

ESTUDIOS SOBRE LA INTERACCION ENTRE PARED BACTERIANA DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Y LA CELULA HUESPED VEGETAL

R. BELTRA
J. SERRADA
J.J. SANCHEZ-SERRANO
G. DEL SOLAR
E. ALONSO

Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, C.S.I.C. *

RESUMEN

En el presente trabajo hemos relacionado en tres estirpes de *A. tumefaciens*, la presencia o ausencia de plásmido Ti con la estructura y capacidad de unión del LPS a la célula vegetal y con la producción de EPS. Las estirpes estudiadas fueron: ATV, estirpe salvaje aislada de "crown gall" de vid y virulenta; AO4, estirpe virulenta aislada de la anterior por tratamiento con colorante de acridina y estirpe AT7, estirpe avirulenta obtenida espontáneamente de ATV. Esta última estirpe, de acuerdo con el fenotipo que muestra, carece de plásmido Ti, que habría resultado eliminado de forma espontánea. Hemos aislado los LPS de las tres estirpes que se han caracterizado por electroforesis en gel de poli-acrilamida. También ha sido estudiada la interferencia de los LPS con bacterias completas en la formación de tumores, resultando ser similar en los tres casos. La capacidad de unión de la bacteria a la planta por LPS debe estar determinada por DNA cromosómico, ya que es independiente de la virulencia y por tanto de la presencia de DNA plasmídico.

También producen estas estirpes fibras de celulosa de naturaleza exopolisacárida, cuya misión es la de unir de forma inespecífica la bacteria a la planta, en las primeras fases de infección. En nuestro caso, esta producción tampoco aparece ligada a la virulencia y a la presencia del plásmido Ti, por lo cual su control lo debe ejercer el DNA cromosómico.

INTRODUCCION

La estirpe ATV de *Agrobacterium tumefaciens*, aislada de cepa de vid (*Vitis vinífera*) presenta fenotipos no coincidentes con los observados en estirpes del área mediterránea, que producen "crown gall" en dicho huésped. Esta estirpe posee un plásmido Ti nopalina

Recibido: 26-4-85.

* Joaquín Costa, 32. 28006 Madrid.

que le confiere virulencia, con alto rango de huésped. Dicho plásmido ha sido caracterizado por digestión con endonucleasas de restricción y visualizado por microscopía electrónica. Se ha estimado su tamaño en $54,65 \pm 3,06 \mu\text{m}$, lo cual equivale a un peso molecular de 113,67 Md (SANCHEZ-SERRANO *et al.*, 1985).

Un plásmido Ti de estas mismas características, se ha detectado en la estirpe AO4 de *A. tumefaciens*, derivada de la anterior por tratamiento con naranja de acridina y temperaturas supraóptimas. No existe plásmido en la estirpe AT7 de *A. tumefaciens*, curada de forma espontánea y que por tanto no presenta virulencia ni ningún otro fenotipo codificado en plásmidos (BELTRA *et al.*, 1983. Datos sin publicar).

En este trabajo los datos citados se han relacionado a la capacidad mostrada por los lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (EPS), para unirse específicamente a sitios dentro de la herida en la planta huésped, y para anclar la bacteria a la pared vegetal, fase indispensable en la transformación tumoral. En otros géneros de bacterias fitopatógenas la producción de EPS está estrechamente relacionada con la virulencia (AYERS *et al.*, 1979; POLITIS, GOODMAN, 1980). En *Agrobacterium* se han descrito así mismo fibras de naturaleza polisacárida que permiten a dicha bacteria unirse de forma inespecífica a la célula vegetal (MATTHYSSE *et al.*, 1981 y 1982).

Todos estos aspectos que no están totalmente claros en la bibliografía, adquieren especial relevancia si tenemos en cuenta que es el de *Agrobacterium tumefaciens* un sistema natural de ingeniería genética (KADO, 1979, NESTER, MONTOYA, 1979; VAN MONTAGU; SCHELL, 1982).

MATERIAL Y METODOS

Estirpes bacterianas

A. tumefaciens ATV-113. Estirpe virulenta y salvaje, aislada de un tumor de vid (*Vitis vinifera*), procedente de la provincia de Toledo. Manifiesta los fenotipos correspondientes a un plásmido Ti nopalina.

A. tumefaciens A04337. Estirpe virulenta, obtenida de la anterior por tratamiento con temperaturas de cultivo supraóptimas (37°C), en sucesivos pases durante 15 días con naranja de acridina 10 $\mu\text{g/ml}$ pH 7,6 en caldo glucosado.

A. tumefaciens AT7 Estirpe avirulenta, que no manifiesta ninguno de los fenotipos codificados en plásmido Ti. Aislada de un cultivo rutinario de ATV.

Medios de cultivo, tampones y reactivos

—Medio YEB (VAN LAREBEKE *et al.*, 1977) de composición: Extracto de carne, 0,5 p.100; Extracto de levadura, 0,1 p.100; Peptona, 0,5 p.100; Sacarosa 0,5 p.100; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mM.

—Caldo glucosado (SERRADA, 1978), de composición: Extracto de carne, 0,3 p.100; Peptona, 1,0 p.100; C_1Na , 0,5 p.100; Glucosa, 2,0 p.100.

—Medio AH para producción de exopolisacáridos (AMEMURA, HARADA, 1971) de composición: Glucosa, 40,0 g; $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)$, 1,5 g; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 1,0 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g;

ClNa, 0,01 g; Cl₂Ca, 0,01 g; Cl₂Mn.4H₂O, 0,01 g; Cl₃Fe. 6H₂O, 0,01 g; Cl₂Zn.7H₂O, 0,07 mg; SO₄Cu.5H₂O, 0,05 mg; MoO₄Na₂.2H₂O, 0,02 mg; BO₃H₃, 0,01 mg; Agua destilada, 1 litro.

—Buffer λ para lavado de bacterias y diluciones (WILLMITZER *et al.*, 1982) de composición: TRIS, 10mM, SO₄MG, 10 mM.

—Reactivo de Schiff para tinción de bandas de LPS en gel de poliacrilamida (JANN *et al.*, 1975).

—Métodos para extracción de LPS: Se ha seguido la técnica descrita por WESTPHAL *et al.*, 1965, partiendo de 20 g de células liofilizadas.

—Caracterización de LPS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida: Se ha seguido la técnica descrita por JANN *et al.*, 1975, partiendo de muestras de 50 µg de LPS e introduciendo un control interno consistente en LPS de la estirpe 2012 de *Pseudomonas viridiflava* que presenta dos bandas diferenciadas; por un lado aparece una banda llamada S, ancha y localizada en posición superior, y otra llamada R, de localización más baja, tenue y difusa. En estos experimentos se utilizaron 25 µl de tampón rompedor, dodecilsulfato sódico (SDS) al 1 p.100 en los geles, tiempos de 2 horas y corrientes de 5 mA. Cuando se agrega el reactivo de Schiff aparecen bandas en los 30 minutos siguientes que pueden ser leídas en espectrofotómetro. Algunos de los geles como los que aparecen en la Foto 1, se pasaron por un espectrofotómetro Gilford, leyendo la absorbancia a 600 nm a lo largo de todo el gel.

—Inoculaciones mixtas de LPS y bacterias: Para demostrar la especificidad de la unión a determinados sitios de la célula huésped por parte de *A. tumefaciens*, se ha establecido un control negativo, en pruebas separadas, consistente en LPS de *P. viridiflava* 2012, cuya interferencia con las bacterias virulentas y más concretamente con ATV es muy pequeña. El número de hojas tratadas para cada caso y en cada experiencia ha sido de 14 a 16. Se ha seguido el método descrito por WHATLEY *et al.*, (1976). Las soluciones de LPS se aplican directamente sobre las hojas primarias de 7 días de *Phaseolus vulgaris*, L. var. "Pinta", sobre las que se realiza el ensayo. Las bacterias se cultivan en medio YEB y se recogen en buffer λ manteniéndolas en baño de hielo mientras no se inoculan. Se hace paralelamente un recuento de células viables.

Las hojas de judía que van a ser inoculadas se someten a abrasión suave con Celita, se lavan con agua estéril y se dejan secar. Se extiende sobre las hojas 0,1 ml de la solución de LPS. Transcurridos 15 minutos, se aplica 0,1 ml de la suspensión bacteriana. A los 7 días de realizadas las inoculaciones, se recuenta el número de tumores iniciados en una serie de hojas, para cada caso estudiado, empleando un transiluminador de luz fluorescente.

—Microscopía electrónica de barrido: El microscopio electrónico de barrido se ha utilizado en la observación de la superficie externa de las estirpes estudiadas. En la preparación de las muestras se ha empleado el método de MARTINEZ y RAMIREZ (1981). Las muestras se han visualizado en un microscopio de barrido JEOL modelo JSM-50, utilizando voltajes de aceleración de 15-20 Kv.

—Aislamiento de EPS bacterianos: Los preinóculos de las bacterias, crecidos en medio YEB hasta una absorbancia a 600 nm de 1,4, que corresponden aproximadamente a una concentración celular de 5-10 x 10⁹ cels/ml, se han inoculado en 300 ml de caldo glucosado, que se cultivan a 27°C durante 70-72 horas. A continuación se siguió la técnica de AMEMURA y HARADA (1971).

—Determinación de carbohidratos y proteínas en EPS. La determinación de carbohidratos en EPS se ha realizado por el método de la antrona de LOEWUS (1952), midiéndose la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 55B. Como controles se han utilizado muestras de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 ml de una solución de glucosa 200 μ g/ml. Para la determinación de proteínas de EPS se ha seguido el método de LOWRY *et al.*, (1951).

RESULTADOS

—Extracción de LPS bacterianos: El rendimiento de los liofilizados sin purificar, oscila entre el 8-12 p.100 del peso de bacterias liofilizadas del que se parte. Después de realizadas las ultracentrifugaciones, disolviendo en agua para eliminar la contaminación de RNA en el LPS, el rendimiento es estimado alrededor del 3 p.100. Los resultados obtenidos se recogen en el Cuadro 1.

CUADRO 1
RENDIMIENTOS EN LPS EN LAS ESTIRPES ATV, AO4 Y AT7 DE
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

BACTERIA	ATV	AO4	AT7
Peso células liofilizadas (g)	11,44	19,50	7,43
Peso LPS liofilizado sin purificar (g)	1,01	2,45	0,94
Rendimiento (%)	8,47	12,50	10,20
Peso LPS liofilizado purificado (g)	0,32	0,60	0,22
Rendimiento (%)	2,80	3,10	2,90

—Caracterización de los LPS bacterianos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida: Las gráficas obtenidas nos muestran una sola banda en las tres muestra de *A. tumefaciens*, si bien es más ténue en AO4, que presenta migración distinta a las bandas S y R del control de *P. viridiflava* 2012.

—Inoculaciones mixtas. Competencia por sitios de unión. Como queda reflejado en los Cuadros 2 y 3, los porcentajes de inhibición han resultado similares para cada una de las dos estirpes inoculadas, ATV y AO4. La inhibición se mantiene con independencia de la preparación de LPS que se aplica con antelación y que compite con las bacterias. El LPS procedente de AT7, estirpe avirulenta de *A. tumefaciens*, compite con eficacia similar a la mostrada por los LPS de las estirpes virulentas, con ligeras variaciones. En el caso que

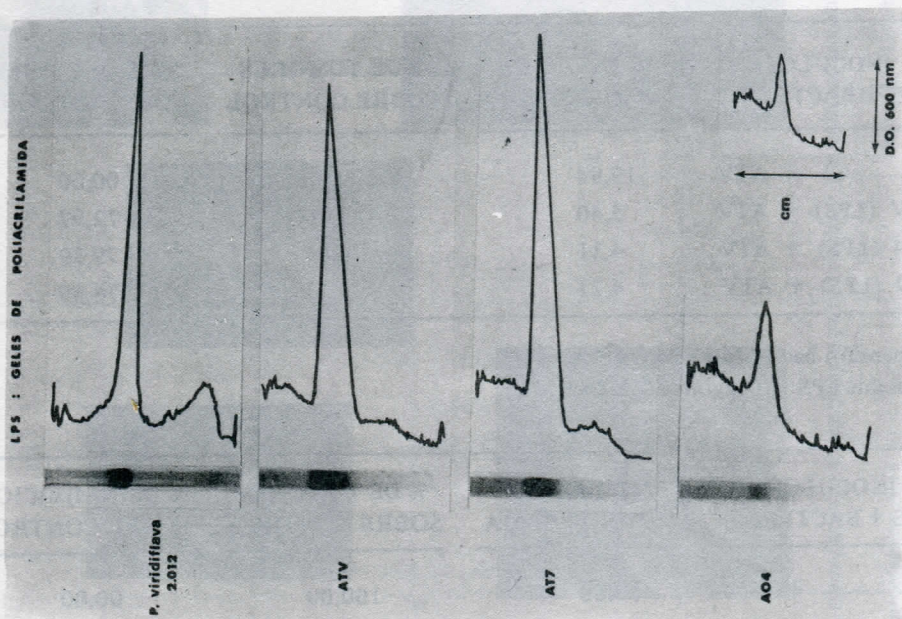


Fig. 1. Densidad óptica a 600 nm de geles de poliacrilamida, cargados con LPS de *A. tumefaciens* ATV, AO4 y AT7 y de *P. viridiflava* 2012 como control interno. La electroforesis se realizó durante 2 horas, con una intensidad de 5 mA por gel.

se produce menor inhibición, el tanto por ciento de tumores sobre el control no alcanza el 40 p.100.

—Microscopía electrónica de barrido: El objetivo de aplicar esta técnica de microscopía ha sido localizar estructuras de naturaleza polisacárida del tipo de las descritas por MATTHYSSE *et al.*, 1981) en las estirpes C58 y NT1, de similares características a nuestras estirpes. Como muestran las Figuras 2, 3 y 4, hemos conseguido visualizar dichas fibras a partir de colonias recogidas directamente de medio YEB-agar y sometidas al “punto crítico” de anhídrido carbónico, tras una serie de manipulaciones de fijación y deshidratación. Nuestros resultados apuntan en la dirección de que no es necesaria la presencia de la célula vegetal para que *A. tumefaciens* o al menos las estirpes que nosotros hemos estudiado sinteticen este tipo de fibras. Carecemos no obstante de datos acerca de la formación de éstas en presencia de células vegetales, que presumiblemente sería mucho mayor.

Nuestros resultados indican que los genes implicados en la síntesis de estas fibras muy posiblemente están localizados en el cromosoma bacteriano, puesto que la estirpe AT7, que carece de plásmido Ti, produce esas fibras de forma aparentemente igual a como lo hacen ATV y AO4, las estirpes virulentas de *A. tumefaciens* que hemos empleado en estas investigaciones.

—Aislamiento de EPS bacterianos: Los rendimientos en EPS han sido los siguientes.

La estirpe AO4 produce EPS en menor cantidad y con un aspecto que en ocasiones es

CUADRO 2

INOCULACIONES MIXTAS / LPS-BACTERIA, EN HOJAS DE JUDIA
(*PHASEOLUS VULGARIS* L, VAR. "PINTA")

INOCULOS (LPS + BACTERIA)	Nº MEDIO DE TUMORES/HOJA	%DE TUMORES SOBRE CONTROL	%DE INHIBICION SOBRE CONTROL
----- + ATV	19,94	100,00	00,00
ATV (LPS) + ATV	5,40	27,08	72,92
AO4 (LPS) + ATV	4,11	20,61	79,39
AT7 (LPS) + ATV	4,21	21,11	78,89

Suspensión bacteriana: 6×10^9 cels/ml.

Solución LPS: 40 µg/ml.

INOCULOS (LPS + BACTERIA)	Nº MEDIO DE TUMORES/HOJA	% DE TUMORES SOBRE CONTROL	% DE INHIBICION SOBRE CONTROL
----- + ATV	33.60	100,00	00,00
<i>P. viridiflava</i>			
(LPS) + ATV	31,25	93,00	7,00

Suspensión bacteriana: 3×10^{11} cels/ml.

Solución LPS: 40 µg/ml.

CUADRO 3

INOCULACIONES MIXTAS / LPS-BACTERIA, EN HOJAS DE JUDIA
(*PHASEOLUS VULGARIS* L, VAR. "PINTA")

INOCULOS (LPS + BACTERIA)	Nº MEDIO DE TUMORES/HOJA	%DE TUMORES SOBRE CONTROL	%DE INHIBICION SOBRE CONTROL
----- + AO4	19,50	100,00	00,00
ATV (LPS) + AO4	3,43	17,59	82,41
AO4 (LPS) + AO4	3,00	15,38	84,62
AT7 (LPS) + AO4	7,42	38,05	61,95

Suspensión bacteriana: 4×10^9 cels/ml.

Solución LPS: 40 µg/ml.

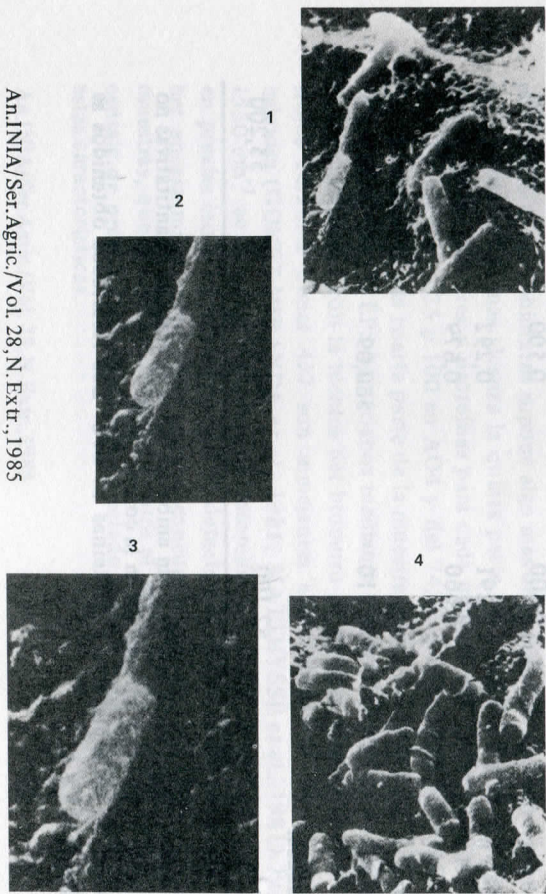


Fig. 2-4. Microscopía electrónica de barrido. Estirpes ATV, AO4 y AT7 de *A. tumefaciens*, sometidas a punto crítico y sombreadas con oro-paladio. Se aprecia la existencia de fibrillas.

Fig. 2-A. *A. tumefaciens* ATV

- 1. x 6,200
- 2. x 10,500
- 3. x 15,400
- 4. x 6,200



Fig. 3-A. *A. tumefaciens* AO4

- 1. x 6,200
- 2. x 8,999
- 3. x 10,200
- 4. x 17,600

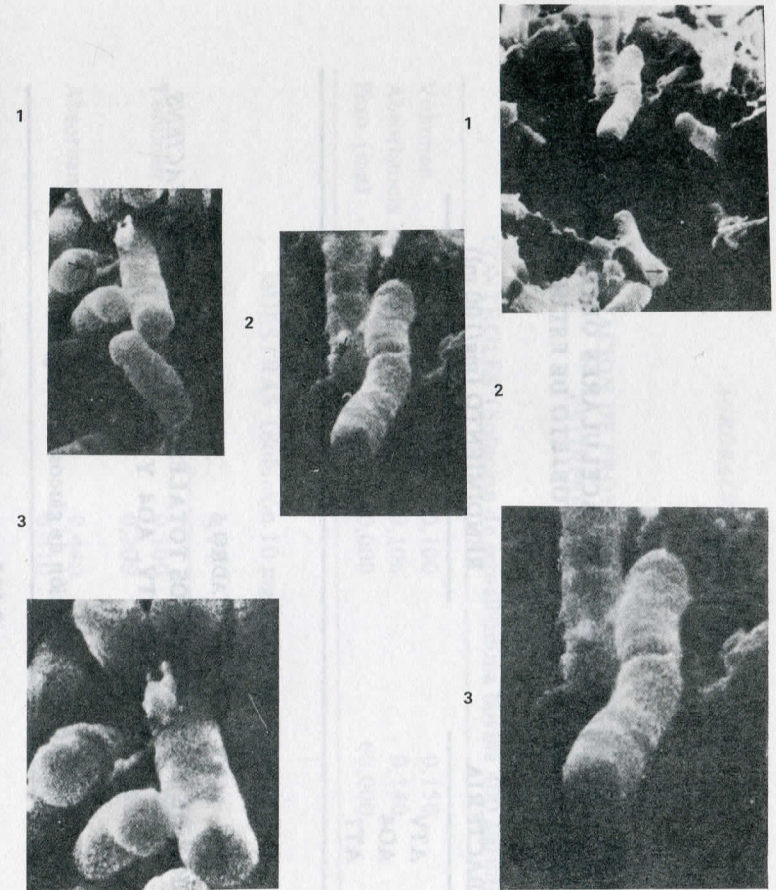


Fig. 4-A. *A. tumefaciens* AT7

- 1. x 6,200
- 2. x 12,500
- 3. x 14,900

CUADRO 4

RENDIMIENTOS EN POLISACARIDOS EXTRACELULARES OBTENIDOS DE LAS ESTIRPES DE *A. TUMEFACIENS* OBJETO DE ESTUDIO

BACTERIA	RENDIMIENTO (mg/100 ml)
ATV	260,23
AO4	62,10
AT7	206,33

CUADRO 5

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES EN EPS DE *A. TUMEFACIENS*, ESTIRPES ATV, AO4 Y AT7

CONTROLES (Solución de glucosa 200 μ g/ml)			
Volumen (ml)	0,100	0,200	0,400
Absorbancia (540 nm)	0,057	0,106	0,200
Peso (μ g)	20,000	40,000	80,000
MUESTRAS (Solución de EPS 1 mg/ml)			
	ATV	AO4	AT7
Volumen (ml)	0,200	0,200	0,200
	0,500	0,500	0,500
Absorbancia (540 nm)	0,291	0,292	0,310
	0,660	0,679	0,694
Peso de azúcar en muestra (μ g/ml)	521,710	560,09	552,450
Porcentaje de azúcar en muestra (%)	52,100	56,000	55,200

menos mucoso que el de las otras estirpes. Sin embargo, estas diferencias cuantitativas no van acompañadas de diferencias apreciables en la composición.

—Determinación de carbohidratos y proteínas en EPS: Los resultados obtenidos se recogen en los Cuadros 5 y 6.

CUADRO 6

DETERMINACION DE PROTEINAS EN EPS DE *A. TUMEFACIENS*
ESTIRPES ATV, AO4 Y AT7

CONTROLES (Solución de seroalbúmina bovina 400 µg/ml)

Volumen	0,100	0,150	0,200
Absorbancia (750 nm)	0,106	0,140	0,182
Peso (mg)	40,000	60,000	80,000

MUESTRAS (Solución 10 mg EPS/1 ml de NaOH 1N)

	ATV	AO4	AT7
Volumen (ml)	0,100	0,100	0,100
	0,200	0,200	0,200
Absorbancia (750 nm)	0,440	0,525	0,468
	0,810	0,840	0,660
Peso de proteína en muestra (mg/ml)	1,810	2,020	1,880
Porcentaje de proteína en muestra (%)	18,100	20,250	18,830

Se aprecian contenidos muy similares en azúcares y proteínas en todas las muestras. El porcentaje de carbohidratos supone algo más de la mitad de la composición de la muestra, el de proteínas apenas alcanza la quinta parte del total. Estos porcentajes acumulados de contenido en azúcares y proteínas para cada muestra son de un 70,20 p.100 para el caso de ATV, de un 76,25 p.100 en AO4 y del 74,07 p.100 para la estirpe AT7. Ello implica que alrededor de una cuarta parte de la muestra queda sin determinar.

—Análisis de los EPS bacterianos mediante espectrofotometría de infrarrojos: Los espectros obtenidos con la técnica del bromuro de potasio en espectrofotómetro de infrarrojos Perkin-& Elmer 457 son semejantes a los obtenidos por otros autores para la celulosa (GOMEZ-MIRANDA *et al.*, 1981; MATTHYSSE *et al.*, 1981). En la zona 1650-1550 cm^{-1} se observa una banda de absorción que debe corresponder a proteína, ya que en previas cromatografías en papel no detectamos ningún aminoazúcar que pudiese absorber en esa misma zona. Este aspecto concuerda con las valoraciones bioquímicas de las muestras, que arrojan un contenido entre el 18,10 y 20,25 p.100 de proteínas. Este porcentaje de proteína es claramente detectado por un espectrofotómetro de infrarrojos de estas características.

Por otro lado, se observa una banda típica de absorción a 890 cm^{-1} que es totalmente característica de enlaces beta, indicando que nuestro polisacárido posee este tipo de enlace.

La primera parte de la gráfica representada en la Fotografía 5, entre 4000 y 1700 cm^{-1} es característica de los enlaces $-\text{OH}$ de todos los azúcares. Todo ello queda reflejado en la correspondiente gráfica.

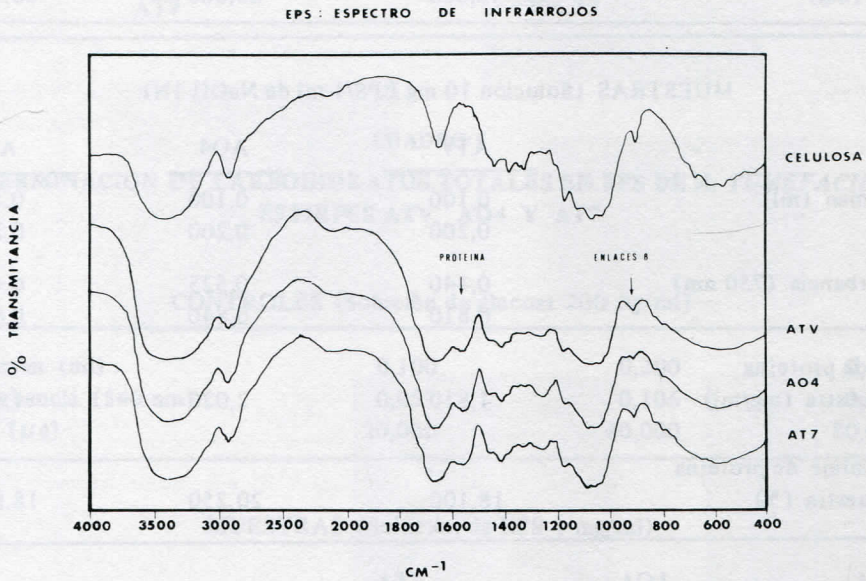


Fig. 5 Análisis de los EPS de las estirpes ATV, AO4 y AT7 de *A. tumefaciens* por espectrofotometría de infrarrojos.

DISCUSION

En el caso de *A. tumefaciens*, los lipopolisacáridos de la pared son el componente que se une directamente a la pared vegetal (LIPPINCOTT y LIPPINCOTT, 1969; MATTHYSSE *et al.*, 1978). Según ciertos autores, el determinante genético de los LPS debiera ser en principio plasmídico (WHATLEY *et al.*, 1978). Sin embargo, cuando la estirpe C58, virulenta con un plásmido Ti nopalina, es curada de éste, resulta una estirpe, denominada NT1, cuyos LPS son capaces de interferir en la formación de tumores, por competencia con bacterias por los sitios de unión. Se afirmó entonces, que al menos en parte, el determinante genético de los LPS debe hallarse en el cromosoma bacteriano. Nuestros resultados apuntan en la misma dirección. Al menos en las estirpes estudiadas por nosotros, la

funcionalidad y por tanto la estructura de los LPS parecen estar determinados en el cromosoma. El LPS de la estirpe AT7 que no posee plásmido, presenta la misma capacidad que el ATV, estirpe portadora de plásmido Ti nopalina, para interferir con la unión de la bacteria completa a receptores específicos, cuando es inoculado con anterioridad a ésta.

La consecuencia que se desprende de ello, es que debe existir una estructura similar en ambos casos. Las diversas electroforesis en gel de poliacrilamida realizadas no han revelado ninguna diferencia, presentando las tres estirpes estudiadas, ATV, AO4 y AT7, una sola banda. La movilidad es intermedia, del tipo SR, frente a bandas S y R que generalmente presentan las estirpes salvajes de géneros alejados taxonómicamente.

No es este el caso de la estirpe ATV de *A. tumefaciens*, estirpe salvaje aislada de un "crown gall" de vid en campo, ni de sus derivados virulento y avirulento, AO4 y AT7. Era esperable la existencia de alguna diferencia, tanto por la ausencia de plásmido en uno, como por el posible efecto causado en la pared bacteriana por el naranja de acridina en el otro (Datos sin publicar). No ha sido así y estos resultados parecen coherentes con la identidad mostrada por los tres LPS en su capacidad de inhibir específicamente la tumorigenesis en hojas primarias de judía (*Phaseolus vulgaris* L, var. "Pinta"). Este hecho resulta especialmente significativo en la estirpe AT7, mutante avirulento.

De los resultados obtenidos también concluimos que la unión de los LPS a la célula vegetal es de tipo específico, puesto que los LPS de *Pseudomonas viridiflava* 2012, aplicados como control negativo en las mismas condiciones que los de *Agrobacterium*, provocan una inhibición de sólo un 7 p.100, frente a cerca del 75 p.100 provocado por éste.

Pero no sólo los LPS están implicados en los procesos de unión de la bacteria a la planta en *A. tumefaciens*, suceso imprescindible para que el Ti plásmido sea transferido a la célula vegetal y ésta resulte transformada. En 1981 MATTHYSSE *et al.*, describen la producción por *A. tumefaciens* de ciertas fibrillas compuestas de celulosa, que sirven a la bacteria para anclarse en la superficie de la pared vegetal. Según estos autores, las estirpes avirulentas como la NT1 no producirían estas fibras, o lo hacen en menor grado que las virulentas.

En nuestro trabajo la microscopía de barrido puso de relieve la existencia de unas fibras de aspecto similar a las descritas por MATTHYSSE *et al.*, en 1981, éstas aparecen tanto en las estirpes portadoras de plásmido, ATV y AO4, como en AT7, que carece del mismo. Este hecho parece demostrar la existencia de un determinante genético para dichas fibras localizado en el cromosoma bacteriano, y no en el plásmido, como se ha descrito. Por consiguiente, nosotros postulamos que la aparición de este tipo de fibras es independiente de la presencia en la bacteria de un plásmido Ti y que, por tanto, ha de estar regulado por el DNA cromosómico.

El aislamiento de fracciones de LPS o EPS de las estirpes de *A. tumefaciens* objeto de estudio, mostraban que las tres estirpes producían EPS susceptibles de ser aislados. Esta fracción, que es producida en menor cantidad por la estirpe AO4, presenta en los tres casos un contenido de algo más de la mitad de hidratos de carbono y una quinta parte de proteína, no estando claras las causas de estas diferencias cuantitativas, y no estando directamente relacionada con diferencias en la virulencia, porque este carácter se mantiene en la estirpe AO4. Podría deberse a la actuación del naranja de acridina sobre el DNA, ya que esta acción no se restringe a elementos extracromosómicos, pudiéndose alte-

rar la transcripción del cromosoma. Es decir, que al ser cromosómica la información genética que regula la producción de EPS, una alteración en ella podría originar diferencias de tipo cualitativo o tal vez cuantitativo.

El análisis por espectrofotometría de infrarrojos de las tres estirpes dan un espectro sustancialmente idéntico y que es del tipo del obtenido con celulosa purificada. La absorción que aparece en la banda de los 890 cm^{-1} indica sin lugar a dudas la existencia de enlaces de tipo beta en la muestra. En la banda de los $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ se aprecia la presencia de proteína, concordando con los resultados obtenidos con otros métodos de valoración.

Estos resultados nos llevan a postular que los EPS aislados por nosotros de las estirpes ATV, AO4 y AT7 de *A. tumefaciens* y las fibras visualizadas en las mismas por microscopía electrónica de barrido y caracterizadas por otros autores como compuestos de celulosa, sean en realidad el mismo compuesto. El descenso cuantitativo apreciado en AO4 creemos sea debido a una alteración cromosómica sufrida durante el tratamiento con colorantes que, sin embargo, no afectaron al plásmido Ti.

Los EPS que hemos aislado, están compuestos casi exclusivamente de glucosa, dato que concuerda perfectamente con lo mostrado por el espectro de infrarrojos.

Los resultados obtenidos implican que en ninguno de los compuestos de naturaleza polisacárida estudiados, de alguna forma implicados en la inducción tumoral por parte de *A. tumefaciens*, puede hablarse de un control por parte del plásmido Ti; este control parece ejercerlo el DNA cromosómico.

SUMMARY

Study on the interaction between bacterial wall of *Agrobacterium tumefaciens* and the host vegetal cell.

In the present work we have related, in three different strains of *A. tumefaciens*, the presence or absence of Ti plasmid with the structure and linking capacity of the LPS to the vegetal cell, as well as to the production of EPS. The following strains were used in this work: ATV, wild strain isolated from a grapevine tumor of crown gall; AO4 strain isolated from the former one by treating it with acridine orange. Both of them were virulent. The third strain used AT7 was not virulent and it was obtained spontaneously from ATV. This last strain, in agreement with the phenotype it exhibits, it lacks of Ti plasmid, which has been spontaneously eliminated. We have isolated the LPS of the three strains which we have characterized by polyacrylamide gel electrophoresis.

We have studied as well the interference between the LPS with the whole bacteria in the tumor formation, reaching to the conclusion that these results are similar. The capacity for union the bacteria to the plant by means of the LPS should be determined by chromosomic DNA, since this union is neither dependent of the virulence, nor of the presence of plasmidic DNA.

These strains produce fibrils of cellulose of exopolysaccharidic nature, its role being to join the bacteria to the plant in an inespecific form during the first steps of the infection. In our case, this production seems not to be linked to the virulence or to the presence of Ti plasmid, concluding, therefore, that the control must be exercised by the chromosomic DNA.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMEMURA A., HARADA T., 1971 Production of succinoglucan by *Alcaligenes faecalis* var. myxogenes, growing in defined medium and in non-growing cell suspension. *J. Ferment. Technol.*, **49**, 559-564.
- AYERS A.R., AYERS S.B., GOODMAN R.N., 1979 Extracellular polysaccharide of *Erwinia amylovora*: a correlation with virulence. *Appl. Env. Microbiol.*, **38**, 659-669.
- GOMEZ-MIRANDA B., RUPEREZ P., LEAL J.A., 1981 Changes in chemical composition during germination of *Botrytis cinerea* sclerotia. *Current Microbiol.*, **6**, 243-246.
- JANN B., RESKE K., JANN K., 1975. Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, **60**, 239-246.
- KADO C.I., 1979. Host-vector systems for genetic engineering of higher plant cells. *Genetic Engineering*. Ed. by Setlow J. and Holleander H. Plenum Publish. Corp. **1**, 223-239
- 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. Bact.*, **97**, 620-628.
- LOEWUS F.A., 1952. Improvement in the anthrone method for determination of carbohydrates. *Analyt. Chem.*, **24**, 219
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol. Chem.*, **193**, 265
- MARTINEZ A.T., RAMIREZ C., 1981 Contribution to the preparation techniques of conidia for scanning electron microscopy *Abstracts of the 4th International Conference on Culture Collections*. Brno. 66.
- MATTYSSE A.G., HOLMES K.V., GURLITZ R., 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bact.*, **145**, 583-595.
- MATTYSSE A.G., HOLMES K.V., GURLITZ R., 1982. Binding of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot protoplasts. *Physiol. Plant Pathol.*, **20**, 27-33.
- MATTYSSE A.G., WYMAN D.M., HOLMES K.V., 1978. Plasmid-dependent attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to plant tissue cells. *Infect. Immun.*, **22**, 516-522.
- NESTER E.W., MONTOYA A., 1979. Crown-gall. A natural case of genetic engineering. *A.S.M. News.*, **45**, 283-287.
- POLITIS D.J., GOODMAN R.N., 1980. Fine structure of extracellular polysaccharide of *Erwinia amylovora*. *Appl. Env. Microbiol.*, **40**, 596-607
- SANCHEZ-SERRANO J.J., VILLARROEL R., MAENHAUT R., SERRADA J., BELTRA R., 1983. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strain ATV isolated from a grapevine tumor. *Zbl. Mikrobiol.*, **140**, 59-72.
- SERRADA J., 1978. *Inducción tumoral en plantas por bacterias tumorígenas atípicas: su posible etiología*. Tesina. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.
- VAN LAREBEKE N., GENETELLO C., HERNALSTEENS J.P., DEPICKER A., ZAE-NEN I., MESSENS E., VAN MONTAGU M., SCHELL J., 1977 Transfer of Ti-plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4. *Mol. Gen. Genet.*, **152**, 119-124.

- VAN MONTAGU M., SCHELL J., 1982. The Ti-plasmids of *Agrobacterium*. In: *Gene Cloning on Organisms other than Escherichia coli*. Ed. by Hofschneider P.H. and Goebel W Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 96, 237-254.
- WHATLEY M.H., BODWIN J.S., LIPPINCOTT B.B., LIPPINCOTT J.A., 1976. Role for *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. *Infect. Imm.*, 13, 1080-1083.
- WHATLEY M.H., MARGOT J.B., SCHELL J., LIPPINCOTT B.B., LIPPINCOTT J.A., 1978. Plasmid and chromosomal determination of *Agrobacterium* adherence specificity. *J. Gen. Microbiol.*, 107, 395-398.
- WESPHAL O., JANN K., 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carb. Chem.*, 5, 83-91.
- WILLMITZER L., SANCHEZ-SERRANO J., BUSCHFELD E., SCHELL J., 1982. DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. *Mol. Gen. Genet.* 186, 16-22.