampelopsorae* (posteriormente llamado *Agrobacterium vitis*) y observó que al exponer plantas sanas a este microorganismo se desarrollaban los síntomas de la enfermedad (Escobar and Dandekar, 2003; Malpighi *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2023).

Posteriormente, los fitopatólogos estadounidenses Smith y Townsend en 1907, publicaron el trabajo titulado "A plant tumor of bacterial origin", en el que trabajaron con plantas de margarita (*Paris daisy*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), papa (*Solanum tuberosum*) y durazno (*Prunus persica*). En este estudio, lograron aislar una bacteria de muestras infectadas con la capacidad de infectar plantas sanas y que desarrollaron los mismos síntomas que las plantas enfermas. Además, observaron que los tejidos viejos mostraban una baja susceptibilidad en comparación con los tejidos jóvenes. Al final de su investigación mencionan lo siguiente: "la enfermedad es, por tanto, una enfermedad transmisible, pero la causa, a pesar de los estudios realizados por muchas personas, sigue siendo controvertida". Al microorganismo aislado y capaz de desarrollar la enfermedad lo llamaron *Bacterium tumefaciens*, y posteriormente fue renombrado como *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend, 1907).

Finalmente, después de tres siglos desde la descripción inicial de la enfermedad de la agalla de la corona y una serie de avances científico-tecnológicos en el campo de la biotecnología vegetal, en el año 1983 se logró crear una de las primeras plantas transgénicas en tabaco (*Nicotiana tabacum*) con la ayuda de *A. tumefaciens* (Zambryski *et al.*, 1983).

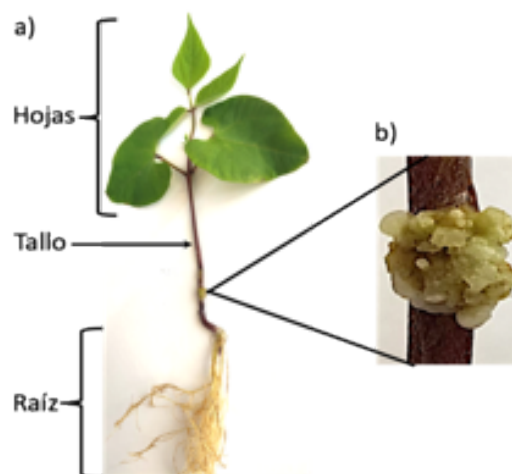


Figura 1. Planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculada con *Agrobacterium rhizogenes*. a) Partes vegetativas del frijol: hoja, tallo y raíz. b) Crecimiento tumoral en el tallo de frijol debido a la inoculación con *A. rhizogenes*.

Taxonomía y propiedades microbiológicas de las Agrobacterias

La familia *Rhizobiaceae* presentan una importante distribución y diversidad genética e incluye los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Agrobacterium* (Veremeichik *et al.*, 2023). En este último género se encuentran las bacterias nombradas como Agrobacterias, término que hace referencia al grupo de bacterias responsables de las enfermedades neoplásicas (tumores) en plantas (Conn, 1942; Stapp and Knösel, 1954; Carareto Alves *et al.*, 2014; de Lajudie *et al.*, 2019).

A más de ocho décadas de la clasificación taxonómica del género *Agrobacterium*, esta continúa siendo objeto de debate. Young *et al.*, en 2001, propusieron una actualización en la taxonomía basada en la secuenciación del gen *rrs*, renombrando a *Agrobacterium rhizogenes* como *Rhizobium rhizogenes* y *Agrobacterium tumefaciens* como *Rhizobium radiobacter* (Young *et al.*, 2001). Posteriormente, en el 2009 se agruparon a estas bacterias en tres biovariedades: en el biovar I se encuentra *A. tumefaciens* C58, en el biovar II, *A. rhizogenes* y en el biovar III, *A. vitis* S4 (Slater *et al.*, 2009).

Independientemente de los debates sobre su clasificación, las Agrobacterias se consideran una de las herramientas más utilizadas en la biotecnología vegetal, ya que son capaces de transferir ADN a un amplio rango de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Hohn *et al.*, 1989, Conner and Dommissé, 1992; Fukuoka *et al.*, 2000). Además, se utilizan para transformar otros organismos, como hongos y levaduras (Hooykaas *et al.*, 2018; Roushan *et al.*, 2022; Prostack *et al.*, 2023).

Para la comodidad de los lectores, se utilizará el nombre de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, ya que estos términos siguen siendo los más utilizados hasta la fecha.

Las Agrobacterias y la biotecnología

El género *Agrobacterium* fue catalogado en 2012 como uno de los tres géneros de bacterias patógenas más importantes en plantas, ubicándose solo después de *Pseudomonas syringae* y *Ralstonia solanacearum* (Mansfield *et al.*, 2012). La capacidad natural de las Agrobacterias para transferir información genética ha sido aprovechada por los investigadores para realizar manipulaciones genéticas en plantas con fines agrícolas y de investigación. Sin embargo, hasta este punto hemos identificado a *A. tumefaciens* como el agente causal de la enfermedad de la agalla de la corona.

No obstante, una cepa estrechamente relacionada, denominada *A. rhizogenes*, es la responsable de una enfermedad neoplásica en las raíces de las plantas (Bagal *et al.*, 2023; Stieger *et al.*, 2004). Esta enfermedad se caracteriza por la generación de nuevas raíces adventicias a partir de heridas infectadas, conocidas como "Hairy roots", término acuñado por Riker en 1930 mientras trabajaba con árboles de manzano (Riker *et al.*, 1930; Azizi-Dargahlou and pouresmaeil, 2024).

La elección de la especie de *Agrobacterium* adecuada depende del objetivo específico de la investigación o del desarrollo científico-tecnológico. Por ejemplo, el uso de cepas de *A. tumefaciens* permite lograr transformaciones transitorias o estables en plantas. La transformación transitoria es una técnica sencilla y versátil que facilita la caracterización funcional de genes de interés, y puede realizarse en diferentes partes de las plantas, como embriones inmaduros, plántulas, hojas y bulbos, entre otros (Zhang *et al.*, 2020; Bélanger *et al.*, 2024).

En contraste, la transformación estable busca obtener plantas completas en las que el transgén se herede en las siguientes generaciones (Krenek *et al.*, 2015; Bélanger *et al.*, 2024). Por otra parte, el uso de cepas de *A. rhizogenes* induce la formación de raíces transgénicas en plantas susceptibles. Estas raíces se utilizan comúnmente para estudiar procesos celulares a nivel radicular o en biorreactores para producir diversos compuestos, como anticuerpos, biopesticidas (por ejemplo, azadiractina) y pigmentos (como betalaína) (Pavlov and Bley, 2006; Srivastava and Srivastava, 2012; Lonoce *et al.*, 2016; Bapat *et al.*, 2023).

La constante utilización de cepas de *Agrobacterium* específicamente *A. tumefaciens* C58 ha permitido la generación de una serie de nuevas cepas con el mismo fondo cromosómico, entre las que encontramos a C58C1, AGL1, GV3101, ABI, EHA101, EHA105 y AGL0, además de otras (Kiryushkin

et al., 2022). De manera rutinaria para la transformación de plantas, se utilizan las cepas: LBA4404, GV3101, C58C1, EHA101 y EHA105 entre otras (Deeba *et al.*, 2014). En el Cuadro 1 se muestran diferentes cepas de *Agrobacterium* las cuales transformaron plantas de interés agronómico.

Estudios relacionados al mecanismo molecular indican que el proceso por el cual se transfiere la información genética de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* a la célula de la planta es conservando en ambas cepas (Bevan and Chilton, 1982). En ambos casos, es necesaria la presencia de un plásmido: el plásmido pTi (inductor de tumores) en *A. tumefaciens* y el plásmido pRi (inductor de raíces transgénicas) en *A. rhizogenes* (Van Montagu and Zambryski, 2017; Bevan and Chilton, 1982).

Cepa	Plásmido (pTi /pRi)	Planta susceptible	Referencia
<i>A. tumefaciens</i> (LBA4404)	pAL4404	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	(Van Eck <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)	pTiBo542	<i>Cucumis sativus</i> L. (Pepino)	(Liu <i>et al.</i> , 2023a)
<i>A. tumefaciens</i> (EHA101)	pTiBo542	<i>Musa</i> sp. (Plátano)	(Pérez <i>et al.</i> , 2007)
<i>A. tumefaciens</i> (EHA105)	pTiBo542	<i>Prunus cerasus</i> (Cereza)	(Song and Sink, 2006)
<i>A. tumefaciens</i> (AGL-1)	pTiBo542	<i>Triticum aestivum</i> L. (Trigo)	(Hayta <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. tumefaciens</i> (LBA1834)	pRAL1834	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	(Ooms <i>et al.</i> , 1987)
<i>A. tumefaciens</i> (1D1609)	pTi1D1609	<i>Medicago sativa</i> L. (Alfalfa)	(Palumbo <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. rhizogenes</i> (K599)	pRi2659	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol)	(Estrada-Navarrete <i>et al.</i> , 2006)
<i>A. rhizogenes</i> (A4)	pRiA4	<i>Carica papaya</i> (Papaya)	(Bermúdez Guzmán <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. rhizogenes</i> (LBA 9402)	pRi1855	<i>Lotus japonicus</i> (Trébol japonés)	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. rhizogenes</i> (ATCC15834)	pRi15834	<i>Gossypium hirsutum</i> (Algodón)	(Triplett <i>et al.</i> , 2008)
<i>A. rhizogenes</i> (C58C1)	pRi15834	<i>Pogostemon cablin</i> (Pachuli)	(Han-jing <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. rhizogenes</i> (LBA9402)	pRi 1855	<i>Papaver somniferum</i> var. album (Adormidera)	(Le Flem-Bonhomme <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. rhizogenes</i> (MSU 440)	pRiA4	<i>Litchi chinensis</i> (Lichi)	(Qin <i>et al.</i> , 2021)
<i>A. rhizogenes</i> (NIAES1724)	pRi1724	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco)	(Isogai <i>et al.</i> , 1990)

Tabla 1. Plantas susceptibles a la transformación por *Agrobacterium*.

Los plásmidos pTi/pRi presentan diferencias en tamaño y en el contenido de la información genética, las cuales son debidas a múltiples eventos de transferencia horizontal de genes (HGT) y eventos de recombinación (Bevan and Chilton, 1982; Hooykaas and Hooykaas, 2021; Bahramnejad *et al.*, 2019). Se han propuesto diferentes estrategias para clasificar a los plásmidos y una de ellas es por el tipo de opinas que se producen en los tumores, para los pTi tenemos a los de octopina, nopalina, succinamopina, agropina y crisopina, y para los pRi los de agropina, mannopina, cucumopina y mikimopina (Dessaux *et al.*, 1998; Otten *et al.*, 2008).

Antes del desarrollo de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), solo se disponía de la secuencia de unos pocos plásmidos pTi/pRi. Actualmente, se han secuenciado los genomas completos de diversas cepas de *Agrobacterium*, así como varios cientos de plásmidos pTi/pRi y con esta información se han realizado análisis genómicos comparativos mucho más exhaustivos. Por ejemplo, un análisis de 350 secuencias de ADN-T agrupa estas secuencias en tres grupos principales, subdivididos en varios subgrupos (Otten, 2021). En cuanto a los plásmidos pTi/pRi, se clasifican actualmente en 11 tipos de pTi (I-XI), donde el grupo IV se subdivide en IVa, IVb y IVc. En cambio, los plásmidos pRi se agrupan en solo tres tipos principales (I-III) (Weisberg *et al.*, 2020, Weisberg *et al.*, 2021).

Por otra parte, los plásmidos pTi y pRi presentan dos regiones esenciales y compartidas. La primera es la región de virulencia, que incluye a los genes *vir*, cuya expresión es crucial en diferentes

etapas de la infección de la planta (Figura 2). Los genes *vir* se clasifican en cuatro grupos según su importancia:

Grupo 1: Contiene genes esenciales (*virA*, *virB1*, *virD1*, *virD2*, *virD4* y *virG*).

Grupo 2: Incluye genes importantes, pero no esenciales (*virC1-2*, *virE1* y *virE2*).

Grupo 3: Comprende genes relacionados con la especificidad del hospedero, que pueden potenciar la transformación en un huésped específico (*virD3*, *virD5*, *virE3* y *virF*).

Grupo 4: Contiene genes cuya función aún no ha sido completamente descrita (*virH1-2*, *virI*, *virK*, *virL* y *virM*) (Gelvin, 2017).

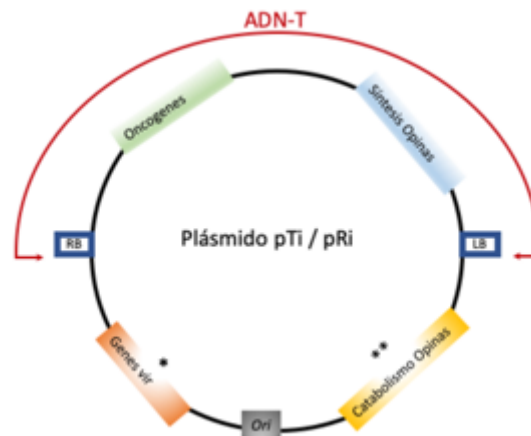


Figura 2. Estructura general de los plásmidos pTi/pRi. En esta figura se muestra la región de ADN-T delimitada por el borde derecho (RB) y el borde izquierdo (LB). En esa región se encuentran los oncogenes y los genes de la síntesis de opinas. También se muestran las regiones de los genes *vir* (*) y los genes del catabolismo de opinas (**)(Matveeva and Sokornova, 2016).

La segunda región presente en ambos plásmidos consiste en secuencias repetidas de 25 pares de bases, las cuales delimitan los bordes del ADN-T: el borde izquierdo (LB) y el borde derecho (RB). Además de estas secuencias, la transferencia del ADN-T requiere la participación de genes codificados en el cromosoma de *Agrobacterium*. Estos genes desempeñan un papel crucial en la detección de las condiciones ambientales y en la modulación de la inducción de virulencia, como *chvG*, *chvE*, *chvI* y *exoR*. Otros genes como *chvA*, *chvB* y *exoC*, intervienen en la adhesión a las células vegetales (Gelvin, 2017; Lacroix and Citovsky, 2022; Kuzmanović *et al.*, 2023).

Por otra parte, en los plásmidos pRi se encuentran cuatro genes denominados “*rol*” (del inglés root oncogenic locus): *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*. Estos genes desempeñan un papel crucial en la formación de raíces pilosas “hairy roots”, las cuales se caracterizan por un crecimiento masivo de raíces adventicias en el sitio de la infección. Diversos estudios han demostrado que estos genes son importantes reguladores de varios procesos celulares en las plantas, incluidos el control de fitohormonas, como auxinas y citoquininas, y la defensa vegetal (Mauro *et al.*, 2017) y de forma contraste a *A. tumefaciens* la síntesis de fitohormonas no es regulada lo que impulsa un crecimiento desorganizado (tumores) (Nilsson and Olsson, 1997).

Transferencia del material genético bacteriano a las plantas

El modelo del proceso de transformación genética de las plantas mediada por *Agrobacterium* se puede dividir en cinco etapas funcionales (Gelvin, 2003, Jin *et al.*, 2022) (**Figura 3**):

ETAPA I. RECONOCIMIENTO Y QUIMIOTAXIS BACTERIANA.

ETAPA II. INDUCCIÓN DEL SISTEMA DE VIRULENCIA BACTERIANO.

ETAPA III. SÍNTESIS DEL ADN-T.

ETAPA IV. TRANSFERENCIA ADN-T.

ETAPA V. TRANSPORTE DEL ADN-T AL NÚCLEO DE LA CÉLULA HOSPEDERA E INTEGRACIÓN EN EL GENOMA.

ETAPA I. RECONOCIMIENTO Y QUIMIOTAXIS BACTERIANA.

Las plantas están expuestas a diferentes condiciones que generan estrés biótico y abiótico, lo que provoca daños a nivel celular. En respuesta, se activan mecanismos de defensa como el estallido oxidativo, seguido de la producción de compuestos fenólicos, como la acetosiringona, y azúcares entre otros (Baker *et al.*, 2020). Por otra parte, *Agrobacterium* cuenta con tres mecanismos para la detección estas moléculas: 1) la proteína ChvE, 2) el sistema de proteína VirA y la proteína VirG, y 3) el sistema de quimiotaxis de la histidina cinasa CheA (Lee *et al.*, 1996; Gao and Lynn, 2005; Subramoni *et al.*, 2014).

1. Proteína ChvE: Codificada en el genoma de *Agrobacterium*, esta proteína actúa como un sensor de azúcares (D-glucosa y D-galactosa) y del pH. Cuando ChvE es activada por alguno de estos ligandos, se une a la proteína VirA, lo que aumenta la expresión de los genes *vir*.
2. Sistema VirA/VirG: Es un sistema de dos componentes en el que la proteína VirA funciona como receptor y VirG como efector (un activador transcripcional). Este sistema detecta compuestos fenólicos, como la acetosiringona, desencadenando la activación de los genes *vir* (Huang *et al.*, 2018).
3. Sistema de quimiotaxis CheA: Este sistema, basado en la histidina cinasa CheA, permite a *Agrobacterium* migrar hacia las células vegetales en respuesta a señales químicas (Huang *et al.*, 2018).

Una vez que el proceso de reconocimiento y quimiotaxis tiene éxito, *Agrobacterium* migra y se adhiere a la célula vegetal. Este proceso es facilitado por proteínas de unión y adhesión codificadas por los genes *ChvA*, *ChvB*, *PscA* y *Att* (Banta *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; Gao and Lynn, 2005).

ETAPA II. INDUCCIÓN DEL SISTEMA DE VIRULENCIA BACTERIANO.

La proteína VirA después de reconocer a los compuestos fenólicos fosforila a la proteína VirG y esta última modula la expresión de los genes de virulencia contenidos en el regulón *vir* típicamente organizado en siete operones (*virH*, *virA*, *virB*, *virG*, *virC*, *virD*, *virE* y *virF*) y las funciones más importantes se explica en las siguientes etapas.

Por otro lado, se han descrito varios mecanismos de inhibición del sistema VirA / VirG, en los que participan algunos fitoreguladores, como el ácido indolacético (IAA), el ácido salicílico y el etileno, entre otros (Wang *et al.*, 1990; Liu and Nester, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Nonaka *et al.*, 2008).

ETAPA III. SÍNTESIS DEL ADN-T

Para iniciar la síntesis del ADN-T, el cual está delimitado por las secuencias repetidas del borde izquierdo (LB) y del borde derecho (RB), es necesario que la proteína VirD2, con actividad de endonucleasa, se una al extremo 5' del ADN-T y lo procese. De manera simultánea, la proteína VirD1 ejerce su actividad enzimática de topoisomerasa, en la cadena del plásmido Ti o Ri.

El producto final es una copia de cadena sencilla del ADN-T, que en su extremo 3' contiene los nucleótidos 4-25 del borde izquierdo (LB), y en su extremo 5' contiene los nucleótidos 1-3 del borde derecho (RB). Además, otras proteínas Vir (*VirC1* y *VirC2*) se han reportado con la capacidad de potenciar el número de copias del ADN-T (Lee y Gelvin, 2008).

ETAPA IV. TRANSFERENCIA ADN-T

El complejo VirD2-ADN-T formado en la bacteria es transportado a través de una estructura similar a un túnel que conecta a la célula bacteriana con la célula de la planta. Este sistema es conocido como sistema de secreción tipo IV (T4SS), el cual está compuesto por las proteínas VirD4; VirB11; VirB4; VirB6; VirB8; VirB3; VirB7, VirB9; VirB10; VirB2 y VirB5. De manera similar, a través de este sistema también son transportadas las proteínas VirD5, VirF, VirE3 y VirE2. Actualmente, se propone que la vía de entrada de la proteína VirE2 a la célula de la planta es por el proceso de endocitosis vía clatrina (Lacroix y Citovsky, 2019; Li y Christie, 2018).

ETAPA V. TRANSPORTE DEL ADN-T AL NÚCLEO DE LA CÉLULA HOSPEDERA E INTEGRACIÓN EN EL GENOMA.

El transporte del ADN-T del citoplasma al núcleo esta mediado por varios sistemas de la célula hospedera y proteínas del *Agrobacterium*. En la célula de la planta hay participación de varios sistemas entre los que se encuentran: el sistema de la respuesta de defensa, el citoesqueleto, entre otros. En el citoplasma de la célula vegetal, el complejo VirD2-ADN-T es recubierto por las proteínas VirE2 (VirD2 y VirE2 tienen una secuencia de localización nuclear), posteriormente es transportado por el citoesqueleto, en el cual la miosina VIII y XI tienen una importante participación (Pitzschke, 2013; Citovsky *et al.*, 1992; Tinland *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2023b).

Adicionalmente, la interacción de VirE2 y la nucleoporina CG1 facilitan la entrada al ADN-T por los poros nucleares. En el caso, de la proteína VirE3 se ha observado que se asocia con una serie de proteínas vegetales como: Csn5; Brp y JAZ8, esta última es un regulador transcripcional de la respuesta de defensa en la planta. La proteína VirD5 se puede asociar con varias proteínas como VIP1 y VIP2 y protege de la degradación a la proteína VirF, la cual contiene un dominio F-box que interactúa con varias proteínas de la planta como: las proteínas ASK del complejo de ubiquitina ligasa y las proteínas VFP3 y VFP4 del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (esta última interacción no activa el sistema UPS) (García-Rodríguez *et al.*, 2006; García-Cano *et al.*, 2015; García-Cano *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020).

Dentro del núcleo el mecanismo de integración del ADN-T en el genoma de la planta se produce por recombinación ilegítima entre regiones no homólogas o regiones homólogas muy cortas de ADN (Mayerhofer *et al.*, 1991; Magembe *et al.*, 2023; Ikeda *et al.*, 1981). Sin embargo, los detalles de muchos de los eventos moleculares dentro de la célula y el núcleo de la planta aún no están claros y se han involucrado a una serie de proteínas en la integración del ADN-T como: Ku70, Ku80, XRCC4 y la ADN polimerasa theta. Finalmente, a medida que la célula vegetal con el ADN-T integrado en el genoma, se divide y crece, la información genética transferida se hereda a las células hijas y al mismo tiempo, los genes transferidos pueden expresar características específicas, como resistencia a plagas o mejoras en las características agronómicas. Este proceso se ha aprovechado en la ingeniería genética de plantas para desarrollar variedades con características agronómicas y fisiológicas mejoradas (Friesner and Britt, 2003; Vaghchhipawala *et al.*, 2012; van Attikum *et al.*, 2001, van Kregten *et al.*, 2016; Kamoen *et al.*, 2024).

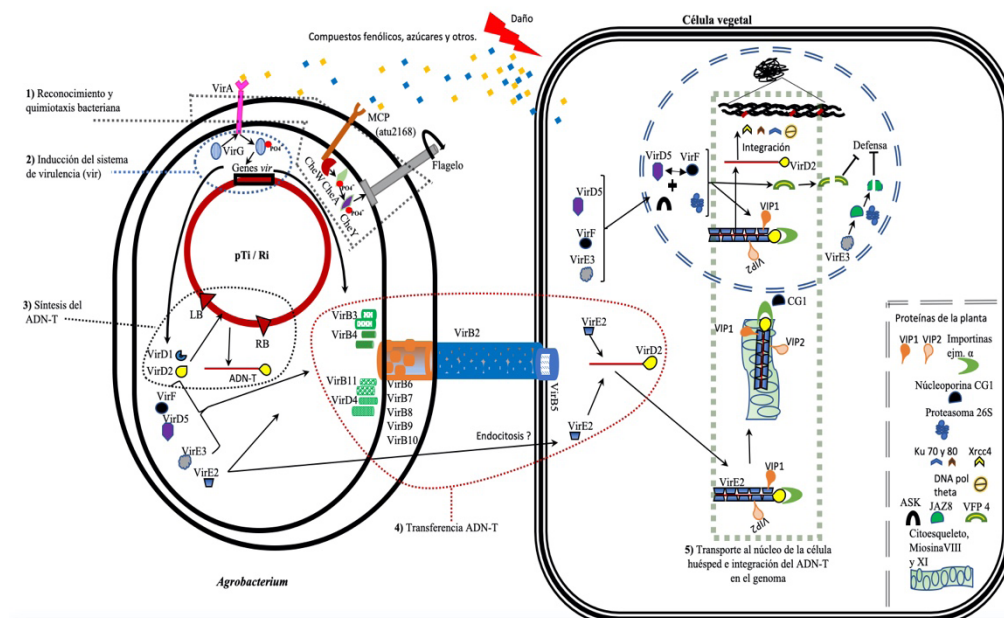


Figura 3. Modelo del proceso de transformación mediada por *Agrobacterium*. Principales etapas del modelo de la transformación entre *Agrobacterium* y célula vegetal. En (1), la célula de la planta libera una serie de compuestos (azúcares y fenoles) a la rizosfera después de un daño físico, y la bacteria reconoce y es atraída hacia la célula de la planta (quimiotaxis), (2) la inducción del sistema de virulencia bacteriano por el sistema de dos componentes VirA y VirG, (3) la síntesis del ADN-T por las proteínas VirD1 y VirD2, (4) la transferencia del ADN-T por el sistema de secreción T4SS, (5) el transporte al núcleo de la célula huésped e integración del ADN-T en el genoma, mediado por proteínas de *Agrobacterium* y de la célula de la planta.

Perspectivas en la edición del genoma de las plantas

Desde la demostración funcional en 2007 del sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), que actúa como un mecanismo de inmunidad adaptativa en procariontes contra virus (bacteriófagos), plásmidos y elementos genéticos móviles (Barrangou *et al.*, 2007; Jinek *et al.*, 2012), se han logrado importantes avances. Actualmente, el sistema CRISPR se clasifica en dos clases principales: Clase 1 y Clase 2, siendo esta última la más utilizada para la edición del genoma en eucariotas debido a su versatilidad, simplicidad y rentabilidad (Tang *et al.*, 2023) y de forma particular, el sistema CRISPR/Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (Sandhya *et al.*, 2020, Ghogare *et al.*, 2021).

El sistema CRISPR/Cas9 requiere un ARN guía único quimérico (sgRNA), compuesto por la fusión del ARN CRISPR (crRNA) y un ARN transactivador (tracrRNA). Este sgRNA guía dirige a la nucleasa Cas9 para generar un corte en la doble cadena (DSBs) del ADN genómico, específicamente tres bases río arriba de la secuencia Protospacer Adjacent Motif (PAM), generalmente representada como 'NGG' (Jinek *et al.*, 2012). Los DSBs pueden repararse mediante dos mecanismos: la unión de extremos no homólogos (NHEJ), que suele generar mutaciones del tipo inserción-delección (InDels), o la reparación dirigida por homología (HDR), que permite la incorporación precisa de secuencias de ADN mediante un molde de reparación externo (Přibylová and Fischer, 2024).

Gracias a su capacidad para manipular con precisión los genomas vegetales, CRISPR-Cas9 se ha convertido en una herramienta prometedora en la agricultura. Este sistema facilitará el desarrollo de variedades con características deseables y la domesticación de nuevas especies en un tiempo reducido. Para la aplicación efectiva de CRISPR-Cas9 en plantas es fundamental contar con métodos robustos y universales para introducir sus componentes en las células vegetales. Entre los métodos más comunes se encuentran la biobalística y la transformación mediada por *Agrobacterium*. Este último es preferido debido a su alta eficiencia, sencillez metodológica y estabilidad genética. Sin embargo, este sistema es más efectivo en dicotiledóneas que en monocotiledóneas, ya que estas últimas no son infectadas de forma natural por *Agrobacterium*. La transformación exitosa de monocotiledóneas requiere el uso de cepas hipervirulentas como AGL1, vectores binarios específicos y marcadores de selección adecuados (Hayta *et al.*, 2019; Hensel *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2019).

Innovaciones recientes en la transformación vegetal

Actualmente, se han desarrollado nuevos sistemas para mejorar la transformación genética en plantas. Un enfoque innovador es el uso de sistemas de tres vectores (ternarios), que integran enzimas clave para neutralizar los mecanismos de defensa de la planta, utilizando cepas como *A. tumefaciens* EA105 (Jeong *et al.*, 2024). Además, sistemas basados en cepas auxotróficas a timidina en cepas de *Agrobacterium* como: EHA101, EHA105, EHA105D y LBA4404, que han mejorado la eficiencia de transformación (Aliu *et al.*, 2024).

Desafíos y futuras direcciones

A pesar de los avances, la edición genética en plantas aún enfrenta desafíos, como: la necesidad de evitar mutaciones no deseadas y la optimización de la entrega de CRISPR en tejidos vegetales difíciles de transformar. La combinación de CRISPR con tecnologías emergentes, como la edición de base (base editing) y la edición de precisión (prime editing), podría ofrecer soluciones para mejorar la precisión y la eficiencia del sistema en el futuro. Además, la edición genética plantea desafíos regulatorios y éticos, especialmente en cuanto a la aceptación pública de los cultivos editados genéticamente.

CONCLUSIÓN

Las Agrobacterias han evolucionado desde su descubrimiento como una enfermedad en las plantas y posteriormente convertirse en una herramienta clave en biotecnología. Su capacidad para transferir material genético de interés ha sido fundamental en el avance del estudio de procesos celulares y en el desarrollo de plantas transgénicas con aplicaciones agronómicas. A pesar de los avances alcanzados, el proceso de transformación sigue siendo objeto de investigación y continúa perfeccionándose, lo que permite seguir ampliando su potencial y aplicaciones en la ciencia y la agricultura.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES:

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA:

Conceptualización, Marco Adán Juárez Verdayes y Javier Montalvo Arredondo.; Investigación, Marco Adán Juárez Verdayes y Erika Nohemi Rivas Martínez.; Visualización, Marco Adán Juárez Verdayes y Javier Montalvo Arredondo.; Redacción – revisión y edición, Erika Nohemi Rivas Martínez, Aida Isabel Leal Robles y Marco Adán Juárez Verdayes.

LITERATURA CITADA

- Aliu, E., Ji, Q., Wlazlo, A., Grosic, S., Azanu, M. K., Wang, K. & Lee, K. 2024. Enhancing Agrobacterium-mediated plant transformation efficiency through improved ternary vector systems and auxotrophic strains. *Frontiers in Plant Science*, 15.
- Azizi-Dargahlou, S. & Pouresmaeil, M. 2024. Agrobacterium tumefaciens-Mediated Plant Transformation: A Review. *Molecular Biotechnology*, 66, 1563-1580.
- Bagal, D., Chowdhary, A. A., Mehrotra, S., Mishra, S., Rathore, S. & Srivastava, V. 2023. Metabolic engineering in hairy roots: An outlook on production of plant secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*, 201, 107847.
- Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R. & Jha, S. 2019. A critical review on use of Agrobacterium rhizogenes and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances*, 37, 107405.
- Baker, C. J., Smith, J. & Rice, C. 2020. Apoplast redox metabolism: Effect of acetovanillone (apocynin) and acetosyringone, on their co-oxidation and redox properties. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 110, 101481.
- Banta, L. M., Joerger, R. D., Howitz, V. R., Campbell, A. M. & Binns, A. N. 1994. Glu-255 outside the predicted ChvE binding site in VirA is crucial for sugar enhancement of acetosyringone perception by Agrobacterium tumefaciens. *Journal of Bacteriology*, 176, 3242-3249.
- Bapat, V. A., Kavi Kishor, P. B., Jalaja, N., Jain, S. M. & Penna, S. 2023. Plant Cell Cultures: Biofactories for the Production of Bioactive Compounds. *Agronomy*, 13, 858.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315, 1709-1712.
- Bélanger, J. G., Copley, T. R., Hoyos-Villegas, V., Charron, J.-B. & O'donoughue, L. 2024. A comprehensive review of in planta stable transformation strategies. *Plant Methods*, 20, 79.
- Bermúdez Guzmán, M. D. J., Valadez Ramírez, P., Buenrostro Nava, M. T., Manzo Sánchez, G. & Guzmán

- González, S. 2013. Inducción in vitro de raíces de *Carica papaya* mediante *Agrobacterium rhizogenes* y ácido 3-indolbutírico. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4, 1055-1065.
- Bevan, M. W. & Chilton, M.-D. 1982. T-DNA OF THE AGROBACTERIUM TI AND RI PLASMIDS. *Annual Review of Genetics*, 16, 357-384.
- Brown, P. J. B., Chang, J. H. & Fuqua, C. 2023. *Agrobacterium tumefaciens*: a Transformative Agent for Fundamental Insights into Host-Microbe Interactions, Genome Biology, Chemical Signaling, and Cell Biology. *Journal of Bacteriology*, 205, e00005-23.
- Carareto Alves, L. M., De Souza, J. A. M., Varani, A. D. M. & Lemos, E. G. D. M. 2014. The Family Rhizobiaceae. In: ROSENBERG, E., DELONG, E. F., LORY, S., STACKEBRANDT, E. & THOMPSON, F. (eds.) *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D. & Zambryski, P. 1992. Nuclear Localization of *Agrobacterium* VirE2 Protein in Plant Cells. *Science*, 256, 1802-1805.
- Conn, H. J. 1942. Validity Of The Genus *Alcaligenes*. *Journal Of Bacteriology*, 44, 353-360.
- Conner, A. J. & Dommissse, E. M. 1992. Monocotyledonous Plants as Hosts for *Agrobacterium*. *International Journal of Plant Sciences*, 153, 550-555.
- De Lajudie, P. M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., Lassalle, F., Lindström, K., Mhamdi, R., Martínez-Romero, E., Moulin, L., Mousavi, S. A., Nesme, X., Peix, A., Puławska, J., Steenkamp, E., Stępkowski, T., Tian, C.-F., Vinuesa, P., Wei, G., Willems, A., Zilli, J. & Young, P. 2019. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 1852-1863.
- Deeba, F., Hyder, M. Z., Shah, S. H. & Naqvi, S. M. S. 2014. Multiplex PCR assay for identification of commonly used disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains. *SpringerPlus*, 3, 358.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K. & Murphy, P. J. 1998. Opines and Opine-Like Molecules Involved in Plant-Rhizobiaceae Interactions. In: SPAINK, H. P., KONDOROSI, A. & HOOYKAAS, P. J. J. (eds.) *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Escobar, M. A. & Dandekar, A. M. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8, 380-386.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P. M. & Sánchez, F. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 1385-1393.
- Fehler, A. O., Kallehauge, T. B., Geissler, A. S., González-Tortuero, E., Seemann, S. E., Gorodkin, J. & Vinther, J. 2022. Flagella disruption in *Bacillus subtilis* increases amylase production yield. *Microbial Cell Factories*, 21, 131.
- Friesner, J. & Britt, A. B. 2003. Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *The Plant Journal*, 34, 427-440.
- Fukuoka, H., Ogawa, T., Mitsuhashi, I., Iwai, T., Isuzugawa, K., Nishizawa, Y., Gotoh, Y., Nishizawa, Y., Tagiri, A., Ugaki, M., Ohshima, M., Yano, H., Murai, N., Niwa, Y., Hibi, T. & Ohashi, Y. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of monocot and dicot plants using the NCR promoter derived from soybean chlorotic mottle virus. *Plant Cell Reports*, 19, 815-820.
- Gao, C. 2021. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 184, 1621-1635.
- Gao, R. & Lynn, D. G. 2005. Environmental pH Sensing: Resolving the VirA/VirG Two-Component System Inputs for *Agrobacterium* Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 187, 2182-2189.
- García-Cano, E., Hak, H., Magori, S., Lazarowitz, S. G. & Citovsky, V. 2018. The *Agrobacterium* F-Box Protein Effector VirF Destabilizes the Arabidopsis GLABROUS1 Enhancer/Binding Protein-Like Transcription Factor VFP4, a Transcriptional Activator of Defense Response Genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31, 576-586.
- García-Cano, E., Magori, S., Sun, Q., Ding, Z., Lazarowitz, S. G. & Citovsky, V. 2015. Interaction of Arabidopsis Trihelix-Domain Transcription Factors VFP3 and VFP5 with *Agrobacterium* Virulence Protein VirF. *PLOS ONE*, 10, e0142128.

- García-Rodríguez, F. M., Schrammeijer, B. & Hooykaas, P. J. J. 2006. The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. *Nucleic Acids Research*, 34, 6496-6504.
- Gelvin, S. B. 2003. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology*, 21, 95-98.
- Gelvin, S. B. 2017. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, 51, 195-217.
- Ghogare, R., Ludwig, Y., Bueno, G. M., Slamet-Loedin, I. H. & Dhingra, A. 2021. Genome editing reagent delivery in plants. *Transgenic Research*, 30, 321-335.
- Han-Jing, Y., Meng-Ling, H., Wei-Jian, H., Dong-Mei, L. & Xiao-Fang, Y. 2016. Induction of hairy roots and plant regeneration from the medicinal plant *Pogostemon Cablin*. *Pharmacognosy Journal*, 8.
- Hayta, S., Smedley, M. A., Demir, S. U., Blundell, R., Hinchliffe, A., Atkinson, N. & Harwood, W. A. 2019. An efficient and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods*, 15, 121.
- Hensel, G., Marthe, C. & Kumlehn, J. 2017. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Wheat Using Immature Embryos. In: BHALLA, P. L. & SINGH, M. B. (eds.) *Wheat Biotechnology: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- Hohn, B., Koukolíková-Nicola, Z., Bakkeren, G. & Grimsley, N. 1989. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to monocots and dicots. *Genome*, 31, 987-993.
- Hooykaas, M. J. G. & Hooykaas, P. J. J. 2021. The genome sequence of hairy root *Rhizobium rhizogenes* strain LBA9402: Bioinformatics analysis suggests the presence of a new opine system in the agropine Ri plasmid. *MicrobiologyOpen*, 10, e1180.
- Hooykaas, P. J. J., Van Heusden, G. P. H., Niu, X., Reza Roushan, M., Soltani, J., Zhang, X. & Van Der Zaal, B. J. 2018. *Agrobacterium*-Mediated Transformation Of Yeast And Fungi. In: Gelvin, S. B. (ed.) *Agrobacterium Biology: From Basic Science to Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing.
- Ikeda, H., Moriya, K. & Matsumoto, T. 1981. In vitro study of illegitimate recombination: involvement of DNA gyrase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 45 Pt 1, 399-408.
- Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H. & Suzuki, A. 1990. Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry*, 29, 3131-3134.
- Jeong, J.-H., Jeon, E.-Y., Hwang, M. K., Song, Y. J. & Kim, J.-Y. 2024. Development of super-infective ternary vector systems for enhancing the *Agrobacterium*-mediated plant transformation and genome editing efficiency. *Horticulture Research*, 11.
- Jin, K., Tian, N., Da Silva Ferreira, J. F., Sandhu, D., Xiao, L., Gu, M., Luo, Y., Zhang, X., Liu, G., Liu, Z., Huang, J. & Liu, S. 2022. Comparative Transcriptome Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Reveals the Molecular Basis for the Recalcitrant Genetic Transformation of *Camellia sinensis* L. *Biomolecules*, 12, 688.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337, 816-821.
- Kamoen, L., Kraleman, L. E. M., Van Schendel, R., Van Tol, N., Hooykaas, P. J. J., De Pater, S. & Tijsterman, M. 2024. Genetic dissection of mutagenic repair and T-DNA capture at CRISPR-induced DNA breaks in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS Nexus*, 3.
- Kiryushkin, A. S., Ilina, E. L., Guseva, E. D., Pawlowski, K. & Demchenko, K. N. 2022. Hairy CRISPR: Genome Editing in Plants Using Hairy Root Transformation. *Plants*, 11, 51.
- Koul, B. 2022. *Cisgenics and Transgenics: Strategies for Sustainable Crop Development and Food Security*, Springer Nature.
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Dskocilova, A., Komis, G. & Samaj, J. 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33, 1024-1042.
- Kumar, R., Mamrutha, H. M., Kaur, A., Venkatesh, K., Sharma, D. & Singh, G. P. 2019. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. *Molecular Biology Reports*, 46, 1845-1853.
- Kuzmanović, N., WOLF, J., WILL, S. E., SMALLA, K., DICENZO, G. C. & NEUMANN-SCHAAL, M. 2023. Diversity

- and Evolutionary History of Ti Plasmids of “tumorigenes” Clade of *Rhizobium* spp. and Their Differentiation from Other Ti and Ri Plasmids. *Genome Biology and Evolution*, 15.
- Lacroix, B. & Citovsky, V. 2019. Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 231-251.
- Lacroix, B. & Citovsky, V. 2022. Chapter One - Genetic factors governing bacterial virulence and host plant susceptibility during *Agrobacterium* infection. *Advances in Genetics*. Academic Press.
- Lahue, C., Madden, A., Dunn, R. R. & Smukowski Heil, C. 2020. History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. *Frontiers in Genetics*, 11.
- Le Flem-Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D. & Fliniaux, M. A. 2004. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. *album*, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. *Planta*, 218, 890-893.
- Lee, L.-Y. & Gelvin, S. B. 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146, 325-332.
- Lee, Y.-W., Jin, S., Sim, W.-S. & Nester, E. W. 1996. The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the VirA protein. *Gene*, 179, 83-88.
- Li, X., Yang, Q., Peng, L., Tu, H., Lee, L.-Y., Gelvin, S. B. & Pan, S. Q. 2020. *Agrobacterium*-delivered VirE2 interacts with host nucleoporin CG1 to facilitate the nuclear import of VirE2-coated T complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, 26389-26397.
- Li, Y. G. & Christie, P. J. 2018. The *Agrobacterium* VirB/VirD4 T4SS: Mechanism and Architecture Defined Through In Vivo Mutagenesis and Chimeric Systems. In: GELVIN, S. B. (ed.) *Agrobacterium Biology: From Basic Science to Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing.
- Liu, H., Zhao, J., Chen, F., Wu, Z., Tan, J., Nguyen, N. H., Cheng, Z. & Weng, Y. 2023a. Improving *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Genetic Transformation for Gene Function Studies and Mutagenesis in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genes*, 14, 601.
- Liu, N., Lee, L.-Y., Yu, Y. & Gelvin, S. 2023b. Myosin VIII and XI isoforms interact with *Agrobacterium* VirE2 protein and help direct transport from the plasma membrane to the perinuclear region during plant transformation. *bioRxiv*.
- Liu, P. & Nester, E. W. 2006. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits *vir* gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 4658-4662.
- Lonoce, C., Salem, R., Marusic, C., Jutras, P. V., Scalon, A., Salzano, A. M., Lucretti, S., Steinkellner, H., Benvenuto, E. & Donini, M. 2016. Production of a tumour-targeting antibody with a human-compatible glycosylation profile in *N. benthamiana* hairy root cultures. *Biotechnology Journal*, 11, 1209-1220.
- Magembe, E. M., Li, H., Taheri, A., Zhou, S. & Ghislain, M. 2023. Identification of T-DNA structure and insertion site in transgenic crops using targeted capture sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 14.
- Malpighi, M., Redfern, M., Cameron, A. J. & Down, K. D. K. 2008. *De Gallis-on Galls: By Marcello Malpighi: Facsimile Together with a Translation and Interpretation*, Ray Society.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, V., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G. & Foster, G. D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 614-629.
- Matveeva, T. V. & Sokornova, S. V. 2016. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of Plants for Improvement of Yields of Secondary Metabolites. In: PAVLOV, A. & BLEY, T. (eds.) *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. Cham: Springer International Publishing.
- Mauro, M. L., Costantino, P. & Bettini, P. P. 2017. The never ending story of *rol* genes: a century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131, 201-212.
- Mayerhofer, R., Koncz Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B. & Koncz, C. 1991. T DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *The EMBO Journal*, 10, 697-704-704.
- Nilsson, O. & Olsson, O. 1997. Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 100, 463-473.
- Nonaka, S., Yuhashi, K.-I., Takada, K., Sugawara, M., Minamisawa, K. & Ezura, H. 2008. Ethylene production in plants during transformation suppresses *vir* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *New*

- Phytologist, 178, 647-656.
- Ooms, G., Burrell, M. M., Karp, A., Bevan, M. & Hille, J. 1987. Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 73, 744-750.
- Otten, L. 2021. T-DNA regions from 350 *Agrobacterium* genomes: maps and phylogeny. *Plant Molecular Biology*, 106, 239-258.
- Otten, L., Burr, T. & Szegedi, E. 2008. *Agrobacterium*: A disease-causing bacterium. In: TZFIRA, T. & CITOVS-KY, V. (eds.) *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. New York, NY: Springer New York.
- Palumbo, J. D., Phillips, D. A. & Kado, C. I. 1998. Characterization of a new *Agrobacterium tumefaciens* strain from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Archives of Microbiology*, 169, 381-386.
- Pavlov, A. & Bley, T. 2006. Betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* L. hairy root culture in a temporary immersion cultivation system. *Process Biochemistry*, 41, 848-852.
- Pérez, J. B., Remy, S., Swennen, R. & Sági, L. 2007. Banana (*Musa* sp.). In: WANG, K. (ed.) *Agrobacterium Protocols Volume 2*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Pitzschke, A. 2013. *Agrobacterium* infection and plant defense—transformation success hangs by a thread. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Přibylková, A. & FISCHER, L. 2024. How to use CRISPR/Cas9 in plants: from target site selection to DNA repair. *Journal of Experimental Botany*, 75, 5325-5343.
- Prostak, S. M., Medina, E. M., Kalinka, E. & Fritz-Laylin, L. K. 2023. A guide to *Agrobacterium*-mediated transformation of the chytrid fungus *Spizellomyces punctatus*. *Access Microbiology*.
- Qin, Y., Wang, D., Fu, J., Zhang, Z., Qin, Y., Hu, G. & Zhao, J. 2021. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation as an efficient system for gene function analysis in *Litchi chinensis*. *Plant Methods*, 17, 103.
- Riker, A., Banfield, W., Wright, W., Keitt, G. & Sagen, H. E. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees.
- Roushan, M. R., Shao, S., Poledri, I., Hooykaas, P. J. J. & Van Heusden, G. P. H. 2022. Increased *Agrobacterium* mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* after deletion of the yeast ADA2 gene. *Letters in Applied Microbiology*, 74, 228-237.
- Saifi, S. K., Passricha, N., Tuteja, R., Kharb, P. & Tuteja, N. 2020. Chapter 21 - In planta transformation: A smart way of crop improvement. In: TUTEJA, N., TUTEJA, R., PASSRICHA, N. & SAIFI, S. K. (eds.) *Advancement in Crop Improvement Techniques*. Woodhead Publishing.
- Sandhya, D., Jogam, P., Allini, V. R., Abbagani, S. & Alok, A. 2020. The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, 25.
- Slater, S. C., Goldman, B. S., Goodner, B., Setubal, J. C., Farrand, S. K., Nester, E. W., Burr, T. J., Banta, L., Dickerman, A. W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, N. F., Arnold, F., Burton, O. T., Du, Z., Ewing, A., Godsy, E., Heisel, S., Houmiel, K. L., Jhaveri, J., Lu, J., Miller, N. M., Norton, S., Chen, Q., Phoolcharoen, W., Ohlin, V., Ondrusek, D., Pride, N., Stricklin, S. L., Sun, J., Wheeler, C., Wilson, L., Zhu, H. & Wood, D. W. 2009. Genome Sequences of Three *Agrobacterium* Biovars Help Elucidate the Evolution of Multichromosome Genomes in Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 191, 2501-2511.
- Smith, E. F. & Townsend, C. O. 1907. A Plant-Tumor Of Bacterial Origin. *Science*, 25, 671-673.
- Song, G.-Q. & Sink, K. C. 2006. Transformation of Montmorency sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and Gisela 6 (*P. cerasus* × *P. canescens*) cherry rootstock mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 25, 117-123.
- Srivastava, S. & Srivastava, A. K. 2012. In Vitro Azadirachtin Production by Hairy Root Cultivation of *Azadirachta indica* in Nutrient Mist Bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 365-378.
- Stapp, C. & Knösel, D. 1954. Zur genetik sternbildender Bakterien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt*, 2, 243-259.
- Stieger, P. A., Meyer, A. D., Kathmann, P., Fründt, C., Niederhauser, I., Barone, M. & Kuhlemeier, C. 2004. The orf13 T-DNA Gene of *Agrobacterium rhizogenes* Confers Meristematic Competence to Differentiated Cells. *Plant Physiology*, 135, 1798-1808.

- Su, W., Xu, M., Radani, Y. & Yang, L. 2023. Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 10646.
- Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E. & Yuan, Z.-C. 2014. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Tang, Y., Zhang, Z., Yang, Z. & Wu, J. 2023. CRISPR/Cas9 and *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins synergistically increase efficiency of precise genome editing via homology directed repair in plants. *Journal of Experimental Botany*, 74, 3518-3530.
- Tinland, B., Koukolíková-Nicola, Z., Hall, M. N. & Hohn, B. 1992. The T-DNA-linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 7442-7446.
- Triplett, B. A., Moss, S. C., Bland, J. M. & Dowd, M. K. 2008. Induction of hairy root cultures from *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44, 508-517.
- Vaghchhipawala, Z. E., Vasudevan, B., Lee, S., Morsy, M. R. & Mysore, K. S. 2012. *Agrobacterium* May Delay Plant Nonhomologous End-Joining DNA Repair via XRCC4 to Favor T-DNA Integration. *The Plant Cell*, 24, 4110-4123.
- Van Attikum, H., Bundock, P. & Hooykaas, P. J. J. 2001. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *The EMBO Journal*, 20, 6550-6558.
- Van Eck, J., Keen, P. & Tjahjadi, M. 2019. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Tomato. In: KUMAR, S., BARONE, P. & SMITH, M. (eds.) *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- Van Kregten, M., De Pater, S., Romeijn, R., Van Schendel, R., Hooykaas, P. J. J. & Tijsterman, M. 2016. T-DNA integration in plants results from polymerase- θ -mediated DNA repair. *Nature Plants*, 2, 16164.
- Van Montagu, M. & Zambryski, P. 2017. *Agrobacterium* and Ti Plasmids . Reference Module in Life Sciences. Elsevier.
- Veremeichik, G. N., Bulgakov, D. V., Solomatina, T. O. & Makhazen, D. S. 2023. In the interkingdom horizontal gene transfer, the small *rolA* gene is a big mystery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107, 2097-2109.
- Wang, K., Herrera-Estrella, A. & Montagu, M. V. 1990. Overexpression of *virD1* and *virD2* genes in *Agrobacterium tumefaciens* enhances T-complex formation and plant transformation. *Journal of Bacteriology*, 172, 4432-4440.
- Weisberg, A. J., Davis, E. W., Tabima, J., Belcher, M. S., Miller, M., Kuo, C.-H., Loper, J. E., Grünwald, N. J., Putnam, M. L. & Chang, J. H. 2020. Unexpected conservation and global transmission of agrobacterial virulence plasmids. *Science*, 368, eaba5256.
- Weisberg, A. J., Miller, M., Ream, W., Grünwald, N. J. & Chang, J. H. 2021. Diversification of plasmids in a genus of pathogenic and nitrogen-fixing bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 377, 20200466.
- Xu, Y., Liu, F., Han, G., Wang, W., Zhu, S. & Li, X. 2018. Improvement of *Lotus japonicus* hairy root induction and development of a mycorrhizal symbiosis system. *Applications in Plant Sciences*, 6, e1141.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 89-103.
- Yuan, Z.-C., Edlind, M. P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L. M., Wise, A. A., Ronzone, E., Binns, A. N., Kerr, K. & Nester, E. W. 2007. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 11790-11795.

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. *The EMBO Journal*, 2, 2143-2150.

Zhang, Y., Chen, M., Siemiatkowska, B., Toleco, M. R., Jing, Y., Strotmann, V., Zhang, J., Stahl, Y. & Fernie, A. R. 2020. A Highly Efficient Agrobacterium-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species. *Plant Communications*, 1, 100028.