

TUMORI NA LISTU GRAHA INDUCIRANI  
BAKTERIJOM *AGROBACTERIUM*  
*TUMEFACIENS* (I<sub>1-4</sub> i B<sub>6</sub>)

With Summary in English

MARIJANA KRSNIK RASOL

(Odjel za fiziologiju, Institut za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 25. 9. 1973.

Uvod

Biljni tumori, slično kao i životinjski, danas su predmet mnogobrojnih istraživanja (vidi npr.: Manigault 1967 a, b; Gautheret 1969; Michel, Gras i Homès 1970; Beiderbeck 1973). Unatoč tome zasad ostaje neriješena sama bit problema tumorske indukcije.

Domaći soj I<sub>1-4</sub> bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town) Conn. dosad nije bio istražen, a tako ni tumori koje izaziva.

U ovom radu dat je kratak prikaz značajnijih rezultata poredbenih istraživanja ovog soja s dobro poznatim i u literaturi поблиže opisanim sojem B<sub>6</sub>.

Materijal i metode

U pokusima poredbeno su studirani domaći bakterijski soj *Agrobacterium tumefaciens* I<sub>1-4</sub> te soj B<sub>6</sub>\*. Prije infekcije listova bakterije su uzgajane u tekućem mediju, koji je bio mućkan vibratorom, a sadržavao je 8 g ekstrakta goveđeg mesa, 1 g ekstrakta kvasca i 5 g saharoze na 1 l medija. Za krutu podlogu toj je otopini dodano još 15 g agara.

Kao biljni materijal poslužile su različite domaće sorte graha (zlatna olovka, starozagorska niska sorta, trešnjevac). Plojke primarnih listova 8 dana starih biljaka graha naprašene su karborundumom. Zatim se na plojku nakapalo 2—3 kapi bakterijske suspenzije. Ranjavanje i infekcija izvršeni su istovremeno trljanjem plojke staklenim štapićem.

\* *A. tumefaciens* I<sub>1-4</sub> izolirala je s vinove loze iz Istre prof. dr A. Šarić i ljubezno ga stavila na raspolaganje na čemu joj najljepše zahvaljujem. Soj B<sub>6</sub> poslao mi je iz Sudana dr El Mamum El Khalifa kojem također dugujem svoju zahvalnost.

## Rezultati i diskusija

### *Agrobacterium tumefaciens* I<sub>1-4</sub>

Prvobitno dobiveni bakterijski soj I<sub>1</sub> redovito je subkultiviran na kosom agaru. Bakterije su, osim toga, povremeno izolirane iz mladih tumora nekih biljaka. Nakon što su pozitivno reagirale na biokemijski test za »crown-gall«-bakterije (Bernearts i De Ley 1963) korištene su u eksperimentima.

Primijećeno je da bakterijska prevlaka soja I<sub>1-4</sub> starenjem postaje djelomično hrapava, za razliku od prevlake soja B<sub>6</sub> koja ostaje u cijelosti glatka i brže se razvija. Pri pohranjivanju na nižim temperaturama (5—10° C) hrapavi dio (R-oblik) bakterijske prevlake soja I<sub>1-4</sub> nikada nije prelazio u glatki oblik (S-oblik) kao što navodi Stapp (1958). Međutim, prilikom ponovne izolacije bakterija iz mladih tumora redovito je dobiven samo S-oblik kolonija.

Bakterije su promatrane svjetlosnim mikroskopom u tamnom vidnom polju te u faznom mikroskopu gdje se dobro vidi vanjski oblik bakterije i nuklearna tjelešca kao tamnija zrnca unutar bakterija.

Pod elektronskim mikroskopom u bakterijskim se stanicama lijepo razabiru centralno smješteni jezgri ekvivalenti (nukleoidi) u obliku svijetlih zona s finim nitima DNK (sl. 1). U perifernim dijelovima stanica dobro su uočljivi ribosomi. Gotovo redovito prisutne su u stanicama elektronsko-optički guste uklopine nepoznate prirode, vjerojatno fosfatna granula (volutin) (sl. 1) kao i manje guste uklopine (najvjerojatnije proteinske prirode).

---

Sl. 1. *Agrobacterium tumefaciens* I<sub>4</sub>. Bakterijske stanice u uzdužnom i poprečnom presjeku. Centralno su smješteni jezgri ekvivalenti, a na periferiji ribosomi. Tamne uklopine su vjerojatno fosfatna granula. 56 000 : 1.

Fig. 1. *Agrobacterium tumefaciens* I<sub>4</sub>. Bacterial cells in longitudinal and transversal section. The nuclear equivalents are located in the centre, the ribosomes on the periphery. The dark inclusions are probably phosphate granules. 56,000 : 1.

Sl. 2. *Phaseolus vulgaris*. Stanica bogata plazmom, iz 8 dana starog tumora na primarnom listu. Plastidi u stadiju proplastida s malobrojnim tilakoidima te tubulima na periferiji. 48 000 : 1.

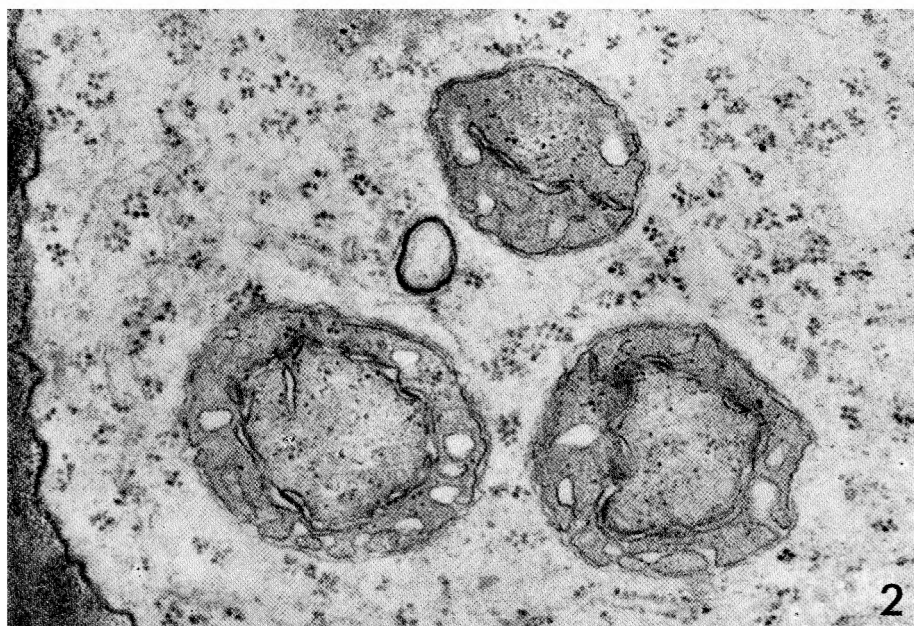
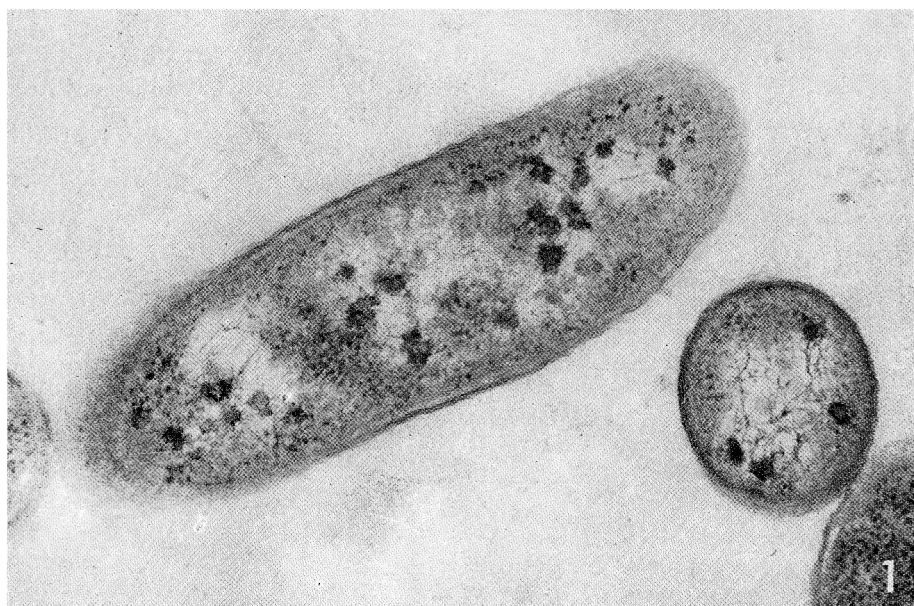
Fig. 2. *Phaseolus vulgaris*. A plasma rich cell from an 8 days old tumor from a primary leaf. The plastids on the proplastid stage, with scarce thylakoids and tubules on the periphery. 48,000 : 1.

Sl. 3. *Phaseolus vulgaris*. Plastidi iz 8 dana starog tumora na primarnom listu. Grana-tilakoidi i stroma-tilakoidi razvijeni. U stromi vidljivi su ribosomi i nakupina fitoferitina. 48 000 : 1.

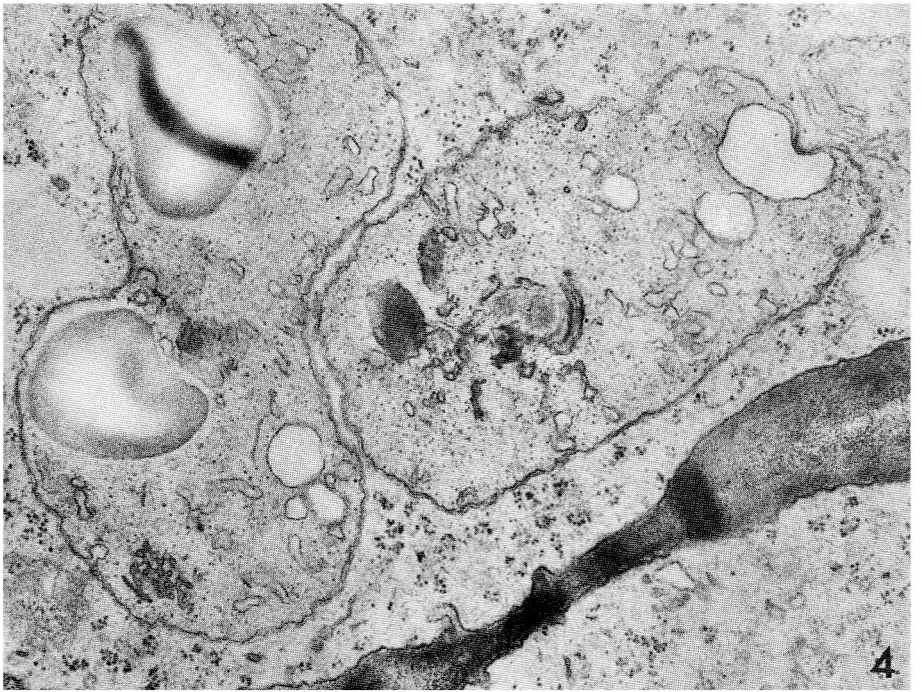
Fig. 3. *Phaseolus vulgaris*. Plastids from an 8 days old tumor from a primary leaf. Ribosomes and aggregates of phytoferritin are visible in the stroma. 48,000 : 1.

Sl. 4. *Phaseolus vulgaris*. Veliki plastidi s krupnim škrobnim zrcima i »vakuolama« iz 8 dana starog tumora na primarnom listu. Tilakoidni sistem vrlo je reduciran. 30 000 : 1.

Fig. 4. *Phaseolus vulgaris*. A large plastid with coarse starch grains and »vacuoles« from an 8 days old tumor from a primary leaf. The thylakoid system is very much reduced. 30,000 : 1.



Sl. 1—2. — Fig. 1—2.



Sl. 3-4.— Fig. 3-4.

Bakterijski soj B<sub>6</sub> pregledan je u elektronskom mikroskopu radi usporedbe s domaćim sojem. Nikakva bitna razlika nije primjećena.

Tijekom svih istraživanja nije bilo nikakvih znakova, pa ni indicija, o ev. prisutnosti bakteriofaga.

Uzroci prelaska glatkog S-oblika bakterijskih kolonija u hrapavi R-oblik kod soja I<sub>1-4</sub> nisu točno utvrđeni, no čini se da se R-oblik javlja kod manje virulentnih i sporije rastućih bakterijskih sojeva. U prilog tome govori i činjenica da su kod ponovnog izoliranja bakterija iz tumora, pri čemu je obnovljena virulentnost bakterija, dobiveni samo S-oblici kolonija.

Budući da niti jednu od brojnih uklopina iz stanica bakterijskih sojeva I<sub>1-4</sub> te soja B<sub>6</sub> nije bilo moguće okarakterizirati kao bakteriofag to se iz opisanih eksperimenata može zaključiti da bakteriofag ne bi mogao biti direktno odgovoran za tumorsku indukciju, iako se ta mogućnost ne može sa sigurnošću isključiti (Kurdjian 1968).

### *Crown-gall tumori na listu graha*

Tri dana nakon infekcije primarnih listova pojavljuju se na njima tumori, najprije poput malenih klorotičnih područja koja kroz daljnjih nekoliko dana izrastu u sitne svijetlozelene kvržice. Promjer najvećih tumora na listu graha iznosio je oko 3 mm. Nakon otprilike 3 tjedna list požuti dok jedino područja oko tumora zadrže zelenu boju.

Prezezi kroz tumorsko tkivo pokazuju u svjetlosnom mikroskopu uobičajenu sliku neorganiziranog tkiva s nepravilnim parenhimskim stanicama te neorganiziranim masama traheidalnih elemenata. Normalna struktura lista i njegova polarnost posve su izgubljene. U postanku tumora sudjeluju kako palisadne stanice tako i stanice spužvastog parenhima.

Istraživanja elektronskim mikroskopom pokazala su da kloroplasti stanica razvijenog primarnog lista prije infekcije redovito imaju potpuno razvijen tilakoidni sistem. Prezezi kroz živo tumorsko tkivo pokazuju odstupanja samo u finoj građi plastida, dok ostali stanični organeli nisu nikad pokazivali značajnije promjene. Tako su primijećeni plastidi u stadiju proplastida s vrlo malo tilakoida i grana (sl. 2) te plastidi sa slabo razvijenim tilakoidnim sistemom. U stromi plastida često su vidljivi ribosomi i fitoferitin (sl. 3). Osim spomenutih plastida primijećeni su još veliki plastidi s krupnim škrobnim zrcima i »vakuolama« te vrlo reduciranim tilakoidnim sistemom (sl. 4).

Kloroplasti su stanični organeli koji najočitije reagiraju na tumorsku transformaciju. Primjećene su promjene u smjeru dediferencijacije kloroplasta sve do proplastida, iako je iz slika prezeza teško utvrditi koji je razvojni stadij kojem prethodio. Premda su na kloroplastima iz tumorskog tkiva primjećene različite strukturne promjene, teško bi se moglo tvrditi da su one izravna posljedica tumorske indukcije. One mogu jednako biti posredna posljedica dediferencijacije stanica (proplastidi), ili možda nekih promjena u metabolizmu stanica. Međutim, plastidi bi kao indikator za procese diferencijacije i dediferencijacije biljne stanice mogli omogućiti praćenje najranijih stadija razvitka biljnih tumora.

## Zaključak

Istraživani su sojevi I<sub>1-4</sub> i B<sub>6</sub> bakterije *Agrobacterium tumefaciens* te praćen postanak tumora koje oni izazivaju na listovima domaćih sorta graha. Istraživanja su dala ove rezultate:

1) Prilikom ponovne izolacije bakterija soja I<sub>1-4</sub> iz primarnih tumora redovito se pojavljuje S-oblik kolonije. Mišljenje, da R-oblik kolonije kod nižih temperatura prelazi u S-oblik, nije moglo biti potvrđeno.

2) U bakterijskim stanicama sojeva I<sub>1-4</sub> te soja B<sub>6</sub> nije moglo biti dokazano prisustvo bakteriofaga.

3) Jedini stanični organeli, koji su u živim stanicama tumora pokazali upadljive ultrastrukturne promjene, bili su plastidi. Kod ostalih staničnih organela nisu mogle biti utvrđene neke značajnije promjene.

\*

Zahvaljujem dr Mercedes Wrischer i prof. dr Zvonimiru Devidéu na pomoći i savjetima pri radu.

## Literatura

- Beiderbeck, R., 1973: Blütenbildung an juvenilen Teratomen von Kalanchoe. Naturwiss. 60, 552.
- Bernearts, M. J. et J. De Ley, 1963: A biochemical test for crown-gall bacteria. Nature 197, 406.
- Gautheret, R. J., 1969: Les phénomènes tumoraux chez les végétaux. Ann. Inst. Pasteur — Lille 20, 1—28.
- Kurkdjian, A., 1968: Apparition de phages au cours de l'induction des tumeurs du crown-gall. J. Microscopie 7, 1039—1044.
- Manigault, P., 1967 a: La transformation tumorale chez les végétaux. Bull. Cancer Fr. 54, 137—148.
- Manigault, P., 1967 b: Les tumeurs des plantes. Path. Biol. 15, 1239—1247.
- Michel, M., Gras, M. et J. Homès, 1970: Le crown-gall. Bull. Nat. Belg. 51, 271—290.
- Stapp, C., 1958: Pflanzenpathogene Bakterien. Paul Parey, Berlin und Hamburg.

## SUMMARY

### CROWN-GALL TUMORS ON BEAN LEAVES INDUCED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* (I<sub>1-4</sub> and B<sub>6</sub>)

Marijana Krsnik Rasol

(Department of Physiology, Institute of Botany, University of Zagreb)

*Agrobacterium tumefaciens*, strains B<sub>6</sub> and I<sub>1-4</sub> and crown-gall tumors, which they induced on bean leaves, were investigated by means of light and electron microscopy. The results show:

1) When the bacteria of the strain I<sub>1-4</sub> are reisolated from primary tumors their colonies show the S-forms as a rule. The view, that at low temperatures the R-form changes to the S-form, cannot be confirmed.

2) In the cells of both strains of *Agrobacterium tumefaciens* it has never been possible to prove any signs of the presence of a bacteriophage.

3) In living tumor cells the only cell organelles, which showed considerable ultrastructural changes, were the plastids. In other cell organelles no ultrastructural changes could be stated with certainty.

Marijana Krsnik-Rasol, mr biol.  
Odjel za fiziologiju Instituta za botaniku  
Sveučilišta u Zagrebu  
Rooseveltov trg 6/III, p. p. 933  
41001 Zagreb (Jugoslavija)