

EFEITO MUTAGÊNICO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE UMA CEPA SELVAGEM DE *Agrobacterium tumefaciens* E CARACTERIZAÇÃO DE TUMORES DE FUMO (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi)

FERREIRA, Adriana; T, COSTA, Fernando; L.. C. da & PETERS José; A.

UFPEL/FAEM - Dept° de Botânica e Genética, Campus Universitário - Caixa Postal, 354 - CEP 96010-900
Tel. (0532) 757316 - Pelotas/RS - Brasil.
Recebido para publicação em (08/05/97)

RESUMO

Alterações no sistema agrobacteria podem afeta a infectividade e o processo de transferência gênica. O efeito da irradiação (70; 140 e 210Gy) na concentração de *Agrobacterium tumefaciens* é notado principalmente à 210Gy. A fase exponencial de crescimento da bactéria controle e das irradiadas com 70; 140 e 210Gy ocorreu, respectivamente, após 17; 18; 20 e 37h de crescimento. Estas doses não foram suficientes para impedir o crescimento ou serem letais para a bactéria e esta, quando exposta a 210Gy se tornou ainda mais danosa às plantas de fumo, acelerou a formação do tumor e a morte da planta. As doses de 70 e 140Gy aplicadas ao tumor em plantas de fumo *in vitro* não impediram o desenvolvimento do mesmo ou da bactéria.

Palavras-Chave: *Agrobacterium tumefaciens*, radiação gama, mutação.

ABSTRACT

MUTAGENIC EFFECT OF GAMMA-RADIATION ON A WILD STRAIN OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* AND CHARACTERIZATION OF TOBACCO TUMORS (*NICOTIANA TABACUM* L. VAR. XANTHI). It is well known that any change in the *Agrobacterium* system modifies the infectivity and the gene transfer process. The effect of radiation (70; 140 and 210Gy) on the concentration of *Agrobacterium tumefaciens* is especially noticed at 210Gy. The exponential growth phase of the control bacteria and of those irradiated at 70; 140 or 210Gy occurred, respectively, after 17; 18; 20 and 37 hours of growing. However those radiation levels were not enough to cease growth or to become lethal to the bacteria. Besides it the bacteria exposed to the highest level of radiation became more harmful to the tobacco plant. The high level radiation treatment (210Gy) accelerated the tumor development and the death of the plant. The levels of 70 and 140Gy when applied to the tumor of tobacco plants *in vitro* did not prevent the development of the tumor or the bacteria

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, gamma radiation, mutation.

INTRODUÇÃO

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria aeróbica gram negativa, fitopatogênica de solo, pertencente a família das Rhizobiaceae. É o agente causal da doença conhecida como galha da coroa (*crown gall*).

Existe uma grande diferença de susceptibilidade entre os hospedeiros. A maioria das monocotiledôneas e gimnospermas não é suscetível a este vetor. Essa técnica tem sido utilizada para obtenção de plantas transgênicas via introdução de genes desejáveis, especialmente em plantas dicotiledôneas.

Os tumores, após inoculação com *A. tumefaciens*, são o resultado da expressão de genes (oncogenes) localizados na região de transferência dos plasmídeos das cepas virulentas, que são transferidos para a célula vegetal. Os determinantes da virulência de *A. tumefaciens* residem em um grande plasmídeo indutor de tumor (Ti). Este plasmídeo carrega duas regiões essenciais a indução, nomeados região T e vir. Durante a infecção a região T é transferida para a célula da planta, onde se torna estavelmente integrada no cromossomo hospedeiro como T-DNA (*transferred DNA*). Este codifica para enzimas envolvidas na biossíntese dos hormônios vegetais auxina e citocinina que induzem uma multiplicação desordenada das células, originando o tumor ou galha e a síntese de derivados de aminoácidos específicos chamados opinas. As cepas de *Agrobacterium* são classificadas de acordo com o tipo de opinas produzidas. A região vir contém genes que são expressos na bactéria e são requeridos para a transferência do T-DNA para as células das plantas e vários outros genes que afetam a eficiência desta transferência e os respectivos hospedeiros. Genes vir de *A. tumefaciens* indutora de tumor estão sob controle

de dois componentes do sistema regulatório virA e virG. Em resposta aos fatores ambientais (compostos fenólicos, açúcares, pH) a proteína virA fosforila virG, que interage com os promotores de outros genes vir, causando a indução. Qualquer alteração nesse sistema já foi reportado alterar a infectividade da bactéria e a habilidade de ativar a transcrição dos genes vir. Segundo GUBBA *et al.* (1995) essas diferenças podem acontecer devido ao número de cópias do plasmídeo.

Mutação de virG (virGN54D) causa expressão constitutiva de outros genes vir independentes de virA. Segundo HANSEN *et al.* (1994), plantas de fumo e algodão tiveram a eficiência de transformação acelerada quando a cepa bacteriana continha o virGN54D mutado. A expressão dos genes de virulência é controlada por um sistema indutor da planta. A proteína virD2 guia o T-DNA durante a transferência para o núcleo da célula da planta e, segundo TINLAND *et al.* (1995), quando mutada, essa integração pode ser alterada, reduzindo a eficiência da transferência; mas a eficiência da integração do T-DNA *per se* não é afetada. Southern e análise dos eventos de integração obtidos com a proteína virD2 mutada revelaram um modelo aberrante de integração, indicando que o tipo selvagem de proteína virD2 participa na ligação do final 5' do fita T ao DNA da planta e que esta ligação não é limitante para a integração do T-DNA.

O operon virB, com onze produtos gênicos, forma um complexo poro transmembranar através do qual o T-DNA é exportado. Alteração da topologia de virB10 tem papel crucial na transferência do T-DNA para a célula da planta, perturbando a associação membranar. Estudos de extração de uréia sugeriram que a localização da membrana deve ser resultado de uma associação periférica, entretanto, a proteína mutante foi encontrada em ambos, no interior e exterior da membrana, quando separadas por gradiente de densidade de sacarose. Segundo FINBERG *et al.* (1995), as associações observadas de virB9, virB10 e virB11 no fracionamento das membranas suportam o fato de que essas proteínas devem existir como componentes de complexos poros multiproteicos, talvez se estendendo nas membranas internas e externas das células de *Agrobacterium*. Em ensaios de tumorigenicidade, mutantes de virB1 delta exibiram virulência severamente atenuada e mutantes de virB2 delta até virB11 delta exibiram avirulência. Segundo Berger *et al.* (1994), virB1 é um acessório determinante de virulência e virB2 até virB11 são absolutamente essenciais para o processo de infecção de *A. tumefaciens*.

Os genes de virulência são regulados positiva e negativamente. Os produtos dos genes dos operons virC e virD exercem um papel importante na especificidade do hospedeiro e no processamento do T-DNA. Estes operons são transcritos em direções opostas e por essa razão carregam promotores

orientados completamente opostos. Estes promotores são regulados positivamente pela proteína virG, a qual é ativada através da fosforilação por uma histidina quinase codificada pelo gene virA. Os operons virC e virD são também regulados por uma proteína repressora de 15,5-kDa codificada pelo gene cromossomal *ros*. Segundo D'SOUZA-AUT *et al.* (1993), mutação nesse gene causa a expressão constitutiva de virC e virD na completa ausência da proteína virG. Parece que o repressor *ros* interage com a região reguladora destes operons. Isto sugere que a transcrição de virC e virD é modulada pelas proteínas *ros* e virG.

Regiões vir de diferentes plasmídeos Ti devem variar nos genes que contêm o gene virF, que está presente em plasmídeos Ti de octopina e ausente nos de nopalina. Mutação de virF induz uma diminuição da virulência das cepas octopina em tomate e *Nicotiana glauca*. Cepas nopalina são fortemente atenuadas em *N. glauca* comparadas com cepas octopina devido a ausência do gene de virulência virF. O produto do gene virF deve ser transferido e ser ativo nas células vegetais. REGENSBURG-TUINK *et al.* (1993), isolaram plantas transgênicas de *N. glauca*, nas quais virF codifica seqüências expressas usando o promotor 35SCaMV. A presença da proteína virF converte o não hospedeiro *N. glauca* em um hospedeiro e *A. tumefaciens* cepas nopalina e mutantes de octopina virF originam a formação de tumor. Isto indica que certos produtos dos genes de virulência como a proteína virF devem ser transferidos para as células da planta durante a indução do tumor, onde eles agem como mediadores da transferência do T-DNA.

O promotor da nopalina sintase (*nos*) é expresso em uma gama de tipos de células vegetais e regulada por vários fatores de desenvolvimento e ambientais. A região *upstream*, essencial a esta regulação, foi estudada através de oligômeros sintéticos usando sistemas de transformação transiente e estável. Inserção de uma seqüência de 20 nucleotídeos contendo dois hexâmeros dominantes e uma região *spacer* nos mutantes desprovidos da região *upstream* era essencial para a atividade promotora. Mutações de um ou mais nucleotídeos de qualquer dos hexâmeros alteraram significativamente o poder de expressão do promotor *nos*. Mutações de ponto na região *spacer* também influenciam fortemente a expressão do promotor. Inserção de múltiplas cópias de uma seqüência de 20 nucleotídeos nos mutantes com deleções não funcionais aumentaram proporcionalmente a atividade promotora. Isto sugere, que a seqüência de nucleotídeos é essencial para o funcionamento do promotor *nos*. Segundo CHO *et al.* (1993), alterações na proteína OccR e no promotor de OccR provocadas por mutações fazem com que a proteína detecte concentrações muito menores de octopina que as proteínas selvagens. Segundo LAPOINTE *et al.* (1992), cepas de *A. tumefaciens* tipo nopalina são mutantes

espontâneos que também catabolizam manopina, ou seja, adquirem um novo potencial catabólico independente da presença do plasmídeo Ti.

A maioria dos genes *vir* de *Agrobacterium* que são requeridos para tumorigenicidade da bactéria, são expressos em resposta aos compostos fenólicos da planta. A indução de *vir* é acelerada marcadamente pelos monossacarídeos específicos. Sinais produzidos por ambos tipos de compostos são transcritos nas células de *Agrobacterium* via proteína *virA*.

A proteína *chvE* age acelerando a indução de *vir* por monossacarídeos. Segundo MANTIS *et al.* (1993), o *open reading frame* *chvI* mutado, quando a bactéria era crescida em meio desprovido de fosfato apresentava uma atividade fosfatase e a expressão de *virG* normais. Entretanto, era incapaz de crescer em meio contendo tripton, pepton ou caseína e, também foi mais sensível que o tipo selvagem ao pH ácido extracelular. Este mutante foi avirulento em *Kalanchoe diargremontiana* e foi severamente atenuada a expressão do gene *vir*. O crescimento dos mutantes *chvI* foram inibidos pelos compostos do fermento, sugerindo que a avirulência deve ser devido, em parte, à inabilidade destes mutantes sobreviverem no ambiente do fermento.

WIRAWAN *et al.* (1993) isolaram um mutante (cepa B119) de *A. tumefaciens* com uma mutação no transposon (Tn5) cromossomal. O mutante exibiu crescimento padrão em agar e em meio mínimo (LB) semelhante àqueles das cepas originárias (cepas A208 com plasmídeo do tipo nopalina). O mutante foi avirulento em *Daucus carota*, *Cucumis sativus*, e *kalanchoe diargremontiana* e não foi prejudicado na habilidade de infectar células de cenoura.

Segundo LINCOLN *et al.* (1992), plantas de *Arabidopsis* mutadas insensíveis a hormônios mostram uma resposta atenuada em presença de *Agrobacterium*, alterando a frequência de formação e o tamanho do tumor.

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* originalmente hipersensitivos à irradiação foram testados para a habilidade de serem transformados através de *Agrobacterium*. Um dos quatro mutantes hipersensitivos à UV e um dos dois mutantes gama hipersensitivos testados mostraram significativa redução na frequência de transformantes estáveis, quando comparado com controles radioresistentes. Em um ensaio transiente independente da integração genômica, ambas linhas mutantes expressaram o T-DNA tão eficientemente quanto as linhas parentais. Estas linhas foram deficientes especificamente à integrações estáveis, logo, a hipersensitividade a radiação sugere uma deficiência no reparo de danos do DNA.

O fumo é um hospedeiro amplamente utilizado em estudos de virulência de cepas selvagens ou mutantes de *Agrobacterium*. Dentre os mutagênicos físicos, encontram-se as radiações ionizantes, que são radiações eletromagnéticas que produzem ionizações no meio em que incidem (HABER, 1968). Os raios gama são um tipo de radiação ionizante utilizados para experimentos biológicos e, são geralmente emitidos a partir de radioisótopos como Co^{60} e Cs^{137} (HOWLAND & HART, 1977). As vantagens da utilização de mutagênicos físicos são a precisa dosimetria com repetibilidade; alta e uniforme penetrabilidade nos sistemas celulares, especialmente no caso de raios-X, gama e neutrons.

Como tecidos propensos à tumores são altamente sensíveis a influências ambientais, incluindo irradiação, é muito difícil obter uma mutação em tumores imaturos. Além disso, segundo AHUJA (1996), o tratamento com radiação poderia acelerar a formação do tumor ou induzir variação na expressão do mesmo. Em consequência disto, o presente trabalho visa verificar as alterações decorrentes de mutações induzidas em *A. tumefaciens* pela radiação gama, bem como as alterações na taxa de sobrevivência de plantas de *N. tabacum* L. var. *Xanthi* tumorogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa bacteriana

Foi utilizada uma cepa selvagem (R10) de *A. tumefaciens*, LBA4404. Foram feitas curvas de crescimento padrão da *A. tumefaciens* selvagem e das irradiadas utilizando 80µl de bactéria em suspensão, crescidas em 20ml de meio LB (pH 7.0). As leituras em espectrofotômetro foram feitas de hora em hora, durante 25 (não irradiada; 70 e 140Gy) e 35h (210Gy).

Material botânico

Foram utilizadas plantas de *Nicotiana tabacum* L. var. *Xanthi*, crescidas *in vitro* com aproximadamente 15-20 dias, sob condições controladas de luz e temperatura.

METODOLOGIA

Obtenção das plantas de fumo *in vitro*

Plantas de *N. tabacum* foram mantidas *in vitro*, pela cultura de segmentos nodais, em meio contendo os sais minerais de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas, 3% de sacarose, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol e 7.5 g.l⁻¹ de ágar. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de crescimento, a 24±1°C, 16h de fotoperíodo e 3000 lux de intensidade luminosa.

Cultivo da bactéria

A cultura foi crescida em meio líquido LB (5 g.l⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.l⁻¹ de triptona, 10 g.l⁻¹ de NaCl e pH 7.0), acrescido de 50mg.ml⁻¹ de Rifampicina e 100mg.ml⁻¹ de Streptomina *overnight* sob agitação, à 26-28°C. Após aproximadamente 17h, utilizando-se alça de platina foi efetuado o plaqueamento asséptico da bactéria, em mesmo meio, porém, sólido (15g.l⁻¹ de ágar).

Obtenção dos tumores

Foram efetuados ferimentos superficiais com lâminas de bisturi estéreis em diferentes partes das plantas mantidas *in vitro* para posterior inoculação de aproximadamente 5µl da cultura bacteriana crescida após 17h, quando a leitura espectrofotométrica era de aproximadamente 1,0.

Irradiação

O processo de irradiação foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas - UFPel. Foi utilizado como fonte de Co⁶⁰ o equipamento Eldorado 78 do Centro Regional de Oncologia da Faculdade de Medicina. As doses utilizadas foram de 70, 140 e 210Gy (Df sup. 55cm = R:120,76 cGy.min⁻¹).

Obtenção dos tumores *in vitro*

As plantas de fumo var. Xanthi foram irradiadas com Co⁶⁰ nas doses de 70 e 140Gy após 30 dias de infecção com a bactéria.

Irradiação da bactéria

A bactéria *A. tumefaciens*, LBA4404, foi irradiada em placas de petri, nas doses de 70, 140 e 210Gy dois dias após o plaqueamento.

Processo de desenvolvimento dos tumores

Os tumores foram mantidos em meio MS, sem reguladores de crescimento contendo 100mg.l⁻¹ de cefotaxima, para eliminação da agrobactéria residual, evitando assim contaminação do meio de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, pode-se observar as curvas de crescimento diferenciais para os quatro tratamentos, realizadas a partir de leituras em espectrofotômetro, a 600nm. A fase exponencial de crescimento para a bactéria controle se manteve entre 17 e 19h e DO entre 0,9 e 1,5. A densidade ótica (DO₆₀₀) de aproximadamente 1,0 indica uma concentração celular de aproximadamente 10⁸ células.ml⁻¹. Sendo esta a

concentração ideal para inoculação da bactéria. Para estes mesmos valores de DO as bactérias irradiadas à 70, 140 e 210Gy tiveram a faixa exponencial de crescimento entre 18 e 20h; 19 e 22h; e 25 e 29h, respectivamente. Em uma curva de crescimento bacteriana normal, em uma fase anterior a esta as bactérias se apresentariam em fase de latência e transição. E a partir dessa fase, quando o meio se esgota, o crescimento cessaria. As leituras foram feitas até 33h após inoculação.

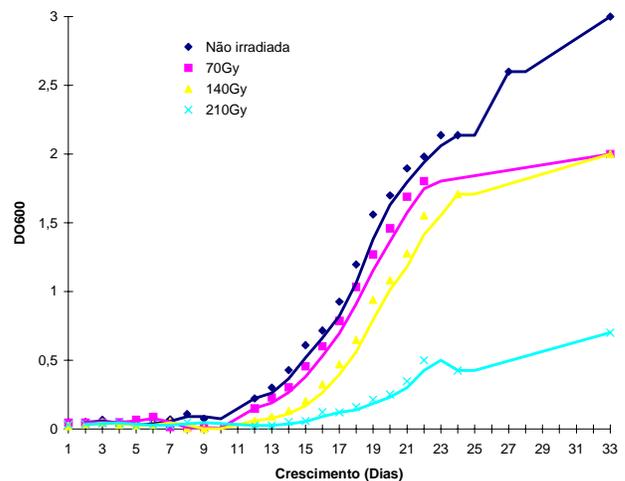


Figura 1 - Efeito das diferentes doses de radiação com Co⁶⁰ sobre o crescimento de *A. tumefaciens*, LBA4404.

A Figura 2, mostra as plantas de fumo, 60 dias após a inoculação com os respectivos tratamentos.

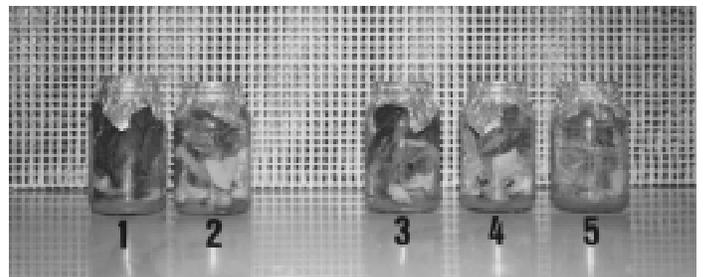


Figura 2 - Plantas de fumo cultivadas *in vitro* (60 dias após a inoculação), irradiadas com Co⁶⁰ ou não (1: controle não infectado; 2: planta infectada com bactéria não irradiada; 3; 4; 5: plantas de fumo infectadas com as bactérias irradiadas à 70; 140 e 210Gy, respectivamente).

Sendo que após 90 dias de inoculação com uma bactéria selvagem (Figura 3), as plantas de fumo controle tornaram-se completamente cloróticas e morreram.



Figura 3 - (a): Planta de fumo após 90 dias de infecção com *A. tumefaciens*, LBA4404 não irradiada e (b): Plantas com tumores irradiadas à 70 e 140Gy, respectivamente.

As doses de irradiação aplicadas não foram letais a bactéria. Ocorreram alterações na infectividade e como citado anteriormente o tratamento com irradiação acelerou a formação de tumor.

As plantas com tumores irradiadas, tiveram o processo de letalidade das plantas retardado, quando comparados com uma planta tumorogênica normal (Fig.3), não afetando o crescimento da bactéria. Alterações devem ter ocorrido à nível de metabolismo da planta, que tiveram seu desenvolvimento alterado após a irradiação.

CONCLUSÕES

Mutações ocorridas no plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens* alteram o crescimento e a infectividade da mesma. Doses de até 210Gy de Co^{60} não são letais à bactéria e aceleram a formação de tumor e as plantas tumorogênicas quando irradiadas, mostram retardamento no processo de letalidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Altair Delfino da Rocha Faes - supervisor em radioproteção, quem colaborou na irradiação do material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, M.R. Genetic nature of a nontumour mutant isolated from tumour-prone amphidiploid *Nicotiana glauca-langsdorffii* (GGLL): a critical assessment. **Heredity**. Apr 1996. v. 76 (pt.4) p. 335-345.
- Berger, B.R.; Christie, P.J. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. **J. Bacteriol.** June 1994. v. 176 (12) p. 3646-3660.
- Cho, K.; Winans, S.C. Altered-function mutations in the *Agrobacterium tumefaciens* OccR protein and in an OccR-regulated promoter. **J. Bacteriol.** Dec 1993. v. 175 (23) p. 7715-7719.
- D'Souza-Ault, M.R.; Cooley, M.B.; Kado, C.I. Analysis of the Ros repressor of *Agrobacterium* virC and virD operons: molecular intercommunication between plasmid and chromosomal genes. **J. Bacteriol.** June 1993. v. 175 (11) p. 3486-3490.
- Finberg, K.E.; Muth, T.R.; Young, S.P.; Maken, J.B.; Heitritter, S.M.; Binns, A.N.; Banta, L.M. Interactions of VirB9, -10, and -11 with the membrane fraction of *Agrobacterium tumefaciens*: solubility studies provide evidence for tight associations. **J. Bacteriol.** Sept 1995. v. 177 (17) p. 4881-4889.
- Gubba, S.; Xie, Y.H.; Das, A. Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene expression: isolation of a mutation that restores virGD52E function. **Mol Plant Microb Interact.** Sept/Oct 1995. v. 8 (5) p. 788-791.
- Haber, A.H. Ionizing radiation as research tools. **Annual Review of Plant Physiology**. 1968. v.19 p.463-89.
- Hansen, G.; Das, A.; Chilton, M.D. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. **Proc Natl Acad Sci USA**. Aug 2, 1994. v. 91 (16) p. 7603-7607.
- Howland, G.P.; Hart, R.W. Radiation biology of cultured plant cells. In: Reinert, J.; BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. 1977. p. 265-90.
- Kim, Y.; Buckley, K.; Costa, M.A.; An, G. A 20 nucleotide upstream element is essential for the nopaline synthase (nos) promoter activity. **Plant Mol Biol.** Jan 1994. v. 24 (1) p. 105-117.
- LaPointe, G.; Nautiyal, C.S.; Chilton, W.S.; Farrand, S.K.; Dion, P. Spontaneous mutation conferring the ability to catabolize mannopine in *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Bacteriol.** Apr 1992. v. 174 (8) p. 2631-2639.

- Lincoln, C.; Turner, J.; Estelle, M. Hormone-resistant mutants of *Arabidopsis* have an attenuated response to *Agrobacterium* strains. **Plant Physiol.** Mar 1992. v. 98 (3) p. 979-983.
- Mantis, N.J.; Winans, S.C. The chromosomal response regulatory gene *chv1* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli* *phoB* mutation and is required for virulence. **J. Bacteriol.** Oct 1993. v. 175 (20) p. 6626-6636.
- Regensburg Tuink, A.J.G.; Hooykaas, P.J.J. Transgenic *N. glauca* plants expressing bacterial virulence gene *virF* are converted into hosts for nopaline strains of *A. tumefaciens*. **Nature.** May 6, 1993. v. 363 (6424) p. 69-71.
- Sonti, R.V.; Chiurazzi, M.; Wong, D.; Davies, C.S.; Harlow, G.R.; Mount, D.W.; Signer, E.R. Arabidopsis mutants deficient in T-DNA integration. **Proc Natl Acad Sci USA.** Dec 5, 1995. v. 92 (25) p. 11786-11790.
- Tinland, B.; Schoumacher, F.; Gloeckler, V.; Bravo Angel, A.M.; Hohn, B. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. **EMBO J.** July 17, 1995. v. 14 (14) p. 3585-3595.
- Wirawan, I.G.P.; Kang, H.W.; Kojima, M. Isolation and characterization of a new chromosomal virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Bacteriol.** May 1993. v. 175 (10) p. 3208-3212.