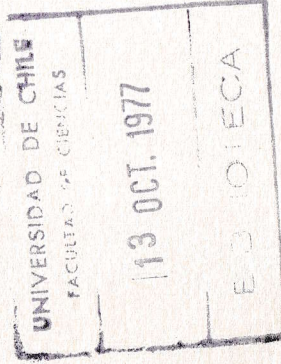


UCH-FC
LIC-B
T 323
C-1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

*CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE ACERASACARUM
XIPHIUM AISLADO DE HILAZOS EN CHILE Y SU
CONTROL BIOLÓGICO CON ACERASACARUM MEXICANUM
SASA 04P.



Informe del Semestre de Investigación
para optar al grado de Licenciado en
Ciencias con mención en BIOLOGIA.

Profesor Guía

Demetrio Latorte G.

ATA IREIA TERESA CARRAJAL

Santiago - Chile

1977

A mi esposo y mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la valiosa tutoría del presente trabajo al profesor de la U. de Chile Ingeniero Agrónomo Dr. Bernardo Latorre, así como la colaboración de la Srta. Cecilia Urbina, Ingeniero Agrónomo de la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

En igual forma a los profesores del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Sres. Luis Corcuera y Hermann Mühlhauser por sus sugerencias y observaciones en la redacción y lectura del texto.

A la División de Aplicaciones de la Comisión Chilena de Energía Nuclear y al Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile como instituciones que me hicieron posible la realización de este trabajo.

Y finalmente a todas las personas que de una u otra forma están comprometidas en este estudio en especial al personal del Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la U. de Chile por su cooperación y estímulos en los seis meses de esta investigación.

| | |
|-----|--|
| 19 | <u>A. tumefaciens</u> |
| | <u>A. radiobacter</u> raza 84 sobre |
| | inhibitorio del crecimiento de |
| | Determinación <u>in vitro</u> del efecto |
| 19 | navavilla |
| | Determinación de la patogenicidad en |
| 19 | Determinación de la actividad enzimática |
| 17 | Utilización de carbohidratos |
| 17 | caracterización fisiológica |
| 14 | Medios de cultivo utilizados |
| 14 | Bacterias utilizadas |
| 14 | MATERIALES Y METODOS |
| 9 | Hipótesis de la formación del tumor |
| 8 | control biológico |
| 7 | Características fisiológicas |
| 7 | Características morfológicas |
| 7 | Organismo causal |
| 5 | Ciclo de la enfermedad |
| 5 | ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS |
| 3 | RESUMEN |
| 1 | INTRODUCCION |
| VII | LISTA DE FIGURAS |
| VI | LISTA DE TABLAS |
| IV | INDICE |
| III | AGRADECIMIENTOS |

Págs.

| | pág. |
|---|------|
| Determinación del control biológico de Ar84 sobre Atc y Atv en invernadero. | 20 |
| RESULTADOS | 21 |
| Utilización de carbohidratos | 21 |
| Actividad enzimática | 21 |
| Patogenicidad de <u>A. tumefaciens</u> en plantas de maravilla | 25 |
| Efecto inhibitorio del crecimiento de Ar84 sobre Atc y Atv <u>in vitro</u> . | 25 |
| Control biológico de Ar84 sobre Atc y Atv en plantas de maravilla | 28 |
| DISCUSION | 31 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 34 |

LISTA DE TABLAS

| TABLA | Pág. |
|--|------|
| 1. Cultivos de <i>Agrobacterium</i> usados. | 16 |
| 2. Utilización de carbohidratos por <u><i>Agrobacterium tumefaciens</i></u> y <u><i>Agrobacterium radiobacter</i></u> raza 84 | 22 |
| 3. Actividad enzimática de <u><i>Agrobacterium tumefaciens</i></u> y de <u><i>Agrobacterium radiobacter</i></u> | 23 |
| 4. Determinación de la patogenicidad de <u><i>Agrobacterium tumefaciens</i></u> y <u><i>Agrobacterium radiobacter</i></u> en plantas de maravilla. | 26 |
| 5. Reducción de la formación de agallas en plantas de maravilla a través de <u><i>A. radiobacter</i></u> raza 84 (Ar84) especie no patógena. | 29 |

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | | Pág |
|--------|---|-----|
| 1 | Zona de inhibición del crecimiento de <u>Agrobacterium tumefaciens</u> sembrada alrededor de <u>Agrobacterium radiobacter</u> raza 84 | 27 |
| 2 | Control de la formación de tumores en plantas de maravilla inoculadas con mezclas de <u>Agrobacterium tumefaciens</u> y <u>Agrobacterium radiobacter</u> raza 84 (Ar84) | 30 |

INTRODUCCION

La enfermedad conocida como "agalla del cuello" se caracteriza por la formación de tumores que afecta a la mayoría de las plantas dicotiledóneas. Se debe a la acción del bacterio Agrobacterium tumefaciens (Smith y Townsed) Conn. La enfermedad se observó por primera vez en la base de los tallos de Chrysanthemum, identificándose al organismo causal como Pseudomonas tumefaciens. Posteriormente se le denominó Erwinia tumefaciens, y finalmente Conn lo describió como Agrobacterium tumefaciens. Esta especie se ha encontrado de preferencia en zonas con climas templados. (New y Kerr, 1972).

Es posible controlar biológicamente la enfermedad con Agrobacterium radiobacter raza 84 que es una especie no patógena (New y Kerr, 1972; Kerr y Htay, 1974; Roberts y Kerr, 1974; Moller y Schroth, 1976). Este control se llevaría a efecto por medio de una bacteriocina elaborada por A. radiobacter.

Los objetivos de la presente investigación fueron los siguientes:

- caracterizar e identificar el bacterio que provoca "agalla del cuello" en Chile. En nuestro país aún no se ha realizado un estudio claro y definitivo de este microorganismo. Con este propósito se consideró preciso efectuar comparaciones fisiológicas entre el bacterio chileno proveniente de Viluco con Agrobacterium tumefaciens procedente de California EE.UU. y Agrobacterium radiobacter de Australia.

- determinar la posibilidad de aplicar un control biológico a la cepa chilena que causa "agalla de cuello" con la especie no patógena Agrobacterium radiobacter.

R E S U M E N

En el presente trabajo se realizaron comparaciones fisiológicas entre el bacterio fitopatogénico que en Chile provoca "agalla del cuello" (Atv), Agrobacterium tumefaciens aislado en California (Atc) y Agrobacterium radiobacter 84 (Ar84), proveniente de Australia, con el fin de verificar y caracterizar a la cepa chilena. En cuanto a la utilización de carbohidratos, realizada según el método de Hugh y Leifson (1953), se demostró que no hay diferencias significativas entre los cultivos de Atc, Atv y Ar84. Todas produjeron ácido a partir de los carbohidratos estudiados sin formación de gas.

Referente a las actividades enzimáticas de estas tres cepas, se demostró que el bacterio aislado en Chile (Atv) tiene iguales actividades enzimáticas que el aislado en California (Atc), excepto que sólo Atv mostró actividad de gelatinasa y arginina dehidrolasa. A. radiobacter raza 84 fue la única cepa que no formó 3-cetolactosa a partir de un medio lactosado. Esto contradice lo establecido por la literatura, ya que la formación de 3-cetolactosa en un medio con lactosa es característica del género Agrobacterium.

Con el propósito de estudiar la posibilidad de aplicar un control biológico a la enfermedad con Ar84 se estudió el efecto en el crecimiento que provoca A. radiobacter raza 84 sobre Atc y Atv empleando el método de Stonier

(1960) con ligeras modificaciones, lográndose detectar in vitro las zonas de inhibición del crecimiento de Atv y Atc sembradas alrededor de Ar84. Con este mismo fin se incluyó en este trabajo un estudio para verificar el control biológico en invernadero con plantas de manavilla heridas con un bisturí estéril e inoculadas con mezclas de Ar84 y Atv ó Ar84 y Atc. El 70% de las plantas inoculadas con Atv ó Atc desarrollaron agallas; sin embargo cuando, además del bacterio patógeno, se agregó V. radio bacter raza 84 sólo el 5-10% de las plantas desarrollaron tumores. Por lo tanto, sería posible controlar biológicamente esta enfermedad.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

La enfermedad conocida como "agalla del cuello" se caracteriza por un crecimiento celular anormal, dando lugar a tumores que varían en forma y tamaño, los cuales corresponden a una hiperplasia e hipertrofia de los tejidos afectados (Walker, 1969). Las agallas pueden tener una consistencia relativamente blanda en un comienzo de la enfermedad, pero en estados avanzados el tejido se lignifica (Lippincott y Heberlein, 1965). Comúnmente, afecta la zona del cuello y el sistema radicular de un gran número de especies dicotiledóneas, entre las que se incluyen árboles frutales: durazneros, ciruelos, manzanos, damascos; cultivos hortícolas como: tomates; cultivos industriales entre los que se incluyen: maravilla, remolacha azucarera y raps (Moller y Scroth, 1976).

Ciclo de la enfermedad. El organismo causante de la enfermedad es un habitante del suelo, y en ausencia de plantas hospedantes tiene un comportamiento saprófito (Walker, 1969). Puede atacar a la planta en cualquier época de su desarrollo, para lo cual es esencial la presencia de heridas (Lippincott y Lippincott, 1969). Una vez que la bacteria ha penetrado en la herida, es trasladada a corta distancia por el líquido intercelular. Alrededor del lugar donde la bacteria está presente ocurre una rápida división celular seguida de hiperplasia e hipertrofia, dando lugar así a la formación del tumor. (Walker, 1969).

White (1954) demostró que en maravilla (Helianthus annuus), es posible que después de cuatro a seis semanas de la formación del tumor primario, es decir, el que se desarrolló en la herida por la penetración de la bacteria, aparezcan tumores secundarios (en sitios alejados del primario) de los cuales ya no es posible aislar la bacteria. Esto estaría indicando que la presencia de la bacteria es necesaria para la infección, pero no para el posterior desarrollo de la enfermedad.

Otro comportamiento posible en la propagación de la enfermedad es el que determinó Miller (1975) en Chrysanthemum, en el sentido que la bacteria sube y baja por los tallos desde el sitio original de la infección, formándose tumores secundarios en los que está presente el patógeno. En este caso la enfermedad tiene carácter sistémico.

La dispersión de la enfermedad a corta distancia ocurre, por ejemplo a través de aguas de riego, labores de cultivo; mientras la propagación a larga distancia la produce el hombre por medio de la comercialización de plantas enfermas (Walker, 1969).

Favorecen la penetración de microorganismos y por consiguiente el desarrollo de esta enfermedad labores de cultivo tales como araduras, trasplantes y otros (Scroth et al. 1971). Secundariamente, los nemátodos patógenos y algunos insectos del suelo favorecen el desarrollo de agallas al producir heridas en el sistema radicular de las plantas dejándolas así predispuestas a la infección (Phanvantari et al., 1975).

Organismo causal

Características morfológicas: Agrobacterium tumefaciens corresponde a un microorganismo de forma bacilar de

0,7 - 0,8 x 2,3 - 3 micrones. Carece de cápsula móvil de

bidio a la acción de flagelos peritricos (Walker, 1969).

En agar nutritivo (agar 523) forma colonias pequeñas, pla-

nas, cremosas, circulares, lisas, brillantes y con bordes

enteros (Kado et al., 1972).

El DNA de A. tumefaciens varía entre $10^6 - 10^8$ dal-

tons (Kado et al., 1972). El porcentaje Guanina-citosina

fluctúa entre 59,5% y 62,8%, con una temperatura media de

derretimiento (Tm) entre 93,8 C y 95,1 C (De Ley et al.,

1966).

Características fisiológicas: Dentro de las posibles fuer-

tes de carbono utilizadas por A. tumefaciens se nombra a:

glucosa, fructosa, arabinosa, galactosa, manitol y salici-

lina (Breed, 1957). A partir de estos carbohidratos produ-

ce ácido pero sin formación de gas.

Se caracteriza además, por presentar actividad enzimá-

tica (Kado et al., 1972) correspondiente a:

- citocromo oxidasa, enzima que cataliza la oxidación

del citocromo reducido por el oxígeno molecular;

- catalasa, enzima responsable de degradar el peroxi-

do de hidrógeno (H_2O_2) con la liberación de oxígeno

- nitrato reductasa, flavoproteína que cataliza la re-

ducción de nitrato a nitrato;

- ureasa, enzima encargada de catalizar la hidrólisis

de la urea a amoníaco (NH_3) y anhídrido carbónico

(CO_2).

no patógenas son insensibles a la bacteriocina.
bacteriocina y la patogenicidad de A. tumefaciens; razas

Existe una gran correlación entre sensibilidad a la

misma especie o de especies relacionadas.

ciés y razas bacterianas que son activas contra razas de la
a una proteína bacterial que es producida por ciertas espe-
De acuerdo con Vidaver (1976), bacteriocina corresponde

Moller y Schroth, 1976; Moller según Kado, 1976).

una bacteriocina producida por A. radiobacter (Kerr, 1969);

no de control biológico operaría a través de la acción de

De acuerdo con los resultados de estos estudios el mecanis-

caamente con la especie no patógena A. radiobacter raza 84.

causadas por A. tumefaciens pueden ser controladas biológi-

Control biológico. Estudios han demostrado que las agallas

usuales de azúcares (Benedict, Fehling).

ción en un medio con 1% de lactosa empleando los reactivos

ducción de 3-cetolactosa después de 24 a 48 horas de incuba

naerts y de Ley, 1963). En A. tumefaciens se observa la pro

de 3-cetoglicósido desde el correspondiente disacárido (Ber-

El género Agrobacterium se caracteriza por la producción

cultativo (Walker, 1969).

nes, es decir presenta un metabolismo de tipo anaerobio fa

el oxígeno o un compuesto orgánico como aceptor de electro

A. tumefaciens es un microorganismo que puede emplear

las bacterias mesófilas (de Ley et. al., 1966).

28 C y 30 C, lo que incluye a este microorganismo entre

La temperatura óptima de crecimiento fluctúa entre

El mecanismo de acción de la bacteriocina aún no se determina; en este sentido Lippincott y Lippincott (1968) sugirieron una "competencia" por los sitios de infección; sin embargo, esto podría aceptarse sólo si lo que sucediera fuera una reducción del tamaño de la agalla, pero no una inhibición completa de la inducción del tumor.

Otro postulado acerca de este mecanismo sugiere que para la patogenicidad es necesaria una configuración molecular específica, y que esta configuración sea el sitio receptor para la bacteriocina (Roberts y Kerr, 1974).

Hipótesis de la formación del tumor. El agente causal del tumor, del cual se desconoce la naturaleza biológica y bioquímica, es conocida actualmente como principio inductor del tumor. (PIT).

Kado (1976) menciona como posibles hipótesis de la naturaleza del PIT a:

- a) un producto del metabolismo de A. tumefaciens;
- b) un constituyente normal del hospedante convertido por la bacteria en substancia inductora del tumor;
- c) una porción química de la célula bacterial, como DNA;
- d) un virus u otro agente presente en asociación con A. tumefaciens; y
- e) células de A. tumefaciens alteradas en su morfología y fisiología, que no sean detectadas por los métodos corrientes de aislación.

De las macromoléculas de A. tumefaciens examinadas como posibles PIT, los ácidos nucleicos continúan siendo los más probables ya que observaciones biológicas tempranas indican que el PIT es un factor autoreplicativo que altera la regulación del crecimiento de una célula normal. Las células bacteriales no necesitan estar en la planta por largo tiempo para mantener el estado tumoral; aparentemente el PIT se mantiene durante el crecimiento del tumor y se transmite a las partes sanas de la planta para generar cerca un nuevo foco tumoral (tumores secundarios). En estos tumores no se encuentra presente la bacteria.

El ensayo de la propiedad inductora de tumores de preparaciones de ácidos nucleicos de la bacteria (RNA ó DNA) es aún controvertido. Mientras algunos laboratorios empleando preparaciones de DNA altamente purificado y con medidas precautorias para disminuir al máximo la contaminación, han logrado causar agallas (Kado et al., 1972); otros no muestran evidencias de tal actividad transformadora de preparaciones de DNA, Phillips y Butcher (según Kado, 1976).

También ha sido ensayada la actividad inductora de tumores de DNA de bacteriófagos. Leff y Beardsley (según Kado, 1976) indican que el DNA del fago P38 de A. tumefaciens induce tumores en maravilla y tabaco, Otros investigadores han tratado de repetir estos ensayos sin lograrlo. Esto, además de la ausencia de DNA fago en cepas patógenas de A. tumefaciens y en células tumorales, deja de lado el rol del DNA fago en la formación del tumor.

Las investigaciones que apoyan la hipótesis que nombra a un virus como PIT, indican que aumenta la virulencia de A. tumefaciens después de exponerlo a la luz ultravioleta, que induce la producción de fagos lisógenicos en A. tumefaciens. Además se encontraron bacteriófagos en tejidos tumorosos de agallas de corona de maravilla. Sin embargo, existen estudios que rebaten esta hipótesis. Se han caracterizado algunos fagos de cepas patógenas y no patógenas sin encontrar diferencias específicas en sus propiedades biológicas entre ellos; además se han observado los mismos fagos tanto en cepas de A. tumefaciens capacitadas y no capacitadas de inducir tumores. (Kado, 1976).

Braun y Wood (según Kado, 1976) mostraron que es posible inhibir la formación de tumores utilizando ribonucleasa A a concentraciones relativamente altas, mientras que tal inhibición no se observaba cuando se usaba desoxirribonucleasa. Experimentos de control demostraron que la ribonucleasa no tenía efecto en el crecimiento de A. tumefaciens ni en la capacidad de las células hospedantes para responder normalmente al estímulo de una herida; deduciéndose así que el RNA es por sí mismo el PIT o un componente esencial de este principio, o que la ribonucleasa entra a la bacteria o a las células hospedantes inactivando algún componente primordial en la iniciación del tumor. Sin embargo se ha demostrado también que células de A. tumefaciens tratadas con ribonucleasa son modificadas en sus funciones degradativas y síntesis macromolecular; de tal forma la ribonucleasa usada a altas concentraciones interferiría suficientemente en el metabolismo del ácido nucleico bacterial como para interferir en la inducción del tumor.

Stram et al. (1971) han mostrado que extractos de RNA de *A. tumefaciens* producen tumores en plantas de tomates. RNA de cepas patógenas tratadas con ribonucleasas Y RNA de cepas no patógenas no poseen tal actividad. Pero a su vez Kado et al. (1972) probaron RNA total, RNA ribosomal Y RNA de transferencia de dos cepas de *A. tumefaciens* inductoras de tumores Y no encontraron tal propiedad en plantas de maravilla.

De las hipótesis estudiadas, la más aceptada en la actualidad corresponde a la presencia de un plasmido que se define como una pequeña porción de ácido desoxirribonucleico, extracromosómico, circular, cuya longitud alcanza aproximadamente al 2% del cromosoma bacteriano; pueden recombinarse entre sí Y con el cromosoma huésped Y su replicación es independiente del DNA bacteriano (Lehninger, 1972). La base para mantener la hipótesis del plasmido como la más admisible, radica en los resultados obtenidos al analizar DNA de *A. tumefaciens* cultivado en presencia de triptofano (H^3). De esta manera ha sido posible separar en gradientes de cloruro de cesio dos tipos de DNA sobre la base de su densidad. Uno correspondiente al DNA cromosómico propiamente tal Y el segundo al plasmido. Este segundo tipo de DNA está ausente en *A. radiobacter* Y en mutantes de *A. tumefaciens* que han perdido patogenicidad, vale decir, la capacidad de inducir la formación de tumores (Van Larebeke et al., 1974; Zaenen et al., 1974).

Entre otros trabajos que apoyan esta hipótesis figuran los realizados por Watson et al. (1975) quien demostró por medio de hibridización DNA:DNA, que el DNA de razas incapaces de inducir tumores no contienen la secuencia de DNA correspondiente al plasmido. Las observaciones hechas por Hamilton y Fall (según Kado, 1976) indican que razas de A. tumefaciens pierden su patogenicidad cuando se incuban a la temperatura de 30 C perdiendo también la mayoría de ellas su plasmido.



MATERIALES Y METODOS

Bacterias utilizadas. El detalle de los cultivos bacterianos utilizados se describe en la tabla I. A. tumefaciens (Atv) fue aislado de raíces de durazneros en Viluco - Chile.

Medios de cultivo utilizados. A fin de mantener y repicar los cultivos para los diferentes estudios se empleó Medio 523 (Kado et al., 1972) que contiene por litro de solución: 10 grs de sacarosa, 8 grs de caseína hidrolizada enzimáticamente, 4 grs de extracto de levadura, 2 grs de K_2HPO_4 , 3 grs de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ y 15 grs de agar, pH 7.

El medio base empleado para observar la utilización de diferentes carbohidratos fue el descrito por Hugh y Leifson (1953) y está compuesto por: 0,2%(g/v) de caseína hidrolizada enzimáticamente, 0,5% de NaCl, 0,03% de K_2HPO_4 , 0,3% de agar, 0,003% de azul de bromo-timol y 1% de carbohidrato, pH 7,1.

Con el objeto de detectar la presencia de la enzima nitrato reductasa se utilizó el medio agar-nitrato (Difco) Código: 0106-02-1 deshidratado, la rehidratación se efectuó con 2,4% de este preparado en agua destilada (Morris y Ribbons, 1971).

Para determinar la licuación de la gelatina se usó gelatina nutritiva (Difco) Código 0142-01-7 (Kohn, 1953).

La presencia de arginina dehidrolasa se determinó usando el medio agar-arginina (Thornley, 1960) que contiene: 1% (g/l) de L(+) arginina, 0,03% de K_2HPO_4 , 0,5% de NaCl, 0,01% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001% de rojo fenol, 0,4% de agar, pH 7.

Con el propósito de observar la formación de 3-ceto-lactosa se usó medio KL con una composición de 1% de lactosa, 0,1% de extracto de levadura y 1,5% de agar (Bernarts y De Ley, 1963).

Tabla 1

Cultivos de Agrobacterium usados.

| Especie | Sigla | Origen |
|----------------------------------|-------|--|
| <u>A. tumefaciens</u> | Atc | C.I. Kado, U. de California, Davis, EE.UU. |
| <u>A. tumefaciens</u> | Atv | M.D*Angelo, U. de Chile, Chile |
| <u>A. radiobacter</u> raza 84 | Ar84 | A. Kerr, U. de Adelaide, Australia |

Características Fisiológicas

Utilización de carbohidratos: A fin de determinar la utilización de diferentes carbohidratos se siguió el procedimiento propuesto por Hugh y Leifson (1953) que consistió en sembrar las especies a estudiar en un medio conteniendo un solo tipo de carbohidrato como fuente de carbono. Los carbohidratos se esterilizaron por filtro de membrana y se agregaron al medio base previamente esterilizado en autoclave. Los cultivos se sembraron en dos series de tubos dejando una serie con tapones de vaselina-parafina (6:1), se incubaron por 24 a 48 horas a 30 C.

Determinación de la actividad enzimática: Para verificar la formación de 3-cetolactosa, las bacterias se sembraron en un medio lactosado y se incubaron por 24 a 48 a 30 C. La formación de 3-cetolactosa se determinó agregando reactivo de Benedict manteniendo a temperatura ambiente por 15 minutos antes de observar los resultados. La presencia de 3-cetolactosa se manifestó por el desarrollo de color amarillo debido a la formación de Cu_2O (Bernserts y De Ley, 1963).

Con el objeto de detectar la presencia de citocromo oxidasa se empleó el procedimiento propuesto por Steel (1961) que consistió en tomar con un asa cultivos de 24 a 48 horas de edad y transferirlos a un pedazo de papel filtro previamente embebido con una solución de N,N-dimetil-p-fenilendiamina al 1%. El rápido desarrollo de un color púrpura (antes de 30 segundos) indica la presencia de citocromo oxidasa en la célula bacteriana. Como testigo se utilizó una cepa de Pseudomonas fluorescens que es oxidasa positiva.

A fin de detectar la actividad enzimática de la catalasa se procedió según el método de Kobayashi (1959) basado en somerger una pequeña cantidad de cultivo de 24 a 48 horas de edad en peróxido de hidrógeno al 3%; la formación de burbujas correspondiente a la liberación de oxígeno molecular indica la presencia de la enzima. Como testigo positivo se utilizó una cepa de *Bacillus* sp.

La presencia de la enzima arginina dehidrolasa en el bacterio se detectó según el siguiente procedimiento: se sembró en medio agar-arginina esterilizado en autoclave y se incubó a 30 C. Los resultados se contabilizaron luego de 7 y 15 días de incubación. Una reacción positiva produce cambio de color amarillo a rojo fucsina debido a la formación de amoniaco (Thornley, 1960). *Pseudomonas fluorescens* fue utilizada como testigo positivo.

Para determinar la actividad de la enzima nitrato reductasa, se sembraron los respectivos cultivos en medio agar-nitrato previamente esterilizado en autoclave; las siembras se incubaron por 24 a 48 horas a 30 C. La formación de NO_2^- se detectó agregando los reactivos: ácido sulfanílico y 1-naftilamina. El desarrollo de color rojo indica la presencia de nitrato reductasa en la bacteria (Horris y Ribbons, 1971). Como testigo positivo se utilizó *Escherichia coli*.

La actividad de la enzima gelatinasa se detectó según el método de Kohn (1953), que consistió en sembrar en medio gelatina nutritiva e incubar por dos semanas a 30 C. La observación se realizó colocando previamente los tubos en refrigerador por 10 minutos. Si la gelatinasa está presente en la bacteria, el medio continúa licuado.

bro en el centro de un disco de Petri conteniendo agar KI
0,1 - 0,2 ml de AR84 cultivado 24 horas en caldo KI se sem-
Stonier, 1960) con ligeras modificaciones. con este objeto
to de AR84 sobre Atc y Atv, se procedió según el método de
con el fin de observar el efecto inhibitorio del crecimiento
to de A. radiobacter raza 84 sobre A. tumefaciens.

Determinación in vitro del efecto inhibitorio del crecimiento

La patogenicidad de las especies estudiadas.
nadero aproximadamente cuatro semanas antes de determinar
Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de inver-

ras de edad.
rhanas se obtuvieron a partir de cultivos puros de 48 ho-
practicadas con bisturí estéril, las suspensiones bacte-
gotas de suspensiones bacterianas sobre pequeñas heridas
altura. La inoculación se realizó depositando una a dos
de maravilla cv. "Spunkit" de aproximadamente 15 cms. de
con este propósito se procedió a inocular plantas

de A. radiobacter.

La patogenicidad de A. tumefaciens y la no patogenicidad
diferencia taxonómica entre estas especies corresponde a
la patogenicidad de estos cultivos ya que la principal
fin de separar A. tumefaciens fue necesario establecer
Determinación de la patogenicidad en maravilla con el

testigo positivo una aislación de Escherichia coli.
se desarrolla color rojo en superficie. se utilizó como
agregar reactivo de Kovacs. La reacción es positiva si
ras a 30 c. La presencia de índol se observó después de
cultotomo se sembró en medio 523 y se incubó por 48 ho-
Para determinar la formación de índol a partir de

modificado con 0,02% de benlate, 0,01% de nistatina y 0,12% de penicilina potásica. Luego de tres días de incubación a temperatura ambiente, se inactivó el crecimiento bacteriano colocando en la tapa del disco de Petri un papel filtro embebido en cloroformo. Esta operación, siembra Ar84 y su posterior inactivación con cloroformo, se repitió dos veces antes de sembrar 0,5 ml de Atv o Atc de 72 horas de edad sobre el resto del disco de Petri. Los discos se incubaron a temperatura ambiente por dos a tres días antes de observar las zonas de inhibición del crecimiento de Atv o Atc debidas a la acción de la bacteriocina producida por Ar84 y difundida alrededor de su zona de crecimiento.

Determinación del control biológico de Ar84 sobre Atc y Atv en invernadero. La acción biológica de Ar84 sobre A. tumefaciens se estudió en plantas de maravilla bajo condiciones de invernadero. Con este objeto se realizaron los siguientes tratamientos utilizando plantas de 15 días en cada tratamiento:

- a. plantas inoculadas con una mezcla de 10^8 células/ml de Atv y 10^8 cél/ml de Ar84;
- b. plantas inoculadas con una mezcla de 10^8 cél/ml de Atc y 10^8 cél/ml de Ar84. (datos obtenidos por fotocolorimetría).

La inoculación consistió en depositar 1-2 gotas de la respectiva suspensión bacteriana sobre una pequeña herida practicada en el tallo con un bisturí estéril. La zona inoculada se protegió con polietileno. Todas las plantas se mantuvieron en invernadero por cuatro semanas antes de tomar los resultados.

RESULTADOS

Utilización de carbohidratos. La utilización de carbohidratos fue realizada sembrando los cultivos de Atc, Atv y Ar84 en el medio base propuesto por Hugh y Leifson (1953) que contiene un solo tipo de carbohidratos como fuente de carbono. El aprovechamiento de cada carbohidrato fue ensayado tres veces por cada cultivo bacteriano.

Los cultivos Atc, Atv y Ar84 son indiferenciables respecto a la utilización de carbohidratos (Tabla 2). Tanto A. tumefaciens aislado en Chile y A. tumefaciens aislado en California como A. radiobacter raza 84 produjeron ácido a partir de fructosa, arabinosa, galactosa, glucosa, manosa, xilosa, maltosa, lactosa, sorbitol y salicilina, pero no se observó la formación de gas.

Actividad enzimática. La actividad de diferentes enzimas de Atv, Atc y Ar84 fue determinada con el propósito de comparar fisiológicamente estas tres especies (Tabla 3).

Tanto A. radiobacter como los dos cultivos de A. tumefaciens son citocromo oxidasa positivos y catalasa positivos. Los cultivos de Atv y Atc con nitrato reductasa positivos y KL positivos. Atv, Atc y Ar84 no forman indol a partir de triptofano.

Las únicas diferencias fisiológicas encontradas entre Atc y Atv se refieren a la presencia de las enzimas gelatinasa y arginina dehidrolasa en el cultivo de Atv y la ausencia de ellas en Atc.

Tabla 2

Utilización de carbohidratos^a por Agrobacterium tumefaciens y Agrobacterium radiobacter raza 84.

| Carbohidrato agregado | <u>A. radiobacter</u> | <u>A. tumefaciens</u> | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| | raza 84 | Atc ^b | Atv ^c |
| Fructosa | ++ ^d | + | ++ |
| Arabinosa | + | + | ++ |
| Galactosa | + | + | ++ |
| Glucosa | + | ++ | ++ |
| Manosa | + | + | ++ |
| Xilosa | ++ | ++ | + |
| Maltosa | ++ | ++ | +++ |
| Lactosa | + | + | ++ |
| Sorbitol | + | + | ++ |
| Salicilina | + | + | ++ |

a) Las especies se sembraron en medio Hugh-Leifson conteniendo un solo tipo de carbohidrato (10 gr/lit) como fuente de carbono. Se incubaron por 24 a 48 horas a 30 C.

b) Atc: A. tumefaciens proveniente de California, EE. UU.

c) Atv: A. tumefaciens proveniente de Viluco, Chile.

d) + : acidificación aproximadamente en un 10% del tubo.

++ : acidificación aproximadamente en un 50% del tubo.

+++ : acidificación en el total del tubo.

Tabla 3

Actividad enzimática de Agrobacterium tumefaciens y de Agrobacterium radiobacter.

| Ensayo | <u>A. tumefaciens</u> | <u>A. radiobacter</u> |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| | Atc ^a | Atv ^b Ar84 ^c |
| Citocromo oxidasa ^d | + | + + + |
| Catalasa ^e | + | + + + |
| Nitrato reductasa ^f | + | + + + |
| Gelatinasa ^g | - | + + + |
| Arginina hidrolasa ^h | - | + + + |
| Indol ⁱ | - | + + + |
| K ₂ J ^j | + | + + + |

a) Atc: A. tumefaciens proveniente de California, EE. UU.

b) Atv: A. tumefaciens proveniente de Viluco, Chile.

c) Ar84: A. radiobacter raza 84.

d) Cultivos bacterianos de 24 a 48 hrs de edad se traspasaron a un papel filtro empapado con una solución de N,N-dimetil-p-aminocloruro (10gr/lit).

e) Una pequeña cantidad de cultivo bacteriano de 24 hrs de edad se sumergió en peróxido de hidrógeno al 3%.

f) Las bacterias se sembraron en medio agar-nitrato; luego de 48 hrs de incubación a 30 C se agregaron los reactivos (ácido sulfúrico y 1-naftilamina).

- g) Se sembraron cultivos bacterianos en medio gelatina nutritiva y se incubaron por dos semanas a 30 C.
- h) En un medio con arginina semisolidificado con agar se sembraron los cultivos bacterianos a 30 C, observándose los resultados después de 7 y 15 días de incubación.
- i) Se utilizó medio 523 incubándose las bacterias a 30 C por 48 horas.
- j) La formación de 3-cetolactosa (KL) se observó sembrando las bacterias en medio lactosado e incubándolas por 24 a 48 hrs a 30 C. Se utilizó el reactivo de Benedict.

A. radiobacter raza 84 fue el único cultivo bacteriano estudiado que no formó 3-cetolactosa a partir de un medio de cultivo con 1% de lactosa.

Los resultados de las respectivas actividades enzimáticas provienen de tres observaciones diferentes, excepto en el caso de la determinación de la formación de 3-cetolactosa la cual se realizó diez veces por cada cultivo bacteriano.

Patogenicidad de A. tumefaciens en plantas de maravilla.

Plantas de maravilla de 20 días de edad fueron inoculadas con Atc y Atv (Tabla 4). El 70% de las plantas inoculadas presentó formación de agallas a las cuatro semanas, indicando que la virulencia de ambos cultivos en plantas de maravilla es idéntica. No hubo formación de agallas en las plantas inoculadas con Ar84. Esto último es normal por cuanto Ar84 no es un patógeno de maravilla.

Efecto inhibitorio del crecimiento de Ar84 sobre Atc y Atv in vitro. La ausencia en el crecimiento de los cultivos de A. tumefaciens (Atc y Atv) sembrados alrededor de Ar84 sugiere la producción de una bacteriocina por Ar84 (Figura 1).

Con el fin de observar la acción inhibitoria de Ar84 se procedió según el método de Stonier (1960) sembrando Atc y Ar84, Atv y Ar84 realizando 13 repeticiones por cada cultivo de A. tumefaciens. El efecto de Ar84 se expresó en halo de inhibición (cm). de crecimiento de Atv y Atc.

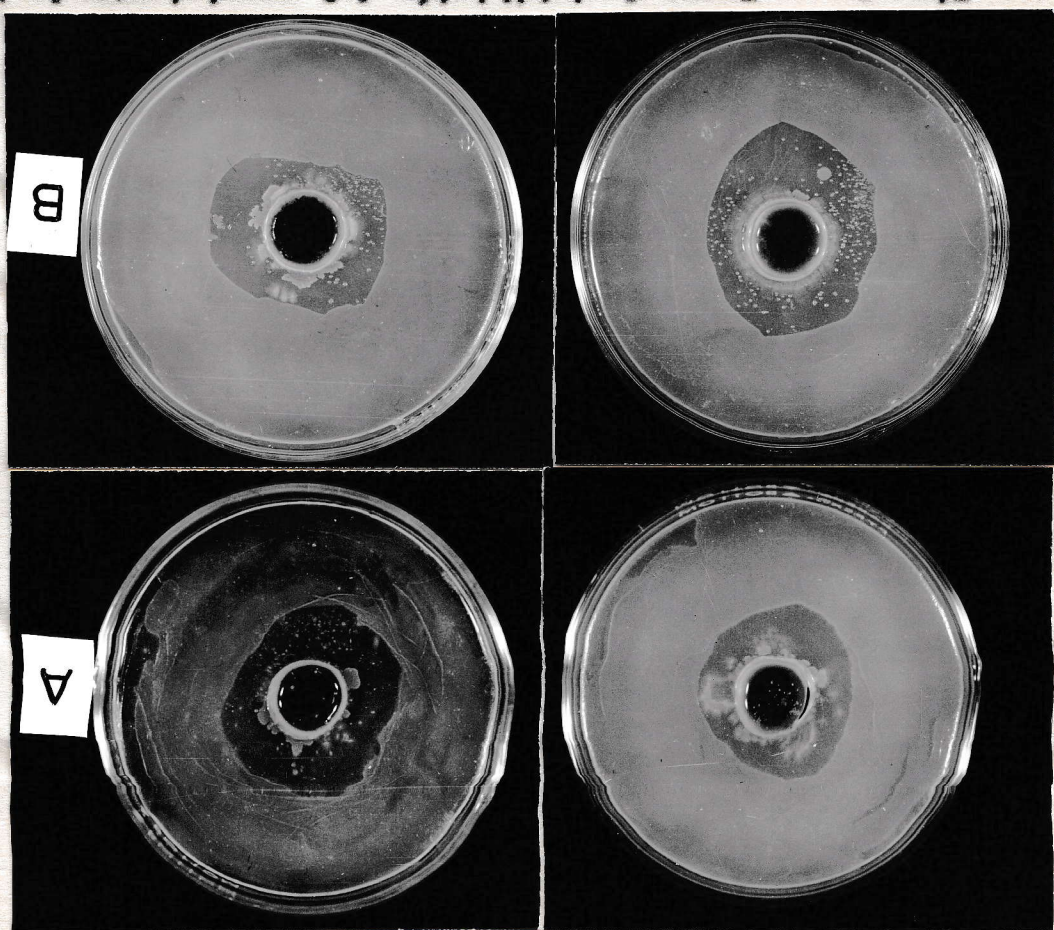
Tabla 4

Determinación de la patogenicidad de Agrobacterium tumefaciens y Agrobacterium radiobacter en plantas de maravilla^a.

| Cultivo | Número de plantas inoculadas | Número de plantas enfermas |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------|
| <u>A. tumefaciens</u> | | |
| Atc | 10 | 7 |
| Atv | 10 | 7 |
| <u>A. radiobacter</u> | | |
| raza 84 | 10 | 0 |

^aPlantas de maravilla de 15 días crecidas en un invernadero a 20 C \pm 5, fueron heridas con un bisturí estéril e inoculadas con las suspensiones bacterianas. La contabilización de plantas enfermas (con agallas), se realizó cuatro semanas después de la inoculación.

Fig. 1. Zonas de inhibición del crecimiento de Agrobacterium tumefaciens sembradas alrededor de Agrobacterium tumefaciens raza 84. A) Efecto de la zona de inhibición del crecimiento de Agrobacterium tumefaciens de California alrededor de Agrobacterium tumefaciens raza 84. B) Efecto de la zona de inhibición del crecimiento de Agrobacterium tumefaciens de Chile (Atv) alrededor de Agrobacterium tumefaciens raza 84. Las bacterias se sembraron en medio agar KI modificada con nistatina, penicilina y benlate y se incubaron a temperatura ambiente, observándose las zonas de inhibición del crecimiento después de dos a tres días de incubación.



El promedio obtenido de los 13 ensayos fue el siguiente:

Atc: 3,9 cm de halo de inhibición.

Atv: 4,1 cm de halo de inhibición.

Control biológico de Ar84 sobre Atc y Atv en plantas de maravilla. La acción biológica de Ar84 sobre Atc y Atv se observó en plantas de maravilla inoculadas con mezclas de cultivos de Ar84 y Atv o Ar84 y Atc, mantenidas en invernadero (Tabla 5)

El 80% de las plantas control inoculadas con Atv desarrolló agallas después de cuatro semanas, verificándose una reducción en la formación de los tumores (Figura 2) al obtener solamente un 10% de plantas enfermas cuando se inocularon con mezclas de suspensiones bacterianas de Atv y Ar84. El caso de la inoculación con Atc es similar; las plantas control desarrollaron tumores en un 85%, bajando este porcentaje a un 5% cuando se inocularon las plantas con mezclas de Atc y Ar84; verificándose la efectividad del control biológico de Ar84 sobre ambos cultivos de A. tumefaciens.

Tabla 5

Reducción de la formación de agallas en plantas de maravilla^a a través de A. radiobacter raza 84 (Ar84), especie no patógena.

| Cultivo | Número de plantas inoculadas | Número de plantas enfermas |
|------------------|------------------------------|----------------------------|
| Atc ^a | 20 | 17 |
| Atv | 20 | 16 |
| Atc y Ar84 | 20 | 1 |
| Atv y Ar84 | 20 | 2 |

^aPlantas de maravilla de 15 días crecidas en invernadero a 20 C \pm 5, fueron heridas con un bisturí estéril e inoculadas con Atc (Agrobacterium tumefaciens de California), Atv (Agrobacterium tumefaciens de Viluco), y con mezclas de Atc y Ar84 (Agrobacterium radiobacter raza 84) o Atv y Ar84. La contabilización de plantas enfermas (con agallas) se realizó cuatro semanas después de la inoculación.

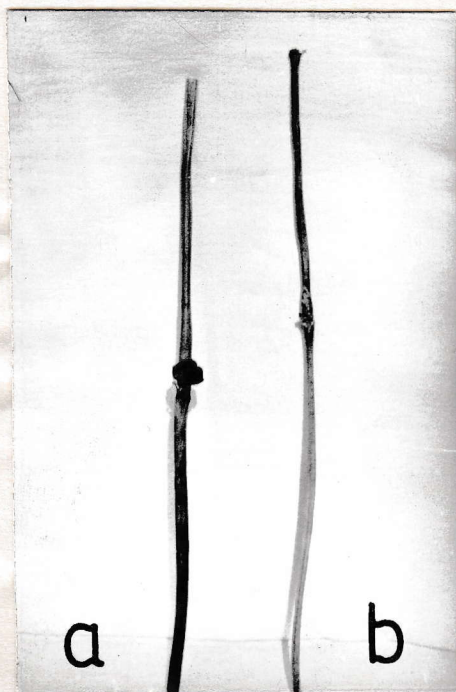


Figura 2. Control de la formación de tumores en plantas de maravilla inoculadas con mezclas de Agrobacterium tumefaciens y Agrobacterium radiobacter (Ar84). Las plantas de maravilla se mantuvieron en invernadero a $20\text{ C} \pm 5$ durante cuatro semanas antes de anotar las observaciones. a) Planta de maravilla inoculada con A. tumefaciens de Viluco (Atv). b) Plantas de maravilla inoculada con una mezcla de A. tumefaciens (Atv) y A. radiobacter (Ar84).

D I S C U S I O N

Agrobacterium tumefaciens, microorganismo bacterial, es el agente causal de "agalla del cuello", enfermedad representativa de un grupo de afecciones cuyos mayores efectos en el hospedante son hiperplasia e hipertrofia celular y afecta a un número considerable de plantas herbáceas y leñosas causando serios daños económicos ya que puede afectar a la planta en cualquier época de su desarrollo, luego de sufrir heridas. El mayor daño económico provocado por esta enfermedad en nuestro país radica en la pérdida de árboles frutales atacando su zona radicular sin lograr aún un control efectivo ni tener una caracterización precisa de esta cepa causante de agallas. Lo anterior ha estimulado la realización de una serie de estudios orientados a disminuir o evitar la enfermedad, caracterizar al bacterio causante e identificar la fracción de A. tumefaciens que desencadena la infección. Estos estudios han mostrado la posibilidad de prevenir la inducción de agallas aplicando un control biológico con Agrobacterium radiobacter raza 84 que produce una bacteriocina, substancia que inhibiría el crecimiento de A. tumefaciens impidiendo así la acción del principio inductor del tumor.

Los estudios de este trabajo relacionados con el reconocimiento y caracterización de A. tumefaciens aislada

de durazneros en Chile comparándola con A. tumefaciens aislada en California y A. radiobacter raza 84, permiten señalar que, en cuanto a la utilización de carbohidratos y la actividad enzimática de citocromo oxidasa, catalasa, nitrato reductasa y la formación de indol de los cultivos de Atc, Atv y Ar84 corresponden a lo que menciona la literatura al respecto. Sin embargo no ocurre lo mismo con la formación de 3-cetoglicósido. Siendo la característica del género Agrobacterium la utilización de lactosa con la formación de 3-cetolactosa solamente Atc y Atv resultaron ser positivos a este ensayo, no así Ar84, por lo que tal vez sea necesario profundizar los estudios de la caracterización de A. radiobacter raza 84 antes de considerarlo definitivamente dentro del género Agrobacterium.

Al comparar fisiológicamente Atv con Atc se encontró que las únicas desigualdades corresponden a la actividad enzimática de gelatinasa y arginina dehidrolasa en Atv y la ausencia de ella en Atc; sin embargo estas diferencias sumadas a las de ubicación geográfica y hospedante, aparentemente no influyen en el carácter fitopatogénico, característica que es estable y se conserva, lo que permite considerar que A. tumefaciens aislado en Chile y A. tumefaciens aislado en California son la misma especie.

Al verificarse esta igualdad entre Atv y Atc no extraña observar que el efecto inhibitorio del crecimiento de Ar84 sobre Atc mencionado en la literatura, se advierte también en la zona de inhibición del crecimiento de Atv

sembrada alrededor de Ar84 (Figura 1). Este efecto de Ar84 sobre Atc y Atv in vitro, además del control biológico de la enfermedad obtenidos en plantas de maravilla de invernadero, inoculadas con mezclas de Ar84 y Atc o Ar84 y Atv (Tabla 5), indica la posibilidad de llevar a nivel de campo este control con la cepa chilena causante de la enfermedad "agalla del cuello".

Considerando los antecedentes anteriormente expuesto sería productivo estudiar un sistema que permita aumentar artificialmente la concentración de A. radiobacter raza 84 alrededor de las plantaciones susceptibles a la enfermedad; o sumergir el sistema radicular de las plantas en una suspensión bacteriana con Ar84 antes de realizar las plantaciones, ya que se ha verificado que si las plantas tienen contacto primero con microorganismos no patógeno productor de bacteriocina, adquieren inmunidad a la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Breed, R.S., E.G. D. Murray, N.R. Smith and ninetyfour Contributors, 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7^a. Ed. The Williams & Wilkins Company, Preston Street. Baltimore, USA.
- Bernaerts, M.J., J. De Ley. 1963. A Biochemical Test for Crown Gall Bacteria. *Nature* 197: 406-407.
- De Ley, J., M. Bernaerts, A. Rassel and A. Guilmont. 1966. Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 43: 7-17.
- Dhanvantari, B.N., P.W. Johnson, and V.A. Dirks. 1975. The role of nematodes in crown gall infection of Peach in South Western, Ontario. *Plant Disease Reporter*, 59: 109-112.
- Hugh, R., E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66: 24-26.
- Kado, C.I. 1976. The tumor-inducing substance of *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 14: 265-308.
- Kado, C.I., M.G. Heskett and R.A. Langley. 1972. "Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: characterization of strains 1D135 and B6, and analysis of the bacterial chromosome, transfer RNA and ribosomes for tumor-inducing ability". *Physiol. Pl. Pathol.*, 2: 47-57.

- Kerr, A. 1969. Crown Gall of stone fruit. I. Isolation of Agrobacterium tumefaciens and related species. Aust. J. Biol. Sci., 22: 111.
- Kerr, A., K. Htay. 1974. Biological control of crown trough bacteriocin production. Physiol. Pl. Path., 4: 37 - 44.
- Kohn, J. 1953. A preliminary report of a new gelatin liquefaction method. J. clin. Path., 6: 249.
- Lehninger, A.L. 1972. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega: S.A., Barcelona. pp. 887.
- Lippincott, J.A., G.T. Heberlein. 1965. The induction of leaf tumors by Agrobacterium tumefaciens Amer. Journ. Bot., 52: 396-403.
- Lippincott B.B., J.A. Lippincott. 1969. Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by Agrobacterium. J. Bacteriol. 97: 620 - 628.
- Miller, H.N. 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in Chrysanthemum by Agrobacterium tumefaciens. Phytopathol. 65: 805 - 810.
- Moller, W.J., M.N. Scroth. 1976. "Biological control of crown gall" California Agr. 30: 8 - 9.
- New, P.B., A. Kerr, 1972. "Biological control of crown gall: Fiels measurements and glass-house experiments". J. Appl. Bact., 35: 279 - 287.

- Norris, J.R., D.W. Ribbons (Editores). 1971. Methods in Microbiology. Academic Press. Londres. Vol. 6, part. a, 593 p.
- Rhodes, M.E. 1959. The characterization of Pseudomonas fluorescens. J. Gen. Microbiol., 21: 221 - 263.
- Roberts, W.P., A. Kerr. 1974. Crown gall induction; serological reactions isozyme patterns and sensitivity to mitomycin C and to bacteriocin of pathogenic and non-pathogenic strains of Agrobacterium radiobacter. Physiol. Plant Patholog. 4: 81 - 91.
- Scroth, M.N., A.R. Weinhold, A.H. Mc Cain, D.C. Hildebrand and N. Ross. 1971. "Biology and control of Agrobacterium tumefaciens". Hilgardia, 40: 537-552.
- Steel, K.J. 1961. The oxidative reaction as a taxonomic tool. J. Gen. Microbiol., 25: 297 - 306.
- Stonier, T. 1960. "Agrobacterium tumefaciens Conn II. Production of an antibiotic substance". J. Bacteriol., 79: 889 - 898.
- Stroun, M., P. Anker, P.G. Ahan, A. Fossier, H. Greppin. 1971. "Agrobacterium tumefaciens ribonucleic acid synthesis in tomato cells and crown gall induction". J. Bacteriol., 106: 634 - 639.

- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other Gram (-) bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bact., 23: 37 - 52.
- Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaenen, J. Schell, 1974. Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for Crown-gall-inducing ability. Nature, 252: 199 - 70.
- Van Larebeke, N., Ch. Genetello, J. Schell, R.A. Schilpercot, A.K. Hermans, J.P. Hernalsteens, M. Montagu. 1975. Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature, 255: 743 - 43.
- Vidaver, A.K. 1976. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by Bacteriophags and Bacteriocins. Ann. Rev. Phytopathol., 14: 451 - 465.
- Walker, J.C. 1969. Plant Pathology. McGraw-Hill, New York. 3^a Ed., 819 pp.
- Watson, B., T.C. Currier, M.P. Gordon, M.D. Chilton, E.W. Nester. 1975. Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol., 123: 255 - 264.
- White, P.R. 1954. The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press Company. New York. 239 pp.
- Zaenen, I., N. Van Larebeke, H. Teuchy, M. Van Montagu, J. Schell. 1974. Supercoloid circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains. J. Mol. Biol., 86: 109 - 127.