

24/184



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**“Regulación hormonal en tejidos transformados con
cepas mutantes de Agrobacterium tumefaciens”**

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

ALEJANDRA VAZQUEZ RAMOS

MEXICO, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

Introducción

<i>Agrobacterium tumefaciens</i> y el tumor de agalla	2
Tipos de tumores de agalla	4
El papel de los plásmidos Ti en la formación de la agalla	7
El ADN-T	8
Consideraciones generales acerca de auxinas y citocininas .	9
Efecto fisiológico de las auxinas y las citocinas sobre tejidos en cultivo	16

Materiales y métodos

1. Cepas bacterianas	18
2. Inducción de tumores <i>in vitro</i> a partir de explantes . .	19
3. Inicio de callos a partir de explantes	20
4. Inicio de células en suspensión.	20
5. Curva de crecimiento de células en suspensión.	21
6. Método para medir LpDH en tejidos tumorales de agalla (Otten y Schilperoort, 1978)	21
7. Medición de la producción de etileno por cromatografía de gases	23
8. Actividad de la AIA-oxidasa (Gordon y Weber, 1951) . .	23
9. Síntesis de AIA a partir de triptofano en <i>A. tumefaciens</i> (Liu y Kado, 1979)	24

Resultados y discusión	27
Conclusiones	40
Apéndices	
I. Medio MS basal utilizado para el cultivo de <i>B. ternifolia</i> y <i>N. tabacum</i> (Murashige y Skoog, 1962).	41
II. Reactivo de Salkowsky	43
III. Líquido de Bray para centelleo.	43
Bibliografía	44

INTRODUCCION

Los primeros éxitos en el cultivo de células vegetales, por períodos de tiempo prolongados, se lograron a finales de la década de 1930 por Gautheret (1939), Nobécourt (1939) y White (1939). En la actualidad se han hecho considerables progresos en este campo. El descubrimiento de los reguladores del crecimiento vegetal: las auxinas y las citocininas, las cuales son esenciales para el crecimiento y división celular, permiten el uso de medios de cultivo sintéticos bien caracterizados.

Los explantes de tejidos de una gran variedad de plantas superiores pueden ponerse en cultivo en medios compuestos básicamente de sustancias orgánicas y sales inorgánicas, complementados con las fitohormonas adecuadas, y obtener de ellos una masa de células desdiferenciadas, relativamente homogénea, llamada callo.

La diferenciación y morfogénesis está bajo control hormonal y pueden ser inducidos en cultivos de callo, cambiando la proporción de las concentraciones de auxinas y citocininas aplicadas exógenamente. De este modo, es posible lograr la formación de tallos y raíces y, eventualmente, regenerar una planta completa a partir del callo en cultivo.

La totipotencialidad de las células vegetales superiores se demostró claramente, por la regeneración de plantas de tabaco adultas a partir de una sola célula obtenida de un cultivo de células en suspensión (Vasil y Hildebrandt, 1965). A este respecto, las células vegetales *in vitro* ofrecen una vía de acceso experimental única, para el estudio del mecanismo de la diferenciación celular y la morfogénesis que, hasta ahora, no es posible con células animales en cultivo. Más aún, la regeneración de plantas completas ha tenido importantes aplicaciones en la propagación vegetativa en horticultura y agricultura.

En las plantas, el desarrollo de tumores no es un evento raro, ocurre con cierta frecuencia. Uno de ellos es el llamado agalla (crown gall), enfermedad neoplásica que se caracteriza por una proliferación celular ilimitada. Los tumores de agalla pueden ser cultivados en medios totalmente carentes de hormonas, lo cual nos ofrece un sistema natural para el estudio de la relación que existe entre la regulación hormonal y la morfología.

Agrobacterium tumefaciens Y EL TUMOR DE AGALLA

En 1907, Smith y Townsend mostraron que el agente responsable de la agalla, es una bacteria que en ese entonces se denominaba *Bacterium tumefaciens*, y que en la actualidad se conoce con el nombre de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Town) Conn.

Esta bacteria, un miembro de la familia Rhizobiaceae, es un anaerobio facultativo gram negativo comúnmente presente en el suelo. - Lippincott y Lippincott (1975) hacen una revisión de la taxonomía y descripción general de *A. tumefaciens* y de especies relacionadas con ésta.

El tumor se presenta en un gran número de especies y familias, en su mayor parte dicotiledóneas; las monocotiledóneas no parecen ser susceptibles (De Cleene y De Ley, 1976). En la naturaleza, las agallas se producen comúnmente cerca del nivel del suelo, en la corona, en donde llegan a presentarse lesiones con cierta frecuencia, ya que la enfermedad se da únicamente cuando las cepas virulentas de *A. tumefaciens* infectan sitios dañados de la planta.

Aunque la presencia de células bacterianas viables en el tejido dañado es esencial para la inducción del tumor, la bacteria se ha observado únicamente en los espacios intercelulares y dentro de la células dañadas. Lo anterior llevó a que Braun, en 1947, propusiera que la bacteria libera un principio de inducción tumoral (PIT), el cual convierte a las células normales en tumorales.

El requerimiento absoluto de la lesión, para la formación del tumor en todas las plantas, debe explicarse porque ésta deja expuestos sitios que favorecen la infección bacteriana al exponer receptores en las células vegetales de la superficie. Es sabido que un elemento polisacárido de la membrana externa bacteriana se adsorbe a la pared de la célula vegetal (Lippincott y Lippincott, 1969). Una explicación alternativa postula que sólo las células vegetales condicionadas en la región de la lesión son susceptibles a la transformación, pues son células que han sido estimuladas a dividirse como respuesta al daño sufrido, pero la infección se completa antes de que la división celular tenga lugar (Braun, 1952).

Todos los órganos vegetales son susceptibles a la formación del tumor, excepto el tejido meristemático del tallo y de la punta de la raíz. Esto puede deberse a que *A. tumefaciens* probablemente necesita una célula blanco, la cual se deriva de una célula diferenciada que es sometida a desdiferenciación como respuesta a la lesión (Schilperoort, 1981).

La transformación ocurre poco tiempo después de la infección. Los estudios con *Kalanchoe daigremontiana* muestran que a 25°C la inducción se completa en 20 hr (Lipetz, 1966) después de esto, la presencia de la bacteria viva ya no es necesaria para mantener el estado tumoral (Beardsley, 1972; Braun y White, 1943; White y Braun, 1942).

También se ha visto que las células tumorales libres de bacteria, pueden aislarse y cultivarse por tiempo ilimitado en un medio químicamente definido, que no contenga las fitohormonas necesarias para el crecimiento de las células normales en cultivo (Braun, 1958). Así mismo, cuando se injertan células de agalla cultivadas en un hospedero adecuado, proliferan como tumor (Braun, 1953) y en algunos casos, pasan los caracteres tumorales a las células que las hospedan (Meins, 1973).

El hecho de que la transformación de células normales en tumorales,

incluya cambios que se perpetúan en generaciones celulares subsecuentes, aún en la ausencia de la bacteria, sugirió que podían estar involucrados los ácidos nucleicos, y en particular el ADN. De acuerdo con esto, las tres hipótesis relativas a la naturaleza del PIT que involucra la transferencia de información genética de *A. tumefaciens* a las células huésped, postulaban que este podía ser: (1) una fracción del genoma bacteriano; (2) un bacteriófago, y; (3) un plásmido. Drlica y Kado (1975) hacen una extensa revisión de la evidencia experimental en relación a éstas hipótesis.

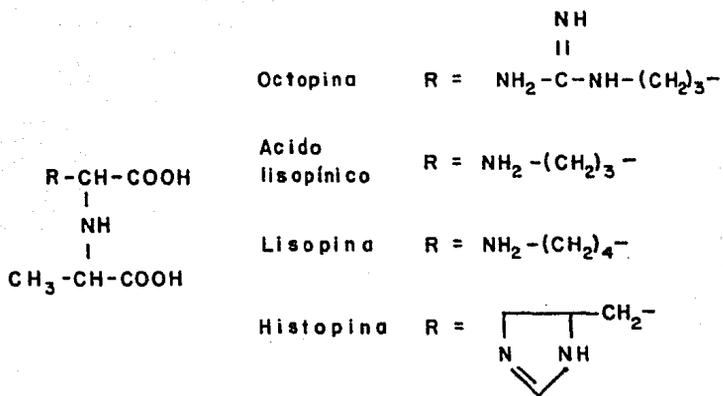
TIPOS DE TUMORES DE AGALLA

Existen varios tipos de tumores que son determinados por el carácter de la bacteria inductora. Estos pueden distinguirse por una nueva propiedad adquirida por las células de la agalla: la capacidad de sintetizar uno de dos compuestos poco frecuentes llamados opinas, los cuales no se presentan en células vegetales sanas, y de hecho, en ningún otro tipo de célula vegetal (Bomhoff, et al, 1976; Petit, et al, 1970).

Opinas es el nombre general que se da a un grupo de derivados de aminoácidos, los cuales pueden dividirse estructuralmente por lo menos en dos clases: la clase de las octopinas y la clase de las nopalinas (fig. 1). Los compuestos de la clase de las octopinas, son productos reducidos de la condensación del ácido pirúvico con cualquier aminoácido. De la condensación de arginina y piruvato surge la octopina, el más común de estos compuestos, que existe también en algunos tejidos animales y recibe su nombre porque fué primeramente detectado en el pulpo (*Octopus*). Las opinas de tipo nopalina, son productos reducidos de la condensación de α -cetoglutarato con un aminoácido. El más común de estos compuestos es la nopalina, que es también un derivado de la arginina, y recibe su nombre por haber sido detectado primero en tumores de nopal (*Opuntia vulgaris*).

Los tumores contienen compuestos de cualquiera de éstas dos clases; por lo que se dividen en tumores tipo octopina, tumores tipo nopalina y tumores tipo nulo, que no sintetizan ninguna clase de opina.

a) CLASE DE LAS OCTOPINAS



b) CLASE DE LAS NOPALINAS

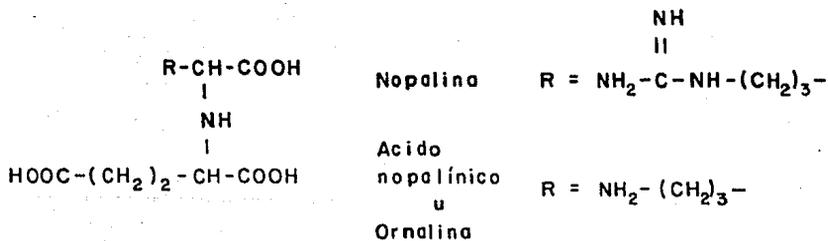


FIG. 1: Fórmula estructural de las opinas sintetizadas por los fumores de agalla.

La síntesis de las octopinas es catalizada por una enzima denominada lisopina deshidrogenasa (LpDH), enzima monomérica con un peso molecular aproximado de 38,000 daltones, que acepta 19 aminoácidos y 5 α - cetoácidos diferentes como sustratos y emplea preferencialmente - NADP(H) como cofactor. Debido a la inespecificidad de la enzima, los tumores de tipo octopina pueden contener además de octopina, lisopina, ácido lisopínico e histopina, las cuales derivan de la L-arginina, L-lisina y L-histidina respectivamente (fig. 1, a).

En los tumores de tipo nopalina, sólo se han detectado la nopalina y el ácido nopalínico u ornalina, los cuales derivan de la L-arginina y L-ornitina respectivamente (fig. 1, b). Ambos compuestos son sintetizados por la nopalina deshidrogenasa (NpDH), enzima constituida por 2 a 4 subunidades de 42,000 daltones cada una. También utiliza preferencialmente NADP(H) como cofactor.

Algunos de los tumores tipo octopina, y otros de tipo nopalina, poseen cantidades importantes de un tercer tipo de compuesto; Agropina (Firmin, et al, 1978), el cual parece ser un ácido polihidroxílico. No se sabe aún que enzima es la responsable de la producción de este compuesto, que parece no estar relacionado con las opinas.

La bacteria inductora transfiere la información genética necesaria para la síntesis de octopina o agropina en el tumor. Esto es interesante desde el punto de vista ecológico, ya que las cepas de *A. tumefaciens* que inducen tumores tipo octopina, son capaces de utilizar estos compuestos como única fuente de carbono y/o nitrógeno, pero no pueden catabolizar nopalina u ornalina. A causa de esta especificidad, se les denomina cepas tipo octopina. En analogía, las cepas de tipo nopalina son aquellas que catabolizan compuestos de la clase nopalina, pero no de la clase octopina.

La morfología del tumor depende tanto de la bacteria inductora, como de la planta hospedera, y ha sido más estudiada en *Kalanchoe daigremontiana*. Los tumores de tipo octopina tienen una superficie rugosa y están cubiertos por raíces adventicias, mientras que los tumores -

de tipo nopalina tienen una superficie lisa y sólo dan lugar a raíces - firmes en la base del tumor y en algunas ocasiones forman teratomas, - que son estructuras aberrantes semejantes a hojas. Los tumores de tipo nulo también tienen una superficie rugosa, pero muy pocas raíces en la base del tumor.

EL PAPEL DE LOS PLASMIDOS Ti EN LA FORMACION DE LA AGALLA

La idea de que la información genética para el PIT en las cepas de *A. tumefaciens* inductoras de tumor podría estar contenida en un plásmido, se basa parcialmente en la observación de que la virulencia podía perderse o adquirirse espontáneamente con una frecuencia elevada. En 1974, el grupo de Schell y Van Montagu (Zaenen, et al, 1974), realizó un estudio sistemático de la presencia de plásmidos en la bacteria, el cual reveló que las cepas virulentas contienen ADN circular superenrollado de gran tamaño, de 90 a 160 Mdaltones, mientras que las cepas - avirulentas carecen de él. El mismo año, el grupo de Schell y Schilperoort (Van Lerebeke, et al, 1974) encontró que la pérdida de un tipo de plásmido va acompañada de la pérdida de la virulencia. Los estudios - posteriores, revelaron que la introducción del plásmido en cepas no oncogénicas receptoras, por transformación ó conjugación, les confiere la capacidad de inducir tumores (Van Lerebeke, et al, 1975; Watson, et al, 1975). Estos experimentos de genética establecieron firmemente que un plásmido particular de *A. tumefaciens*, es esencial para manifestar - su capacidad oncogenética, por lo que se le denominó, plásmido inductor de tumor (Ti).

En 1977, Chilton y sus colaboradores, utilizando la técnica de hibridación de ADN, obtuvieron evidencia directa de que el plásmido es el PIT propuesto anteriormente por Braun (1947). Aislaron ADN de células normales y tumorales y lo hibridaron con diferentes fragmentos de restricción del plásmido, encontrando que las células tumorales adquieren un pequeño fragmento de ADN del plásmido como consecuencia del proceso de transformación, por lo que se denomina a éste ADN-T (tumoral).

Los estudios posteriores han mostrado que el ADN-T está unido covalentemente al ADN cromosómico, y que está presente en varias copias por genoma (Thomashow, et al, 1980; Yadav, et al, 1980) y que por lo menos, una parte de él es transcrito (Willmitzer, et al, 1981).

Para comprender la relación que existe entre diferentes plásmidos Ti, se han hecho estudios de homología de ADN (Currier y Nester, 1976; Drummond y Chilton, 1978). En estos se ha visto que todos los plásmidos Ti tipo octopina, son casi iguales, mientras que los de tipo nopalina, muestran mucha variación. La homología entre los plásmidos Ti de tipo octopina, nopalina y nulo está restringida a algunas regiones separadas entre sí por grandes segmentos de ADN no homólogo. Los tres tipos de plásmidos, tienen en común una región de ADN que no muestra variación - de aproximadamente 5.5×10^6 daltones, secuencia común, la cual también forma parte del ADN-T en varios tejidos tumorales de tipo octopina y nopalina (Chilton, et al, 1978; De Picker, et al, 1978).

EL ADN-T

Como ya se mencionó, una parte del plásmido Ti se ha detectado en ADN aislado de tejidos tumorales. En todos los casos estudiados, esta parte viene de la misma región del plásmido, por lo que se piensa, que algunos genes en esta región común, son esenciales para la oncogenicidad.

Así mismo, se ha visto que varias partes del ADN-T, incluyendo la secuencia común, se transcriben en ARN de células tumorales de tipo octopina (Drummond, et al, 1977; Gurley, et al, 1979). Una porción de estas moléculas de ARN, está unida a un segmento de ácido poliadenílico (poli A), en su extremo 3', lo cual es característico de los ARN mensajeros de eucariotes. Lo anterior significa que la transcripción del ADN-T, está sujeta al sistema de control del eucariote.

Para establecer la posición y el número de genes en el ADN-T responsables de la integración, la prototrofia hormonal, la influencia en

la capacidad regenerativa de las células, así como la síntesis de lisopina y nopalina deshidrogenasa, se han aislado un gran número de mutantes tanto de inserción como de delección.

El grupo de Schilperoort (Koekman, et al, 1979), realizó estudios con diferentes plásmidos Ti mutados. En particular, para el plásmido Ti tipo octopina de la cepa LBA4001, encontraron que las delecciones que eliminan la región ADN-T completa, incluyendo la secuencia común, dan como resultado una bacteria avirulenta. No obstante, cuando la delección cae dentro del ADN-T, pero deja toda o la mayor parte de la secuencia común, las mutantes aún son capaces de inducir tumores. Concluyendo que el lado derecho del plásmido Ti de octopina, que contiene parte del ADN-T, no es esencial para la inducción del tumor. El mismo grupo, ha estudiado mutantes de inserción que mapean en la secuencia común del ADN-T y que presentan un fenotipo alterado (Klapwijk, et al, 1980; Ooms, et al, 1980; Ooms, et al, 1981). Algunas de ellas, dan lugar a tumores con una excesiva formación de raíces mientras que otras, por el contrario, producen hojas en la parte superior del tumor.

Los resultados con estas mutantes, llevaron a Shilperoort a proponer que por lo menos, dos tipos de genes están presentes en la secuencia común y que estos pueden ser afectados independientemente: uno responsable de un síntoma tipo auxina y el otro, de un síntoma tipo citocinina (fig. 2). Esto hace probable que genes en el ADN-T dentro de la secuencia común, sean los responsables del crecimiento de las células de agalla en medios carentes de hormonas.

CONSIDERACIONES GENERALES ACERCA DE AUXINAS Y CITOCININAS

La mayoría de las funciones de la planta y el curso de su desarrollo y diferenciación celular, están controlados por fitohormonas. Una hormona vegetal puede definirse como una sustancia orgánica activa en cantidades minúsculas, que se forma en ciertas partes de la planta y, generalmente, es transportada a otros sitios, donde evoca una respues-

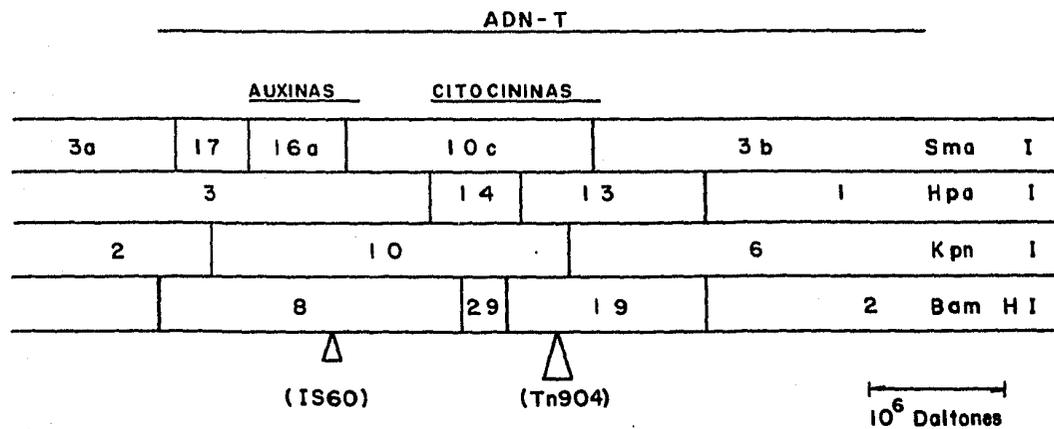
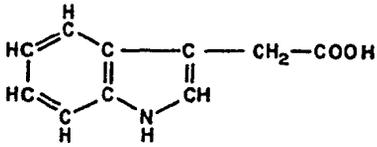


FIG. 2 Sección del mapa de un plásmido Ti tipo octopina.

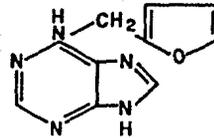
ta bioquímica, fisiológica y/o morfológica. Se conocen cinco grupos de fitohormonas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e inhibidores relacionados y etileno (fig. 3). De todas ellas, las auxinas y las citocininas, son las de mayor importancia en cultivo de tejidos, - aunque estos son también afectados por otros reguladores del crecimiento (Cassab, 1981; Cassab, et al, 1983).

El primer tipo de hormona vegetal descubierto fue el de las auxinas. El término auxina viene del griego "auxein" que significa crecer, y fué propuesto originalmente por Kögl y Haagen - Smit en 1931 para - designar una sustancia particular que tenía la propiedad de promover la curvatura en el coleoptilo de *Avena* y que fue posteriormente identificado como ácido indolacético (AIA, fig. 3, a). En 1969, Thimann definió a las auxinas como "las sustancias orgánicas que a baja concentración promueven el crecimiento, por elongación celular, a lo largo del eje longitudinal, cuando se aplican a tallos de plantas prácticamente libres de - su propia sustancia promotora del crecimiento, e inhiben la elongación de raíces". El ácido indolacético es la única auxina natural que se conoce.

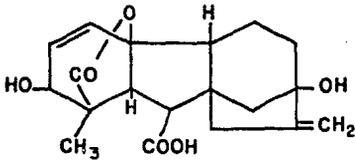
Para que un compuesto cumpla el papel de hormona, su propia concentración debe estar rígidamente controlada. El control de la concentración de auxina en los diferentes lugares de la planta es complejo, e involucra procesos múltiples. Una forma de regular los niveles de auxina es controlando la biosíntesis *in situ*. El aminoácido triptofano es el precursor para la biosíntesis de AIA en las plantas, y existen dos sendas biosintéticas que se ilustran en la figura 4. Una observación interesante que ha sido reportada varias veces es que el D-triptofano es - frecuentemente tan, o aún más, activo que el L-triptofano como precursor auxínico. En 1971, Miura y Mills, utilizando un sistema de cultivo de células de tabaco, demostraron la presencia en el tejido de una racemasa de triptofano que convierte el D-Trp en L-Trp en una reacción - reversible. Es posible que la conversión de L-Trp a D-Trp pueda ser importante en el control de los niveles de AIA y Trp.



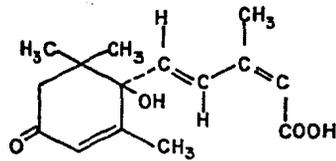
(a) Acido indolacética



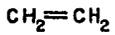
(b) Cinetina.



(c) GA₃



(d) ABA



(e) Etileno

FIG. 3. Fórmula estructural de los diferentes tipos de hormonas vegetales. (a) auxina ; (b) cinetina ; (c) giberelina ; (d) ácido abscísico (ABA); y (e) etileno.

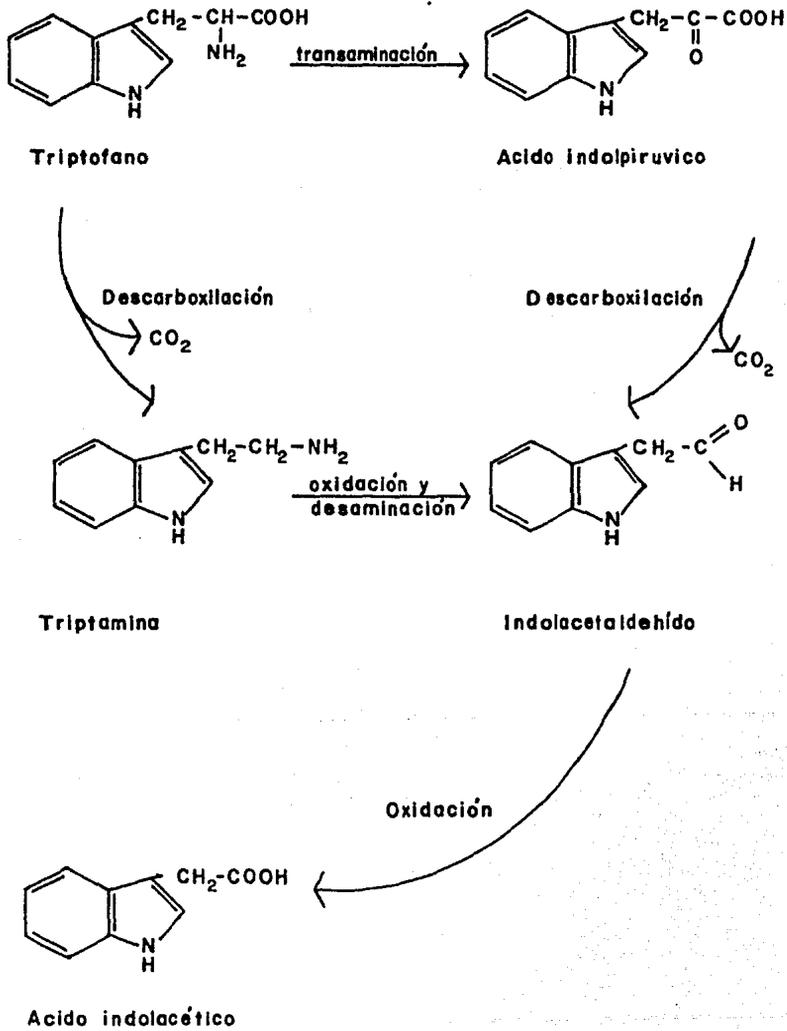
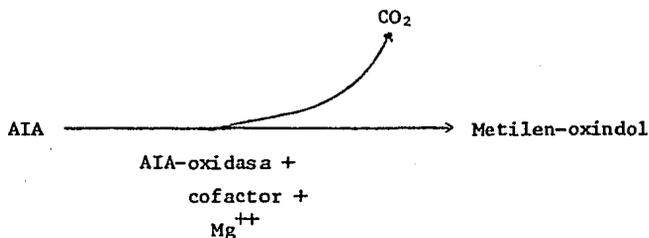


FIG. 4. Sendas de biosíntesis de auxina.

El AIA existe en una variedad de estados químicos en los tejidos vegetales. Auxina libre se considera como aquella que es fácilmente extraíble mientras que, tradicionalmente, se considera auxina unida ó conjugada a la que es liberada de los tejidos cuando estos son sujetos a enzimólisis, hidrólisis o autólisis. La auxina unida puede existir en varias formas; glucosilada, etc, que varían entre las diferentes especies. Las auxinas unidas se consideran como formas de almacenamiento, a partir de las cuales, el AIA puede ser liberado, o como productor de detoxificación que se forman en la presencia de altos niveles de AIA.

Como se mencionó, el nivel de auxina libre en el tejido debe estar rígidamente controlado. Un tercer proceso por el cual los niveles de auxina son regulados, junto con la síntesis regulada y la formación reversible e irreversible de conjugados, es la degradación a compuestos inactivos. La destrucción de auxinas se lleva a cabo por medio de dos procesos oxidativos básicos: (1) reacción enzimática; y (2) fotooxidación. El proceso oxidativo más importante fisiológicamente es la destrucción enzimática, catalizada por una enzima conocida como AIA-oxidasa. La reacción consiste en la descarboxilación del AIA:



El sistema enzimático de las plantas superiores requieren de Mg⁺⁺. Ciertos compuestos fenólicos influyen en el nivel de AIA a través de un efecto sobre la actividad de la AIA-oxidasa (Schneider y Wightman, - 1974). Los monofenoles son cofactores de la enzima, mientras que los difenoles son inhibidores de la misma. El esquema de la figura 5 muestra como el nivel de la hormona presente en un tejido, depende de la

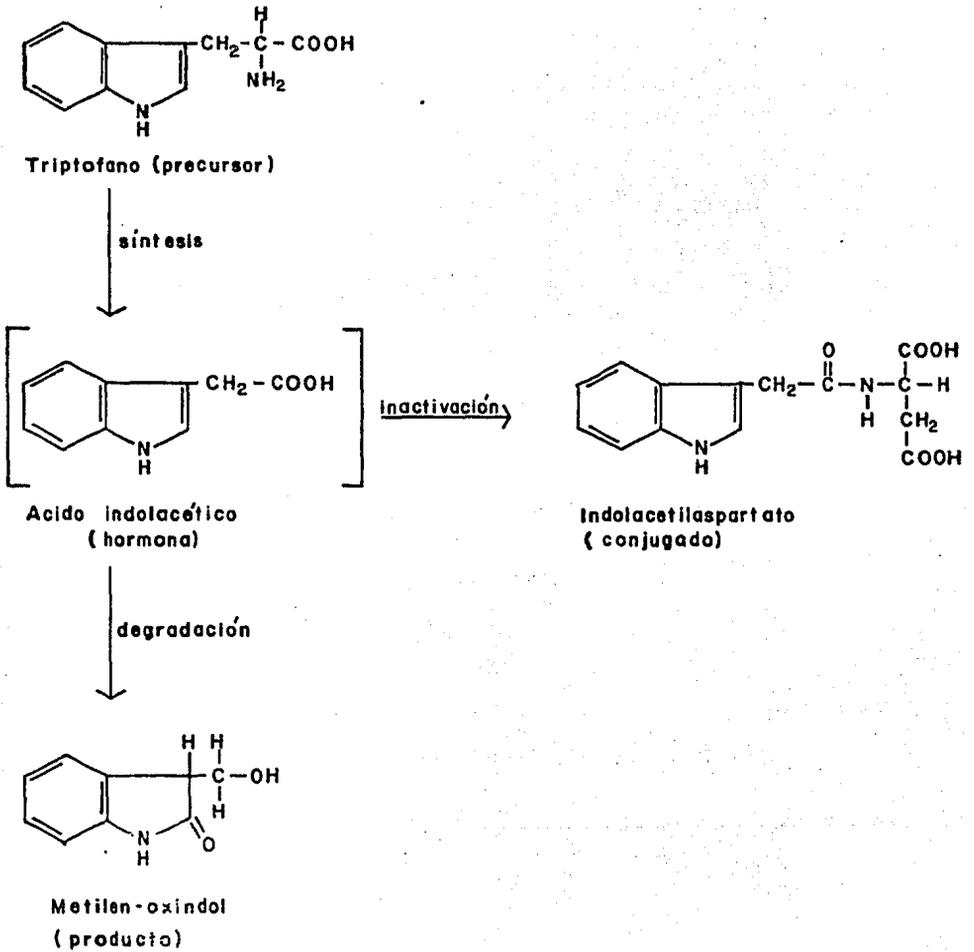


FIG. 5. Esquema que muestra como el nivel de hormona presente en un tejido depende de la velocidad de síntesis, degradación e inactivación, ejemplificando con una auxina.

velocidad de síntesis, degradación e inactivación.

El descubrimiento de las citocininas ocurrido en 1955 cuando Miller, Skoog, Okimura, Von Saltz y Strong aislaron una substancia llamada cinetina (6-furfurilaminopurina, fig. 3, b) de una muestra de ADN de espermatozoos de arenque sujeta a alta temperatura y gran presión, y demostraron que es capaz de promover activamente la mitosis y la división celular en callos de tabaco *in vitro*. Skoog y sus colaboradores propusieron que el término de citocinina debía usarse para designar todos aquellos compuestos que promueven la división celular.

La comprensión y la bioquímica de la producción de citocininas es sumamente incompleta, y la información disponible es muy complicada. Esta complejidad deriva, principalmente, del hecho de que las citocininas se encuentran no sólo como bases libres y como ribonucleosidos y ribonucleotidos, sino que también se encuentran como constituyentes de especies moleculares de ARN de transferencia (ARNt) particulares. La mayoría de las investigaciones sobre la biogénesis de las citocininas, se basan en lo concerniente al mecanismo por el cual las citocininas están presentes en fracciones particulares de ARNt.

EFEECTO FISIOLÓGICO DE LAS AUXINAS Y LAS CITOCININAS

SOBRE TEJIDOS EN CULTIVO

Dos tipos de fitohormonas, las auxinas y las citocininas, son los principales reguladores del crecimiento en las plantas superiores.

En 1957, Skoog y Miller, mostraron que variando la concentración de auxinas y citocininas en el medio de cultivo de callos de tabaco (*Nicotiana tabacum*), podían lograr una de tres cosas: el crecimiento de una masa amorfa no diferenciada ó callo; la formación de raíces; o bien, - la formación de tallos. Este fenómeno, inicialmente observado en tabaco, se ha visto que ocurre en células de un gran número de especies vegetales. Este tema ha sido revisado recientemente (Cassab, et, al, 1983). Así, la organogénesis de las células vegetales en cultivo se

logra cuando se les presenta un balance auxina/citocinina adecuado.

Como resultado de la transformación por *A. tumefaciens* las células tumorales adquieren la propiedad, heredable, de crecer en un medio de cultivo básico sin la adición de auxinas y citocininas. El tejido tumoral contiene concentraciones endógenas de auxinas y citocininas más elevadas que las de los tejidos normales (Braun, 1978; Einset, 1980; Henderson, et al, 1952; Link y Eygers, 1941; Scott, et al, 1980) y se supone que esta es la razón para el crecimiento autónomo de estas células.

La diferente morfología y capacidad de desarrollo entre los tumores de tipo liso y rugoso en tallos de *Kalanchoë*, así como el fenotipo tumoral alterado, causado por las mutaciones en el ADN-T, pueden ser atribuidas a una diferencia en la actividad endógena de las auxinas y citocininas. Un estudio hecho recientemente, muestra como los niveles endógenos de auxinas y citocininas en varias líneas tumorales, varía considerablemente y que esta variación parece ser la responsable de las diferentes morfologías tumorales (Amasino y Miller, 1982).

Los tumores inducidos por la cepa mutante LBA4210, muestran una abundante formación de raíces, lo cual sugiere que tienen altos niveles endógenos de auxinas. En cambio, los tumores inducidos por la cepa mutante LBA4060, muestran una formación de tallos, sugiriendo que contienen un bajo nivel de auxinas y un nivel relativamente alto de citocininas. Mientras que los tumores inducidos por la cepa silvestre LBA4001 no muestran diferenciación de ningún tipo.

El objetivo del presente trabajo es investigar los niveles de etileno y auxina presentes en tejidos de agalla de *Bouvardia ternifolia* y *Nicotiana tabacum* inducidos por las cepas de *A. tumefaciens* arriba mencionadas, y correlacionar estos con la morfología de dichos tumores.

MATERIALES Y METODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *A. tumefaciens* empleadas en este trabajo fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Schilperoort en Leiden, Holanda. Todas de tipo octopina: la silvestre LBA4001 (pTiAch5), y dos mutantes; LBA4060 (pAL108) y LBA4210 (pAL228).

Las cepas se mantienen en glicerol (1 ml de glicerol: 1 ml de suspensión bacteriana en fase logarítmica tardía) a 4°C. Así mismo, se tienen colonias plateadas en cajas de Petri que contienen medio mínimo+octopina el cual tiene la siguiente composición:

COMPUESTO		CONCENTRACION mg/l
Fosfato de potasio dibásico	(K_2HPO_4)	10250.0
Fosfato de potasio monobásico	(KH_2PO_4)	7250.0
Cloruro de sodio	(NaCl)	150.0
Sulfato de magnesio	($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	500.0
Cloruro de calcio	($CaCl_2 \cdot 2 H_2O$)	10.0
Sulfato de fierro	($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$)	2.5
Glucosa		5000.0
Octopina		80.0
Agar (lavado)		0.9 %

Para la inducción del tumor, se tiene que hacer un precultivo, - para lo cual, se toma una colonia, de una caja de Petri con medio mínimo+octopina, y se coloca en un matraz de 25 ml que contenga 5 ml de medio YEB, el cual tiene la siguiente composición :

COMPUESTO	CONCENTRACION g/l
Extracto de levadura	1.0
Extracto de carne	5.0
Peptona	5.0
Sacarosa	5.0
Sol. 0.1 M. de Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	2.0 ml/l

El matraz se coloca en una plataforma de agitación a temperatura ambiente y se deja ahí por espacio de 16 hr.

2. INDUCCION DE TUMORES *in vitro* A PARTIR DE EXPLANTES

Primero es necesario esterilizar el material vegetal; para ello, los explantes, hojas y/o tallos, se lavan en agua corriente por espacio de 30 min, posteriormente, se transfieren a un matraz que contenga una solución al 10% v/v, de hipoclorito de sodio (cloralex) durante 30 min. Pasado este tiempo, se enjuagan por lo menos 5 veces con agua estéril.

Tanto las hojas como las secciones de tallo se inoculan picandolos con una jeringa previamente sumergida en una suspensión de *A. tumefaciens*. Por último, se siembran en tubos de cultivo que contengan medio Murashige y Skoog (1962) basal sin suplemento hormonal (MS-H, apéndice I), y se colocan en el cuarto de crecimiento a 26°C con iluminación continua.

Después de 3 a 4 semanas, los tumores resultantes, se pasan a frascos de 130 ml que contengan medio basal sin hormonas complementado con el antibiótico carbenicilina 1mg/l. Se resiembran en el mismo medio - cada 25 días hasta obtener un tejido libre de bacterias, para lo cual se requieren de 4 a 5 resiembras. Esto se verifica estriando en un medio de cultivo bacteriano por ejemplo, en YEB.

Una vez obtenido el tejido tumoral libre de bacterias, se mantiene

subcultivandolo cada 25 días en MS-H sin antibiótico.

Los tumores son designados con una inicial que corresponde a la planta de donde provienen: B para los de *Bouvardia ternifolia*, y N para los de *Nicotiana tabacum*, seguidos por un número que corresponde a la cepa bacteriana utilizada para la inducción.

3. INDUCCION DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES

Los explantes se esterilizan en la forma antes mencionada, y se siembran en tubos de cultivo con medio basal (apéndice I) complementado con la siguiente composición hormonal:

2,4-D	(auxina)	1.0	mg/l
cinetina	(citocinina)	0.005	mg/l

Los tubos se colocan en el cuarto de crecimiento a 26°C con iluminación continua. Una vez formado el callo, después de 3 a 4 semanas, se pasan a frascos de 130 ml que contengan medio basal con las hormonas arriba mencionadas (MS+H).

Los callos se mantienen subcultivandolos cada 25 días en el mismo medio, y son designados por la inicial de la planta seguida por el subíndice ts que significa tipo silvestre.

4. INICIO DE CELULAS EN SUSPENSION

Se inocula un gramo de tejido de callo o de tumor, en un matraz de 250 ml que contenga 50 ml de medio de cultivo líquido, MS+H ó MS-H,

y se colocan en una plataforma de agitación a temperatura ambiente, hasta que el tejido se haya disgregado, lo cual ocurre aproximadamente en 12 días. Entonces se ajusta la concentración celular a $0.5-2.5 \times 10^5$ células/ml, la cual se calcula en un hemocitómetro ó cámara de Neubauer (Bright Line, American Optical Co.).

Para mantener el cultivo en suspensión, se coloca un inóculo de 5 ml en un matraz de 250 ml que contenga 50 ml de medio. Este inóculo ya contiene la densidad celular mínima requerida para iniciar un nuevo cultivo de éste tipo.

5. CURVA DE CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSION.

Se colocan diez ml de células en suspensión, normales o tumorales, que tengan 12 días de crecidas en un matraz de 500 ml que contenga 100 ml de medio, MS+H ó MS-H, se colocan en una plataforma de agitación y se dejan crecer durante 12 días. De este matraz, se colocan 5 ml de células en suspensión como inóculo inicial, en 4 matraces de 250 ml que contengan 50 ml de MS+H y 5 ml de células en 4 matraces que contengan 50 ml de MS-H.

Cada dos días, se saca una muestra de 2 ml de cada matraz y se colocan en un tubo de centrifuga cónico graduado. Se centrifuga a 2,500 rpm durante 10 min, se mide el paquete celular (pastilla) y se expresa en por ciento.

6. METODO PARA MEDIR LpDH EN TEJIDOS TUMORALES DE AGALLA (Otten y Schilperoort, 1978)

Este método se basa en la conversión de arginina a octopina, por la acción de la LpDH, por extractos celulares de tejidos de agalla.

Se colocan 10 mg de tejido en un tubo de centrifuga eppendorf y se

agregan 40 ml de buffer de extracción frío, el cual contiene :

Tris-HCl	0.1 M
Sacarosa	0.5 M
Acido ascórbico	0.1 % (p/v)
Cisteína-HCl	0.1 % (p/v)

pH = 7.0

El tejido se tritura con la ayuda de una varilla de vidrio y se centrifuga a 1,200 rpm durante 3 min en una microfuga eppendorf (Beckman). El sobrenadante se pasa a un tubo limpio y se le agrega un volúmen igual de la mezcla de incubación compuesta de :

L-arginina	30.0 mM
Piruvato	75.0 mM
NADH	20.0 mM

Todo disuelto en fosfato de sodio 0.2 M pH = 7.0

La solución stock de arginina se neuttaliza con HCl antes de adiccionarla a la mezcla.

Se incuba a 22°C durante una hora en la obscuridad. Todos estos pasos se siguen tanto para el tejido normal (control) como para el tejido tumoral.

La formación de octopina se detecta por electroforésis en papel. Al principio y al final del período de incubación, se colocan 4 µl de la mezcla de reacción en el lado anodal de un pedazq de papel Whatman #3 de 13 cm de ancho x 17 cm de largo. Se utilizan 2 µl de octopina 0.5 µg/ml como marcador y verde de metilo como indicador el cual migra a una

posición semejante a la de la arginina.

La electroforé^sis se lleva a cabo en un buffer que contiene ácido fó^rmico/ácido acético/agua (5:15:80 v/v) a 400 volts durante una hora. El papel se revela en un volú^men de fenantrenquinona 0.02%/etanol absoluto mezclado inmediatamente antes de usarse con un volú^men de NaOH al 10 %/etanol al 60 %. Después de que se seca el papel, las manchas se vi^sualizan con la ayuda de una lá^mp^ara de luz ultravioleta de 366 nm.

7. MEDICION DE LA PRODUCCION DE ETILENO POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

Se coloca un gramo de tejido, normal o tumoral, en frascos ampolle^ta que contengan 10 mililitros de medio de cultivo, MS+H o MS-H. Para permitir la recuperaci^on del da^oo que pudiera haber sufrido el tejido, los frascos se dejan destapados en una campana de flujo laminar, para e^vitar la contaminaci^on, por espacio de dos horas. Pasado este tiempo, los frascos se tapan herméticamente (tiempo cero).

Se toman muestras de 50 μ l con la ayuda de una microjeringa a dife^rentes tiempos y se inyectan en un cromatógrafo de gases (Varian aerograph series 2,700) equipado con una columna de 20 % DEGS, Chromosorb W AW DMCS 80/100, 8 pies 1/8 de pulgada, de acero inoxidable, con un flujo de aire de 300 ml/mⁱn y flujo de hidrógeno de 25 ml/mⁱn. Como gas a^rreador se emplea nitrógeno a un flujo de 30 ml/mⁱn. La inyecci^on y detecci^on se lleva a cabo a temperatura ambiente.

El R_f del etileno se determina pasando una muestra de gas comercial. La misma muestra comercial, de concentraci^on conocida, permite calibrar el aparato.

8. ACTIVIDAD DE LA AIA-OXIDASA (método de Gordon y Weber, 1951)

Este método se basa en la intensidad del color rosa, producido -

por el AIA al ser mezclado con el reactivo de Salkowsky (apéndice II).

La mezcla de reacción consiste de:

Buffer de fosfatos	(pH = 5.5)	1×10^{-2} M
Acido indolacético	(AIA)	1×10^{-4} M
Cofactor	(DCP)	1×10^{-4} M
Cloruro de manganeso	(MnCl ₂)	1×10^{-4} M
Peroxidasa	(Sigma)	1×10^{-6} M

Extracto enzimático

Las fuentes para la enzima son:

a) Callo ó tumor. Se hace un extracto crudo del tejido y se dializa durante 18 hr, este se añade a la mezcla de reacción arriba mencionada. Se toman muestras de 1 ml cada hora y se le adicionan 2 ml del reactivo de Salkowsky, con el fin de parar la reacción y obtener el color rosa, se agita en el vortex y se deja reposar 15 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se mide la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

Todas las determinaciones se hacen en la obscuridad para evitar la fotooxidación del AIA.

b) Células en suspensión. Se añade un inóculo de 2.5 ml de células en suspensión, normales o transformadas, a matraces que contengan 25 ml de medio de cultivo, MS+H ó MS-H, adicionándoles AIA 1×10^{-4} M y cofactor DCP 1×10^{-4} M. Se toma una muestra de 2 ml cada hora, se centrifuga, y el sobrenadante se utiliza para la determinación en la forma antes mencionada.

9. SINTESIS DE AIA A PARTIR DE Trp EN *A. tumefaciens* (Liu y Kado, 1979)

9.1. Condiciones de crecimiento.

Las cepas de *A. tumefaciens* se crecen en medio basal 925 el cual -

contiene:

COMPUESTO	CONCENTRACION
	g/l
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	1.0
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	1.0
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.3
Sacarosa	10.0
L-triptofano	0.2

Las células se crecen en 50 ml de medio 925 complementado con L- [$5\text{-}^3\text{H}$] -triptofano (Amersham International Ltd, Amersham U. K., actividad específica 21 Ci/mmol) durante 48 horas a temperatura ambiente en una plataforma de agitación, en obscuridad, hasta una densidad óptica final de 2 ± 0.5 .

Para cosechar, se centrifuga a 4,000 rpm en una centrífuga clínica a 4°C durante 20 min, el sobrenadante se utiliza para la extracción de AIA (muestra 1). La pastilla se resuspende en 20 ml de medio 925 fresco, se sonica a 0°C por 5 min a intervalos de 1 min. Los fragmentos celulares se precipitan con 3 volúmenes de acetona y se remueven centrifugando a 4,000 rpm en una centrífuga clínica a 4°C durante 20 min, el sobrenadante se utiliza para la extracción de AIA (muestra 2) y la pastilla se desecha.

9.2. Extracción de AIA.

Al sobrenadante, muestra 1 ó 2, se le agregan 20 μl de [$2\text{-}^{14}\text{C}$] - AIA (Amersham International Ltd, Amersham U. K., actividad específica 54 mCi/mmol), como estándar interno para saber la recuperación de ésta al final de la extracción. A continuación, se acidifica a pH 3 con HCl 1 N y se extrae 4 veces con 5 volúmenes de eter dietílico. Se extrae el eter y se condensa la muestra en un rotavapor, el residuo se disuelve en 20 ml de Na_2CO_3 al 2 % (p/v) y se lleva a pH 3 con HCl 1 N. Nue-

vamente se extrae 4 veces con 5 volúmenes de eter, se extrae el eter, - se condensa la muestra y el residuo se disuelve en 2 ml de metanol anhi dro.

9.3. Análisis de AIA.

9.3.1. Cromatografía en papel. Los dos mililitros de la extrac- ción se colocan en línea sobre papel Whatman # 3, de 25 cm de ancho por 40 cm de alto, en los extremos se ponene 75 μ l de los estándares de AIA y Trp, ambos a una concentración de 2 mg/ml, se deja correr en la obscu ridad durante 20 hr en un cilindro de vidrio que contenga un buffer de isopropanol/amonio, al 28 %/agua (80:10:10).

9.3.2 Procesamiento del cromatograma. Se marca el frente del sol^u vente y se deja secar. Se identifica la posición de los estándares, vi sualizados con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta, se cortan - tiras horizontales, del resto del cromatograma que contenga el extracto, correspondites al Rf del AIA y al Rf del Trp. Estas tiras se cortan en pedazos más pequeños y se colocan en un matríz de 125 ml que contenga - 50 ml de metanol anhidro. Se cubre y se deja agitando durante 16 hr. Pasado este tiempo, se filtra el líquido y se enjuaga 3 veces con 5 ml de metanol absoluto. Se reduce el volúmen en el rotavapor hasta 10 ml, se transfieren a un tubo de centrifuga donde se reduce el volúmen hasta 500 μ l con nitrógeno. Los 500 μ l se pasan a un vial al que se le aña gan 10 ml de líquido de Bray (apéndice III). Se colocan en el contador de centelleo (Liquid Scintillation Spectrometer Paecard TRI-CARB) y se obtienen las cpm.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se iniciaron 4 líneas tumorales *in vitro*: 3 de *Nicotiana tabacum* - (N_{4210} , N_{4001} y N_{4060}) y una de *Bouvardia ternifolia* (B_{4210}). Los tumores inducidos con la cepa silvestre de *A. tumefaciens*, LBA4001, presentan una morfología típica de callo; masa de tejido amorfo desdiferenciado - de color blanco, muy suave y de superficie rugosa. Los tumores inducidos con la cepa LBA4060 son más compactos, de superficie rugosa, presentan coloración verde y a lo largo del trabajo se observó, esporádicamente, la formación de pequeñas hojas, como es de esperarse para un tejido que supuestamente contiene bajos niveles de auxina, tumores tipo citocinina. Por último los tumores inducidos con la cepa LBA4210 presentan una morfología similar a la de los tumores inducidos con la cepa silvestre es decir, callo: suave de superficie rugosa, sólo que de color pardo. Nunca se observó la formación espontánea de raíces, como se esperaba para un tumor de tipo auxina.

También se inició callo normal a partir de *B. ternifolia* (B_{ts}) el cual presentó una morfología típica; masa de tejido amorfo totalmente desdiferenciado, blanco muy suave y de superficie rugosa. Semejante a los tumores inducidos con la cepa silvestre y con la LBA4210.

Una vez obtenidos los tumores libres de bacterias (aproximadamente después de un período de 6 meses) se procedió a caracterizarlos.

Como ya se mencionó, las células tumorales, adquieren dos nuevas características como resultado de la transformación, una de las cuales es la habilidad de crecer en un medio de cultivo carente de hormonas. Como se puede ver en la figura 6, las células normales, B_{ts} , solamente crecen en el medio que contiene hormonas, mientras que la línea tumoral B_{4210} , crece perfectamente bien tanto en el medio con hormonas como en el que no las contiene. A pesar de que se ve una cierta discrepancia en el crecimiento en ambos medios, esta no es significativa ni aún a un nivel de confianza del 99 %. Podemos afirmar, por lo tanto, que el teji-

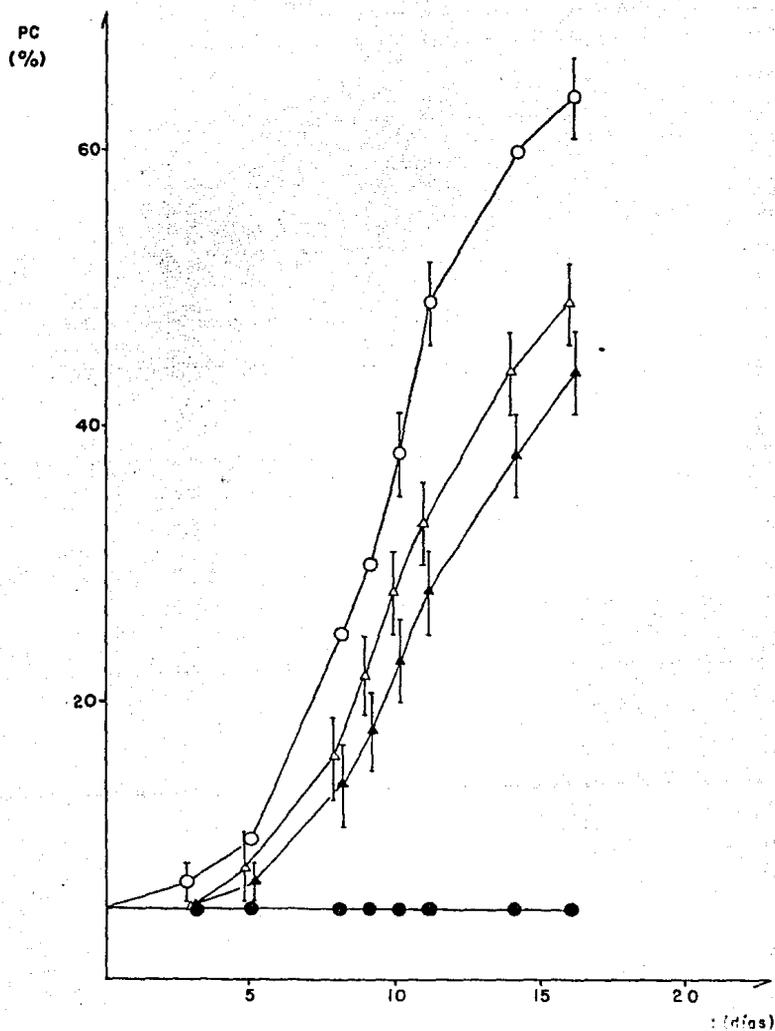


FIG. 6. Curva de crecimiento de células de B. ternifolia en suspensión.

- (○) B_{TS} en MS+H (●) B_{TS} en MS-H
(△) B₄₂₁₀ en MS+H (▲) B₄₂₁₀ en MS-H

do tumoral no presenta diferencias de crecimiento debidas a la presencia ó ausencia de hormonas en el medio, a diferencia de lo que ocurre con el tejido normal.

La segunda característica tumoral es la capacidad para sintetizar un aminoácido poco común derivado de la arginina (fig. 1, a), ya que las cepas utilizadas para este trabajo contienen todas plásmidos Ti tipo octopina. Una forma de verificar la aparición de este derivado en el tejido tumoral es detectando la presencia de la enzima que lo sintetiza, LpDH, mediante el método desarrollado en 1978 por Otten y Schilperoort. Este método consiste en incubar un extracto del tejido en una mezcla que contenga el precursor; la arginina, y un cofactor (NADH), durante 60 min.

La figura 7 muestra un cromatograma donde puede verse que el tejido tumoral no tiene actividad de LpDH, pues no sintetiza octopina (fig. 7, línea 2), en tanto que el tejido transformado si la tiene (líneas 4 y 5). La línea 3 representa el control con tejido tumoral a un tiempo de incubación de cero min en donde, obviamente, no hay síntesis de octopina.

Una vez caracterizadas las líneas tumorales, mediante la utilización de dos parámetros, se procedió a analizar los niveles de auxina (AIA) presentes en los diferentes tejidos, indirectamente, a través de la producción de etileno.

Zimmerman y Wilcoxon fueron los primero en reportar, en 1935, que las auxinas exógenas estimulan la producción de etileno en varias plantas. Desde 1964, varios trabajos han confirmado y extendido esta observación (Burg y Burg, 1966; Chadwick y Burg, 1970; Kang, et al, 1971). Las concentraciones fisiológicas de AIA y otras auxinas estimulan la formación de etileno en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos de todas las plantas que han sido examinadas y la respuesta del tejido varía con la concentración de las mismas.

Sabiendo lo anterior, lo primero que se hizo fue medir la produc--

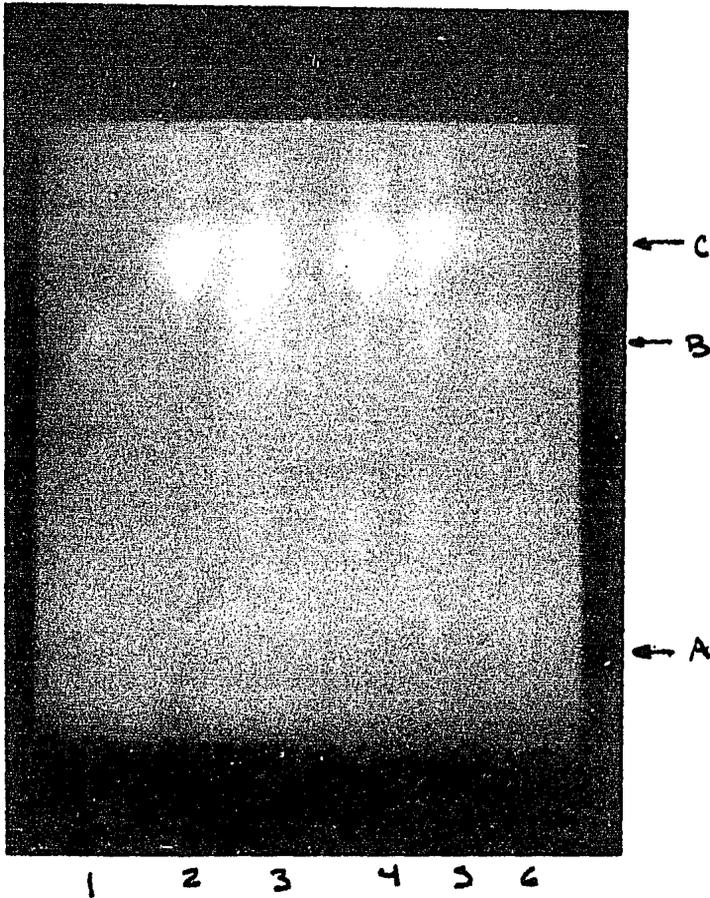


FIG. 7. Análisis de LpDH en tejidos de B. ternifolia después de la infección con A. Tumefaciens.

- | | | |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| (1) estándar de octopina | (4) B_{4210} $t=60$ min | A=origen del cromatograma. |
| (2) B_{TS} $t=60$ min | (5) B_{4210} $t=60$ min | B=octopina. |
| (3) B_{4210} $t=0$ min | (6) estándar de octopina | C=arginina. |

ción de etileno en las diferentes líneas tumorales para explorar la posibilidad de que existan diferentes niveles de auxinas en los mismos. La figura 8 muestra la producción de etileno por tejidos de *B. ternifolia* y en ella se puede apreciar claramente, que el tejido tumoral produce 7 veces más etileno que el tejido normal. Se observa también que no existe una diferencia significativa en la producción de etileno por el tejido tumoral crecido en medios con y sin hormonas exógenas.

También se midió la producción de etileno por los tejidos tumorales de *N. tabacum*. Los resultados obtenidos de estas mediciones se presentan en la figura 9, en donde se puede apreciar que existe una diferencia clara en la producción de etileno en las tres líneas tumorales. La línea N₄₂₁₀ produce 4 veces más etileno que la línea N₄₀₀₁ y esta a su vez, 1.5 veces más que la N₄₀₆₀. Así mismo, se puede observar que la diferencia en producción de etileno por las líneas tumorales N₄₂₁₀ y N₄₀₆₀ es muy grande, 6 veces más en la primera que en la segunda.

Los resultados obtenidos de esta forma, indican que existe una diferencia que esta de acuerdo con lo establecido por Skoog y Miller en 1975. Los tumores inducidos por la cepa productora de raíces (LBA4210) parecen tener un nivel elevado de auxinas endógenas, los tumores inducidos por la cepa productora de tallos (LBA4060) tienen un nivel bajo de auxinas endógenas, en tanto que los tumores inducidos por la cepa silvestre (LBA4001) presentan un nivel intermedio.

El nivel de AIA endógeno depende de la velocidad de síntesis, inactivación y degradación (ver esquema en la fig. 5). Es posible, entonces, que los diferentes niveles de auxina en los tres tipos de tumores pueda deberse a que en ellos exista una diferente actividad de la AIA-oxidasa, enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del AIA y que es dependiente de Mg⁺⁺. El producto de esta reacción, aunque variable, es principalmente metilén-oxindol. En 1953, Galston y sus colaboradores reportaron que la peroxidasa de rábano cataliza la oxidación del AIA y, desde entonces, ambas actividades: AIA-oxidasa y peroxidasa, se han encontrado juntas aún en preparaciones enzimáticas sumamente puras (Jan -

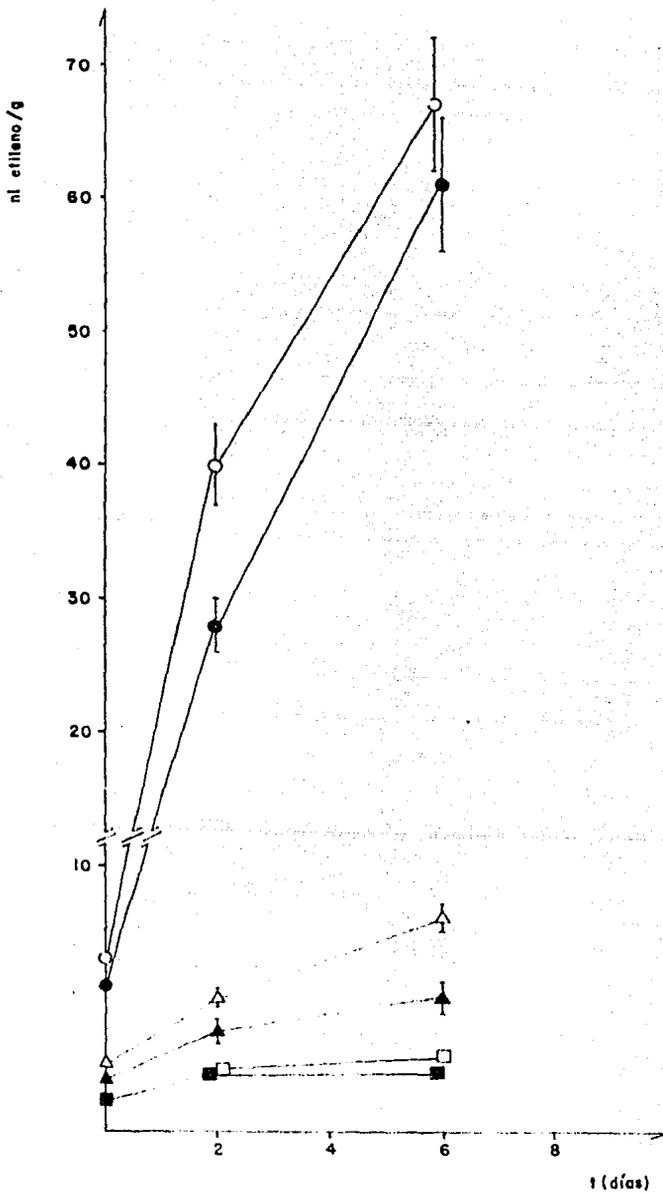


FIG. 8. Etileno producido por tejidos de *B. ternifolia*.
(△) B_{TS} en MS+H (○) B₄₂₁₀ en MS+H (□) Control en MS+H
(▲) B_{TS} en MS-H (●) B₄₂₁₀ en MS-H (■) Control en MS-H

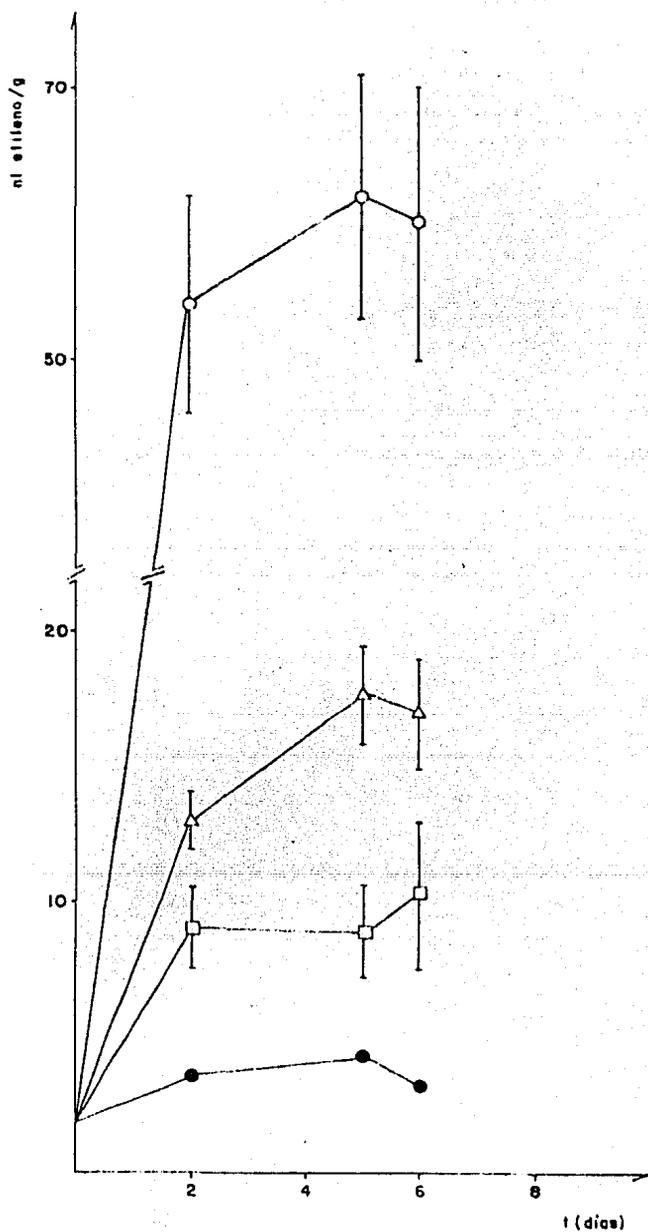


FIG. 9. Etileno producido por tejidos de *N. tabacum* transformados con diferentes cepas de *A. tumefaciens*

(○) N4210 (△) N4001 (□) N4060 (●) Control

ssen, 1970; Pilet, et al, 1970). La reacción que cataliza la AIA - oxidasa es regulada por los ácidos fenólicos. Los monofenoles la incre mentan por ejemplo el 2,4-diclorofenol (DCP), en tanto que los difenoles la inhiben.

El primer experimento que se hizo para estudiar este aspecto, fue empleando peroxidasa pura (Sigma), con el fin de probar el sistema. Los resultados se muestran en la figura 10, en donde se observa que en un período de 15 min, se obtiene la degradación casi completa del AIA. A continuación se midió la actividad de la enzima empleando un sistema de células de *B. ternifolia* en suspensión. En la figura 11 se puede apre ciar que la reacción se lleva a cabo lentamente (25hr) en comparación - con la actividad de la peroxidasa pura (15 min, fig. 10). Posteriormen te, se midió la enzima de la misma manera, pero utilizando tanto célu- las normales (B_{TS}), como células tumorales (B_{4210}). Los resultados - están ilustrados en la figura 12, donde se puede ver que no hay diferen cia significativa en la actividad de las enzimas de ambos tipos de cé- lulas.

Debido a que la actividad de la enzima es modificada por cofactores orgánicos de pequeño peso molecular, también se midió la actividad de la enzima en extractos crudos dializados de los diversos tejidos. En la figura 13 se puede apreciar que tampoco existe diferencia significativa entre ellos. Se hicieron distintas variaciones a este método, pero los resultados obtenidos en todos los casos, indican que no hay diferencia significativa en la capacidad de degradación de AIA en las diferentes - líneas tumorales.

Como resultado de la transformación con *A. tumefaciens*, una parte del plásmido es transferido a la célula vegetal hospedera, pero aún no se ha establecido claramente si este fragmento juega un papel regula dor directo en la iniciación del crecimiento neoplásico o si este seg- mento codifica para productos que de alguna manera perturban la maquina- ría normal de la célula. Las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal son excelentes candidatos para la medición de este fenómeno. En 1979, Liu y Kado, presentaron evidencia de que la producción de -

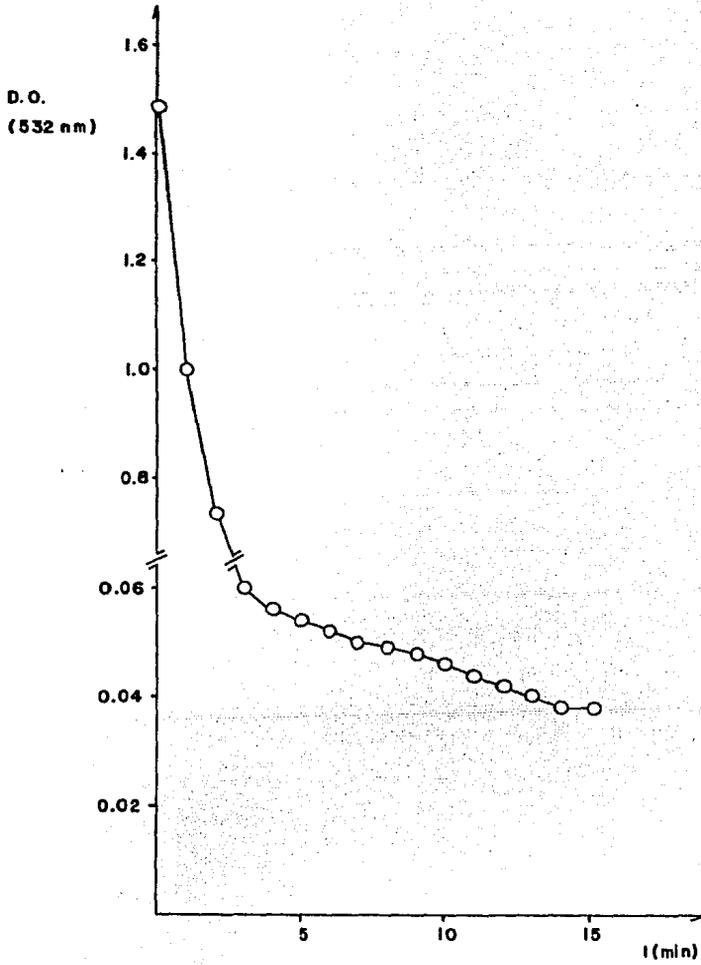


FIG. 10. Cinética de degradación de AIA, utilizando una peroxidasa pura (sigma).

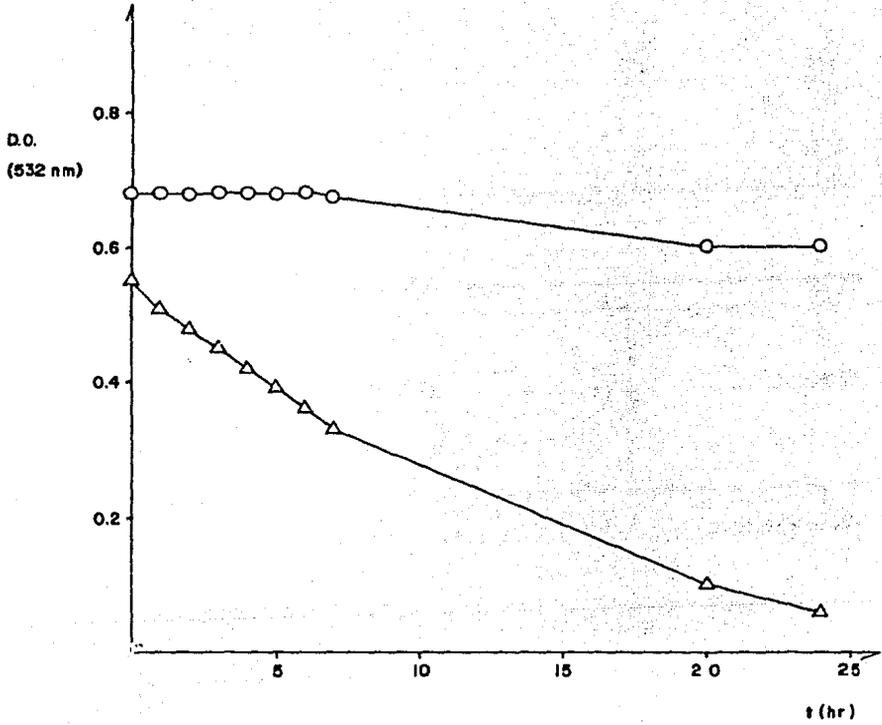


FIG. 11. Actividad de la AIA-oxidasa en células de B. ternifolia en suspensión.

(O) Control (Δ) B_{TS}

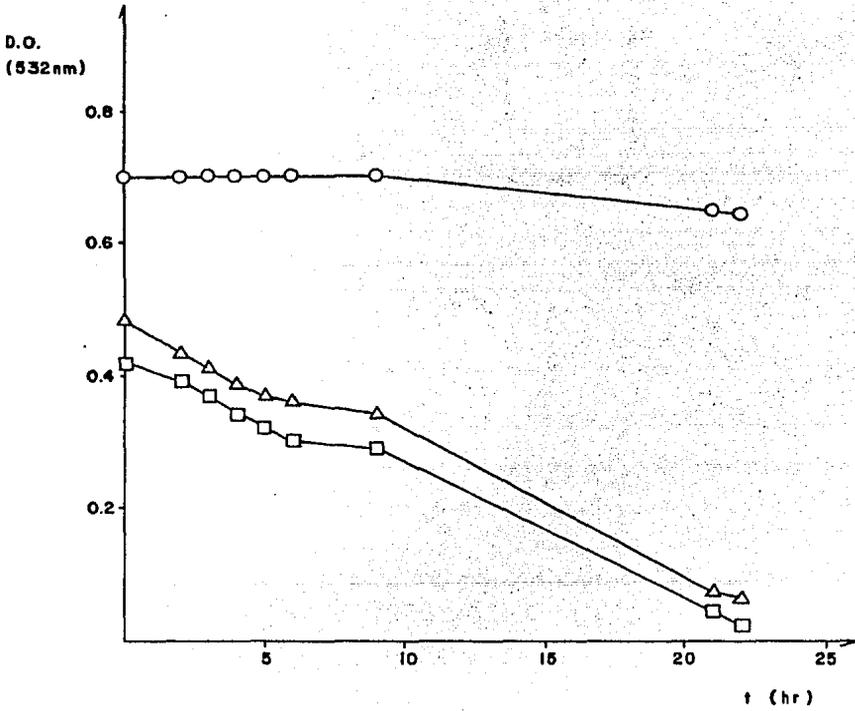


FIG. 12. Actividad de la AIA-oxidasa en células de B. ternifolia en suspensión.

(○) Control (△) B_{TS} (□) B₄₂₁₀

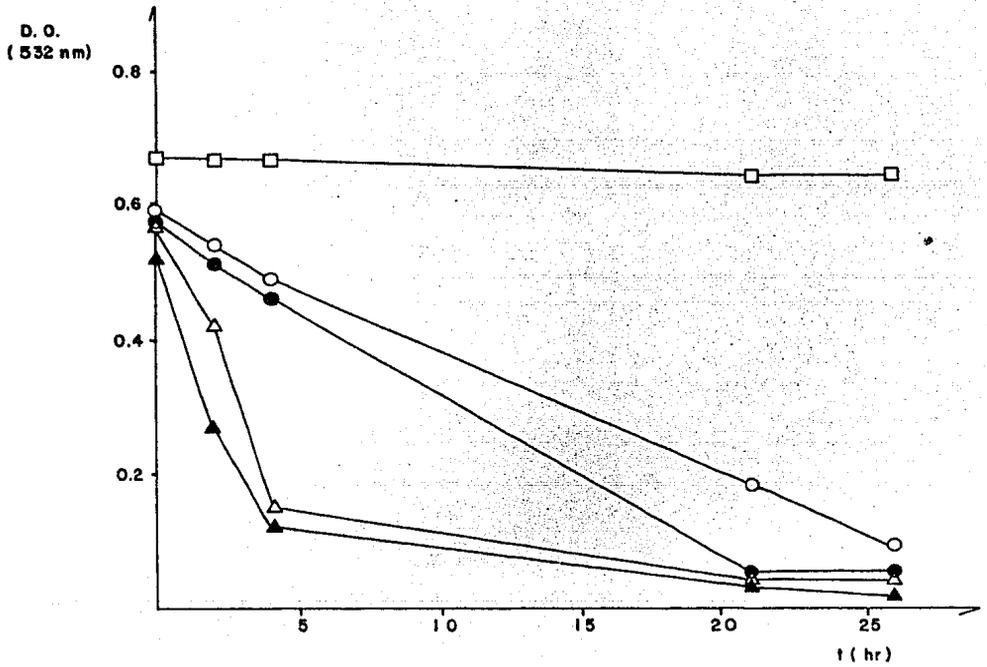


FIG. 13. Actividad de la AIA-oxidasa en extracto crudo dializado de tejidos de B. ternifolia y N. tabacum.

(△) B_{Ts} (▲) B₄₂₁₀ (○) N₄₂₁₀ (●) N₄₀₆₀ (□) Control

AIA por la bacteria esta regulada por el mismo plásmido que le confiere la oncogenicidad.

Según lo propuesto por Schilperoort, el plásmido debe contener dos juegos de genes; uno que codifica para un síntoma tipo citocinina y otro que codifica para un síntoma de tipo auxina. Podemos suponer, que la cepa mutante LBA4210 tiene insertado el transposón, Tn904, en la región que codifica para la síntesis de citocininas. En tanto que la cepa mutante LBA4060 contiene la secuencia de inserción, IS60, en la región que codifica para la síntesis de auxinas (fig. 2), anulando su expresión y alterando así el cociente auxina/citocinina. De acuerdo con esto, esperamos que la síntesis de AIA a partir de triptofano, sea diferente en los tres tipos de cepas de *A. tumefaciens*.

Los resultados obtenidos sobre este punto presentan mucha variación, por lo que no es posible compararlos. Tal vez lo que haga falta es un método más adecuado para determinar la cantidad de AIA sintetizado por cada cepa, como por ejemplo cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

CONCLUSIONES

Las líneas tumorales que se obtubieron fueron caracterizadas tanto por su crecimiento en medio de cultivo carente de hormonas, como por la síntesis de octopina. Se puede concluir también que la presencia o ausencia de hormonas exógenas en el medio de cultivo no altera el crecimiento del tejido tumoral.

Los resultados de la producción de etileno por las diferentes líneas tumorales sugieren que si existen diferentes niveles endógenos de auxinas, y que los tumores inducidos por la cepa productora de raíces, son los que tienen los niveles más elevados, tanto en *N. tabacum* como en *B. ternifolia*, en tanto que los tumores inducidos por la cepa productora de tallos, tienen los niveles más bajos. Estos resultados estan de acuerdo con lo propuesto por Skoog y Miller en 1957, referente a la rediferenciación de células vegetales en cultivo.

Por lo anterior, suponemos que existen diferentes niveles endógenos de auxinas en las líneas tumorales, pero no sabemos exactamente que los produce. Podemos decir que no parece deberse a una diferente actividad de AIA-oxidasa en ellos.

En cuanto a la síntesis de AIA a partir de triptofano por las diferentes cepas de *A. tumefaciens*, lo único que podemos decir, es que -nace falta el empleo de técnicas más adecuadas como HPLC, para poder determinar con exactitud la cantidad de AIA producida por ellas que permita su comparación.

APENDICES

I. MEDIO MS BASAL UTILIZADO PARA EL CULTIVO DE *B. ternifolia* y *N. tabacum* (Murashige y Skoog, 1962).

Para la preparación del medio, primero se preparan las siguientes soluciones stock:

SOLUCION		CONCENTRACION mg/l
Solución A		
Cloruro de calcio	(CaCl ₂ . 2 H ₂ O)	44,000.0
Solución B		
Nitrato de amonio	(NH ₄ NO ₃)	16,500.0
Nitrato de potasio	(KNO ₃)	19,000.0
Solución C		
Yoduro de potasio	(KI)	83.0
Cloruro de cobalto	(CoCl ₂ . 6 H ₂ O)	2.5
Solución D		
Fosfato de potasio	(KH ₂ PO ₄)	17,000.0
Acido bórico	(H ₃ BO ₃)	620.0
Molibdato de sodio	(Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O)	25.0
Solución E		
Sulfato de magnesio	(MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	37,000.0
Sulfato de manganeso	(MnSO ₄ . 4 H ₂ O)	1,700.0
Sulfato de cobre	(CuSO ₄ . 5 H ₂ O)	2,500.0
Sulfato de zinc	(ZnSO ₄ . 7 H ₂ O)	860.0

Solución E

Sulfato de fierro	(FeSO ₄ . 7 H ₂ O)	5,570.0
EDTA de sodio	(Na ₂ EDTA)	7,450.0

Vitaminas para 250 ml de solución stock

Glicina	50.0
Piridoxina-HCl	12.5
Acido nicotínico	12.5
Tiamina-HCl	2.5
Meso-inositol	2,500.0

Cantidades necesarias de las soluciones concentradas para preparar un litro de medio :

SOLUCION	ml de sol./l de medio
A	10.0
B	100.0
C	10.0
D	10.0
E	10.0
F	5.0
Vitaminas	10.0

Para evitar la precipitación de las sales en el medio, se recomien da ir agregando las soluciones concentradas en el orden arriba indicado, a un volúmen de agua determinado y con agitación constante. Una vez mez cladas éstas, se adicionan las hormonas necesarias, según sea el caso, y la sacarosa (30 g/l). Finalmente, se ajusta el pH a 5,8 con NaOH ó HCl 1.0 N y se afora a un litro.

Si se requiere medio sólido, el agar (0.9 %) se adiciona una vez que se ha ajustado el pH y aforado el medio. Se recomienda hacerlo cuando el medio de cultivo se ha precalentado para que el agar se funda bien.

Tanto los matraces con medio líquido, como los frascos de 130 ml y los tubos de cultivo con medio sólido, se esterilizan en el autoclave a 120°C durante 15 min.

II. REACTIVO DE SALKIWSKY

17 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 12 ml de agua destilada, se le añaden 400 ml de agua fría y a esto se le va agregando, lentamente, 240 ml de ácido sulfúrico concentrado. Manteniéndolo en un baño con hielo y agitación constante.

III. LIQUIDO DE BRAY PARA CENTELLEO

COMPUESTO	CANTIDAD/l
Naftaleno	60.0 g
Metanol	100.0 ml
PPO	4.0 g
POPOP	0.2 g
Etilén-glicol	20.0 ml

Llevar a 1,000 ml con Dioxano.

BIBLIOGRAFIA

Amasino, R. M. & Miller, C. O. (1982). Hormonal control of tobacco crown gall tumor morphology. *Plant. Physiol.* 69:389-392

Beardsley, R.E. (1972). The inspection phase in the crown gall - disease. *Prog. Exp. Tomor. Res.* 15:1-75.

Bomhoff, G., Klapwijk, P. M., Kester, H. C. M., Schilperoort, R. A., Hernalsteens, J. P. & Schell, J. (1976). Octopine and nopaline: synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 145:177-181.

Braun, A. C. (1947). Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *Am. J. Bot.* 34:234-240.

Braun, A. C. (1952). Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in crown gall. *Growth.* 16:65-74.

Braun, A. C. (1953). Bacterial and host factors concerned in determining tumor morphology in crown gall. *Bot. Gaz. (Chicago).* 114:363-371.

Braun, A.C. (1958). A physiological basis for autonomous growth of the crown gall tumor cell. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 44:344-349.

Braun, A. C. (1978). Plant tumors. *Biochim. Biophys. Acta.* - - 516:167-191.

Braun, A. C. & White, P. R. (1943). Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown gall tumors. *Phytopathology.* - 33:85-100.

Burg, S. P. & Burg, E. A. (1966). The interaction between auxin - and ethylene and its role in plant growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 55:262-269.

Cassab, G. (1981). Cultivo de células y organogénesis *in vitro* - de *Bouvardia ternifolia*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.

Cassab, G., Vázquez, A. R. y Robert, M. L., (1983). Control hormonal de la morfogénesis de células vegetales en cultivo. (En impresión).

Chadwick, A. V. & Burg, S. P. (1970). Regulation of root growth by auxin-ethylene interaction. *Plant. Physiol.* 45:192-200.

Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of - plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall - tumorigenesis. *Cell.* 11:263-271.

Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J. & Sciaky, D. (1978). Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature (London).* 275:147-149.

Currier, T.C. & Nester, E. W. (1976). Evidence for diverse types - of large plasmids in tumor inducing strains of *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 126:157-165.

De Cleene, M. & De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *The Bot. Rev.* 42:389-466.

De Picker, A., Van Montagu, M. & Schell, J. (1978). Homologous DNA sequences in diferent Ti-plasmids are essential for oncogenicity. *Nature.* 275:150-153.

Drlica, K. A. & Kado, C. I. (1975). Crown gall tumors: are bacterial nucleic acids involved? . *Bact. Rev.* 39:186-196.

Drummond, M. H., Gordon, M. P., Nester, E. W. & Chilton, M. D. (1977). Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall - tumors. *Nature (London).* 269:535-536.

Drummond, M. H. & Chilton, M. D. (1978). Tumor-inducing (Ti) plasmids of *Agrobacterium* share extensive regions of DNA homology. *J. Bacteriol.* 136:1178-1183.

Einset, J. W. (1980). Cytokinins in tobacco crown gall tumors. -
Biochem. Biophys. Res. Commun. 93:510-515.

Firmin, J. L. & Fenwick, G. R. (1978). Aropine a major new plasmid
determined metabolite in crown gall tumors. Nature. 276:842-844.

Galston, A. W., Bonner, U. & Eaker, R. S. (1953). Flavoprotein and
peroxidase as components of the indoleacetic acid oxidase system of -
peas. Arch. Biochem. 42:456-470.

Gautheret, R. J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture
indéfinie des tissu de tubercules de carotte. C. r. hebd. Séanc. Acad.
Sci. (Paris). 208:118-121.

Gordon, S. A. & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of -
indoleacetic acid. Plant. Physiol. 23:192-195.

Gurley, W. B., Kemp, J. D., Albert, M. J., Sutton, D. W. & Callis,
J. (1979). Transcription of Ti plasmid derived sequences in three -
octopine-type crown gall tumor lines. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - -
76:2828-2832.

Henderson, J. H. M. & Bonner, J. (1952). Auxin metabolism in normal
and crown gall tissue of sunflower. Am. J. Bot. 39:444-451.

Janssen, M. G. H. (1970). Indoleacetic acid oxidase, peroxidase and
polyphenol oxidase of pea roots. Acta. Bot. Neerl. 19:73-80.

Kang, B. G., Newcombe, W. & Burg, S. P. (1971). Mechanism of auxin
induced ethylene production. Plant. Physiol. 47:504-509.

Klapwijk, P. M., Van Breukelen, J., Korevaar, K., Ooms, G. & -
Schilperoort, R. A. (1980). Transposition of Tn904 encoding streptomycin
resistance into the octopine Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. J.
Bacteriol. 141:129-136.

Koekman, B. P., Ooms, G., Klapwijk, P. M. & Schilperoort, R. A. -
(1979). Genetic map of an octopine Ti-plasmid. Plasmid. 2:347-357.

Kögl, F. & Haagen-Smit, A. J. (1931). Über die Chemie des Wuchsstoffs. K. Akad. Wetenschap. Amsterdam. Proc. Set. Sci. - - 34:1411-1416.

Link & Eygers (1941). Hyperauxin in crown gall of tomato. Bot. Gaz. 103:87-106.

Lipetz, J. (1966). Crown gall tumorigenesis II. Relations between wound healing and the tumorigenic response. Cancer. Res. 26:1597-1605.

Lippincott, B. B. & Lippincott, J. A. (1969). Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 97:620-628.

Lippincott, J. A. & Lippincott, B. B. (1975). The genus - - *Agrobacterium* and plant tumorigenesis. Ann. Rev. Microbiol. - - 29:377-405.

Liu, S. T. & Kado, C. I. (1979). Indoleacetic acid production: A plasmid function of *Agrobacterium tumefaciens* C58. Biochem Biophys. - Res. Comm. 90:171-178.

Meins, F. (1973). Evidence for the presence of a readily transmissible oncogenic principle present in crown gall teratoma tissues of - tobacco. Differentiation. 1:21-25.

Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H. & - Strong, F. M. (1955). Structure and synthesis of kinetin. J. Am. Chem. Soc. 77:2662-2663.

Miura, G.A. & Mills, S. E. (1971). The conversion of D-tryptophan to L-tryptophan in cell cultures of tobacco. Plant. Physiol. 47:483-487.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nobécourt, P. (1939). Sur la perinnete et l' augmentation de volume des cultures de tissus vegetaux. C. R. Séanc. Soc. Biol. (Paris).

130:1270-1271.

Ooms, G., Klapwijk, P. M., Poulis, J. & Schilperoort, R. A. (1980). Characterization of Tn904 insertions in octopine Ti plasmid mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 144:82-91.

Ooms, G., Hooykaas, P. J. J., Moolenaar, G. & Schilperoort, R. A. (1981). Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. Gene. 14:33-50.

Otten, L. A. B. M. & Schilperoort, R. A. (1978). A rapid microscale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. Biochim. Biophys. Acta. 527:497-500.

Petit, A., Delhaye, S., Tempé, J. & Morel, G. (1970). Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent. Physiol. Vég. 8:205-213.

Pilet, P. E., Lavanchy, P. & Sevhonkion, S. (1970). Interactions between peroxidases, polyphenoloxidase and auxinoxidases. Physiol. Plantarum. (Kbh). 23:800-804.

Schilperoort, R. A. (1981). Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* and their role in the transformation of plant cells. En: Transplante y movilización de genes. R. Ondarza; M. Robert; F. Bolivar (Eds). CONACYT México.

Schneider, A. & Wightman, F. (1974). Metabolism of auxin in higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:487-513.

Scott, I. M., Browning, G. & Eayles, J. (1980). Ribosylzeatin and zeatin in tobacco crown gall tissue. Planta. 147:269-273.

Skoog, F. & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. -

Exp. Biol. 11:118-131.

Smith, E. F. & Townsend, C. O. (1907). A plant tumor of bacterial origin. Science. 25:671-673.

Thimann, K. V. (1969). The auxins. In : Wilkins, M. B., ed. The Physiology of Plant Growth and Development. McGraw Hill Publishing - Company, London. Pp.1-45.

Thomashow, M. F., Nutter, R., Montoya, A. L., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1980). Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. Cell. 19:729-739.

Van Lerebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. R & Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing activity. Nature. 252:169-170.

Van Lerebeke, N., Genetello, C., Schell, J., Schilperoort, R. A., Hermans, A. K., Hernalsteens, J. P. & Van Montagu, M. (1975). Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature. 255:742-743.

Vasil, V. & Hildebrant, A. C. (1965). Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. Science. 150:889-892.

Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. D. & Nester, E. W. (1975). Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 123:255-264.

White, P. R. (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. Am. J. Bot. 26:59-64.

White, P. R. & Braun, A. C. (1942). A cancerous neoplasm of plants. Autonomous bacteria free crown gall tissue. Cancer Res. 2:597-617.

Willmitzer, J., Otten, L., Simons, G., Schmalenback, W., Schroder, J., Van Montagu, M., de Vos, G. & Schell, J. (1981). Nuclear and poly-somal transcript of T-DNA in octopine crown gall suspension and callus

cultures. Mol. Gen. Genet. 182:855-862.

Yadav, N. S., Postle, K., Saiki, R., Thomashow, M. F. & Chilton, M. D. (1980). T-DNA of a crown gall teratoma is covalently joined to host plant DNA. Nature. 287:458-461.

Zaenen, I., Van Lerebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. & Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol. 86:109-127.

Zimmerman, P. W. & Wilcoxon, F. (1935). Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. Contrib. Boyce. Thompson. Inst. 7:209-229.