

INFLUÊNCIA DE AMINAS NO DESENVOLVIMENTO DE  
TUMOR "CROWN-GALL" EM GERGELIM (*Sesamum indicum* L.)

*Maria Teresa Vitral de Carvalho*  
QUÍMICA

Orientador :  
*Prof. Dr. Otto J. Crocomo*

Dissertação apresentada à Escola  
Superior de Agricultura "Luiz de  
Queiroz" da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Mestre.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
1975

*À memória de meu pai,*

*À minha mãe,*

**DEDICO**

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Professor Dr. Otto J. Crocomo, pela valiosa e segura orientação, transmitindo ensinamentos e dando o apoio necessário ao desenvolvimento deste trabalho.
  
- Ao Dr. William R. Sharp, da The Ohio State University, pelas sugestões durante o transcorrer do trabalho.
  
- Ao Dr. Luiz Carlos Basso e ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Luiz Eduardo Gutierrez, pela colaboração nas análises químicas.
  
- Aos Srs. Lineu D.M. Delfini, Jonas Crivellani e a Srta. Lucia Maria G. Alves, pelo auxílio nos laboratórios.
  
- À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.
  
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), pelas facilidades oferecidas nos Laboratórios da Seção de Bioquímica de Plantas.

.III.

- À Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
- À todos aqueles que de alguma forma prestaram auxílio na realização deste trabalho.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO . . . . .	01
2. REVISÃO DA LITERATURA . . . . .	05
2.1. O tumor "crown-gall" . . . . .	05
2.2. As di- e poliaminas e tumores "crown-gall" . . . . .	14
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	17
3.1. Tumores obtidos de plantas cultivadas em solução nutritiva em ausência e presença de várias doses de potássio . . . . .	17
3.1.1. Cultivo das plantas . . . . .	17
3.2. Cultura de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . . .	18
3.3. Efeito de putrescina no desenvolvimento de tumores <i>in vivo</i> . . . . .	19
3.4. Cultura de tumores <i>in vitro</i> . . . . .	19
3.5. Análise química . . . . .	20
3.5.1. Extração de aminoácidos e amins..	20
3.5.1.1. Cromatografia em papel de filtro . . . . .	21
3.5.1.2. Determinação quantitativa de citrulina, N-carbamil- putrescina e putrescina..	21
3.5.1.3. Determinação da ornitina, arginina e agmatina . . .	22

	<u>Página</u>
3.5.2. Determinação de putrescina, espermina e espermidina . . . . .	22
3.5.2.1. Tumores e folhas colhidos de plantas (experimento 3.4.) . . . . .	22
3.5.2.2. Calos obtidos da cultura de tumores <i>in vitro</i> (experimento 3.4.) . . . . .	23
3.5.3. Determinação quantitativa de lipídeos totais e ácidos graxos. . . . .	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	26
4.1. Níveis de aminoácidos e aminos correlacionadas . . . . .	26
4.1.1. Níveis de citrulina, N-carbamilputrescina e putrescina (experimento 3.5.1.2.) . . . . .	26
4.1.2. Níveis de ornitina, arginina e agmatina (experimento 3.5.1.3.) . . . . .	29
4.2. Níveis de putrescina, espermina e espermidina . . . . .	42
4.2.1. Tumores e folhas de gergelim (experimento 3.5.2.1.) . . . . .	42
4.2.2. Calos obtidos da cultura de tumores <i>in vitro</i> (experimento 3.5.2.2.) . . . . .	44

	<u>Página</u>
4.3. Lipídeos totais e ácidos gráxos (experimento 3.5.3.) . . . . .	47
5. CONCLUSÕES . . . . .	50
6. RESUMO . . . . .	52
7. SUMMARY . . . . .	55
8. BIBLIOGRAFIA . . . . .	58

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
01 -	Variações nos teores de citrulina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio . . . . .	27
02 -	Variações nos teores de citrulina de plantas inoculadas com <i>A. tumefaciens</i> e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.	28
03 -	Variações nos teores de N-carbamilputrescina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio . . .	30
04 -	Variações nos teores de N-carbamilputrescina de plantas inoculadas com <i>A. tumefaciens</i> e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio . . . . .	31
05 -	Variações nos teores de putrescina de plantas, não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio. . . . .	32
06 -	Variações nos teores de putrescina de plantas inoculadas com <i>A. tumefaciens</i> e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.	33



<u>Figura</u>	Página
07 - Variações nos teores de ornitina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio . . . . .	34
08 - Variações nos teores de ornitina de plantas inoculadas com <i>A. tumefaciens</i> e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.	36
09 - Variações nos teores de arginina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio . . . . .	37
10 - Variações nos teores de arginina de plantas inoculadas com <i>A. tumefaciens</i> e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.	38
11 - Variações nos teores de agmatina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio . . . . .	39
12 - Variações nos teores de agmatina de plantas inoculadas com <i>A. tumefaciens</i> e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.	40

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
01 -	Resultados da análise de putrescina, espermidina e espermina em tumores "crown-gall" e folhas de plantas de gergelim. .	43
02 -	Resultados da análise de putrescina, espermidina e espermina em calos de tumores obtidos em meio de cultura com várias doses de putrescina . . . . .	45
03 -	Pesos fresco e seco de tumores "crown-gall" induzidos em caule de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> L.) por <i>A. tumefaciens</i> B <sub>6</sub> . . . .	46
04 -	Teores de lipídeos totais nos calos obtidos de explantes de tumores "crown-gall" cultivados em meio de cultura com várias doses de putrescina . . . . .	47
05 -	Peso seco dos calos obtidos de explantes de tumores "crown-gall" cultivados em meio de cultura com várias doses de putrescina.	48
06 -	Teores de ácidos graxos nos calos obtidos de explantes de tumores "crown-gall", cultivados em meio de cultura com várias doses de putrescina . . . . .	49

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

Os tumores vegetais, embora bastante semelhantes aos tumores animais, possuem certas características próprias com particularidades originais que permitem abordar de uma maneira mais específica o vasto problema do cancer. A verdadeira natureza do câncer foi descoberta por *JOHAN MÜLLER* em 1838 ao mostrar claramente para células animais que essa doença era resultante de uma alteração da divisão celular e que os tumores são formados por uma proliferação anormal das células.

O desenvolvimento harmonioso de um organismo é devido a um número considerável de mecanismos de contro-

le dos quais muitos são ainda de natureza desconhecida. Este controle é exercido em diferentes níveis: nível celular, nível dos órgãos ou do organismo inteiro. Este desenvolvimento é um fenômeno programado. Mas, quando as células comportam-se como entidades autônomas, dividindo-se de uma maneira contínua, não respondendo mais aos sinais reguladores que elas recebem, ocorre crescimento desorganizado, do qual o câncer é uma das formas que parece afetar todos os seres pluricelulares.

Nas células tumorais vegetais, essa autonomia de crescimento é colocada em evidência por dois tipos de experimentos: a transplantabilidade *in vivo* e o crescimento *in vitro* na ausência de reguladores de crescimento.

Desde o fim do século passado já se sabia que células cancerosas de rato ou de cachorro transplantadas em um animal sadio provocavam a formação de tumores. Ao redor de 1910 Jensen depois de uma série de brilhantes experimentos realizados com ratos mostrou que essa propriedade era específica da célula tumoral. Alguns anos mais tarde, Jensen descobriu esse mesmo fenômeno nos tumores vegetais. Ele mostrou que um fragmento de tumor de beterraba vermelha transplantado em uma beterraba açucareira continuava a se desenvolver de maneira autônoma, formando um volumoso tumor colorido pelo pigmento vermelho da beterraba, a betacianina.

Por outro lado, a cultura *in vitro* dos tumores vegetais fornece um outro critério suplementar de reconhecimento dos tumores vegetais: enquanto os tecidos da maioria das plantas não se desenvolvem *in vitro*, senão na presença de reguladores de crescimento, auxinas e citocininas, os tecidos tumorais das mesmas espécies, pro-

liferam vigorosamente *in vitro* na ausência de qualquer regulador de crescimento. Além disso, as células tumorais proliferam *in vitro* mais intensamente que as células normais correspondentes e geralmente é difícil de se conservar um inóculo de tecido normal, por mais de 80 a 100 transferências, enquanto que os inóculos tumorais parecem ser capazes de sobreviver indefinidamente.

Um aspecto interessante na gênese dos tumores e a multiplicidade de diversos agentes que são capazes de em essência produzirem o mesmo resultado final. Energia radiante, irritação, drogas carcinogênicas, organismos parasitas e vírus têm sido utilizados como indutores de tumores em animais. A eficiência desses vários fatores como indutores de tumores é função da constituição hereditária do hospedeiro. Muitos desses mesmos agentes estão relacionados etiologicamente na indução de tumores em plantas.

Os tumores de plantas superiores podem ser de vários tipos e cada um deles possui uma etiologia diferente. Os mais estudados e conhecidos são: a) tumor "crown-gall" - no qual um princípio ainda não caracterizado, elaborado por um microrganismo, converte células normais de plantas em células tumorais; b) tumor de Black - de origem virótica; c) tumor de Kostoff - de origem genética, que aparece em algumas variedades de fumo. Nossos estudos se concentraram no primeiro tipo ou seja o tumor "crown-gall" que é induzido por uma bactéria específica, *Agrobacterium tumefaciens*. Como nesse tipo de tumor têm sido encontradas variações no metabolismo de compostos nitrogenados, inclusive aminas, nossa hipótese de trabalho baseou-se no possível papel das diaminas e poliaminas no controle do crescimento e morfogênese de tumo-

res "crown-gall" *in vivo* e *in vitro*, com os seguintes objetivos:

- a) estudo do controle da formação de tumores "crown-gall" em plantas cultivadas em solução nutritiva em presença e ausência de potássio.
- b) estudo do controle da formação deste tipo de tumor por diaminas e poliaminas.
- c) estudo do controle do desenvolvimento desse tipo de tumor cultivado *in vitro* por putrescina.

---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1. O tumor "crown-gall"

"Crown-gall" é uma doença neoplástica das plantas induzida por *A. tumefaciens*. Esta bactéria tem a propriedade de transformar células normais de plantas em células tumorais, em curto período de tempo. Uma vez iniciada a alteração celular, a proliferação contínua, anormal, das células afetadas torna-se um processo automático completamente independente da bactéria indutora. A transformação das células normais em células tumorais nesse tipo de tumor depende não somente da presença do

princípio indutor elaborado pela bactéria, mas também das células hospedeiras que são condicionadas e então tornam-se capazes de responder a influência carcinogênica daquele princípio.

O tumor "crown-gall" é um caso único na cancerologia. Com efeito, é o único caso descrito até o momento onde ocorre formação de tumor seguida da inoculação de uma bactéria. É o primeiro câncer produzido experimentalmente.

A primeira descrição do tumor "crown-gall" foi feita por *HLUBEK* em 1839 e citada por *JENSEN* (1910). De início uma série de agentes foram considerados responsáveis por sua indução: fatores do solo não conhecidos, uma nova espécie de fumo, resposta a um ferimento e um agente bacteriano. Finalmente, *SMITH and TOWNSEND* (1907a, b) isolaram o indutor patogênico, uma bactéria gram-negativa, das galhas de uma margarida (*Chrysanthemum frutescens* L.). Esses pesquisadores chamaram o organismo isolado de *Bacterium tumefaciens*; esse nome foi mais tarde mudado para *Agrobacterium tumefaciens*. Desde então a doença "crown-gall" tem atraído a atenção de um grande número de pesquisadores não somente devido a sua importância econômica mas particularmente devido as suas implicações teóricas no campo da oncologia. Inicialmente foi considerada uma simples hiperplasia estimulada pela bactéria e não um neoplasma canceroso de plantas. Como se sabe, a hiperplasia não tem caráter evolutivo e as células param de se multiplicar quando o agente indutor desaparece; são exemplos as galhas causadas por insetos, ácaros e parasitas.

Foi *SMITH* (1912b; 1913) quem inicialmente apon-



tou as semelhanças básicas entre "crown-gall" e câncer, mas somente com os experimentos de Jensen já citados anteriormente é que o "crown-gall" deixou de ser considerado uma simples hiperplasia estimulada pela bactéria, mas um verdadeiro neoplasma canceroso das plantas.

A natureza fundamental da doença fica evidenciada pelo fato de que pelo menos 142 gêneros pertencentes a 61 famílias botânicas são susceptíveis ao tumor "crown-gall". Tanto uma macieira é susceptível como um cactus ou um girassol. Muitas coníferas e a maioria das dicotiledôneas também respondem positivamente; somente os monocotiledôneas não reagem.

As pesquisas sobre o "crown-gall" têm evoluído em paralelo ao desenvolvimento da fisiologia e da bioquímica e principalmente pela descoberta das auxinas e citocininas, e em nossos dias pela biologia molecular. A manutenção do equilíbrio entre a produção e destruição de auxina é uma característica do metabolismo normal das plantas superiores. Evidências diretas e indiretas indicam que este equilíbrio não é atingido em tumores de plantas como o "crown-gall". Muitos experimentos evidenciam que estes tumores são hiperauxínicos e elaboram auxina em quantidades maiores do que as quantidades regulatórias. A independência auxínica do tecido de tumor "crown-tumores livres de bactéria até então isolados de gall" e evidenciada pelo fato de que todos os tecidos de diferentes espécies de plantas, não necessitam de uma fonte exógena de auxina para que eles continuem a crescer em cultura, como ocorre com a maioria das células de plantas normais. Os experimentos de *KULESCHA* e *GAUTHERET* (1948) com tecidos tumoral e normal de *Scorzonera* mostraram que os tecidos tumorais continham considerável-

mente mais auxina livre do que os tecidos normais. A extração de auxina do tecido tumoral é instantânea enquanto que a de tecido normal é lenta e progressiva (KULESCHA, 1954). Estes dados sugerem claramente que as células de tumores "crown-gall" adquirem, como resultado de sua alteração, capacidade de sintetizar uma substância promotora de crescimento do tipo auxina, em maiores quantidades do que as regulatórias (BRAUN, 1947b; De ROPP, 1947a; GAUTHERET, 1947a). Isso indica que o mecanismo que regula os níveis auxínicos nas células normais é falho ao operar em tumor e a explicação para esse fato é ainda bastante discutível. Entretanto, não há dúvidas quanto ao fato de que a auxina exerça importante papel etiológico no crescimento anormal e contínuo das células do tumor "crown-gall". O que não está claro, é como o princípio indutor do tumor associado a essa doença produz células que se tornam autônomas em termos de auxina. Não se sabe se há um aumento endógeno na síntese de auxina pelas células tumorais ou se um sistema ainda não caracterizado de inativação de auxina normalmente relacionado com a regulação de crescimento é destruído como resultado da ação do princípio indutor do tumor.

Outro aspecto importante a ser abordado é o papel da bactéria na formação do tumor. Os primeiros trabalhos fundamentais a esse respeito são devidos a A.C. BRAUN (1943; 1947a; 1951b; 1952) que através de uma série de experimentos engenhosos, obteve êxito ao analisar o processo da transformação tumoral e determinar suas diversas fases. Esse autor utilizou para isso a curiosa propriedade que o sistema planta-bactéria possui de se inativar acima de 30°C. Quando o período à 30°C é bastante curto, de apenas algumas horas, a inativação é re-

versível. Abaixo dessa temperatura a bactéria permanece viva e se desenvolve normalmente como também acontece com as plantas inoculadas e os tumores já induzidos. Pode-se portanto, utilizando-se dessa propriedade, inibir e induzir à vontade o processo de transformação da célula normal em célula tumoral. Braun pode assim estudar separadamente o papel da ferida, a influência do período de inoculação na transformação tumoral, e mostrar que a formação do "crown-gall" ocorre através de vários processos.

*MOREL (1972)* resumiu de maneira muito clara os estudos de Braun com as seguintes conclusões:

- a) uma temperatura acima de  $30^{\circ}\text{C}$  inibe a transformação;
- b) somente o último período de 24 horas é termossensível;
- c) ao prolongar-se acima de 48 horas a ação da temperatura, obtém-se tumores cada vez menores; após 62 horas não se obtém tumores;
- d) é necessário ferir-se a planta para a formação de tumores; uma inoculação sem ferida não produz tumores;
- e) a planta só se torna sensível a inoculação, 24 horas após o ferimento; decorridas aproximadamente 76 horas após o ferimento a planta se torna insensível à inoculação, não formando tumores;

- f) para que a transformação seja completa, são necessárias e suficientes 72 horas de contacto entre planta e bactéria;
- g) quando se reduz esse tempo de contacto os tumores são cada vez menores;
- h) se o tempo de contacto é inferior à 34 horas não ocorre formação de tumores.

Braun demonstrou assim que as células hospedeiras devem ser condicionadas pelo estímulo de uma ferida a qual produz um traumatismo, tornando as células "competentes", isto é, susceptíveis de transformação pelo princípio que induz a formação do tumor. Os seus trabalhos parecem também indicar a passagem para a célula tumoral de uma entidade com propriedade de auto-reprodução e isso é o que diversos pesquisadores tem procurado verificar ao longo desses últimos anos. Esta entidade pode ser um ácido nucleico que agiria por si mesmo ou através de uma nova informação que ele traz a célula transformada.

As diferenças encontradas no metabolismo nitrogenado entre tecidos normais e tumorais são provas à favor da passagem de uma informação. *GOLDMAN (1970)* mostrou que há nos tecidos tumorais acúmulo de duas bases nitrogenadas guanidínicas. Uma é a octopina, produzida pela condensação de um aminoácido a arginina, e do ácido pirúvico, que desempenha um papel metabólico importante nos moluscos, mas que nunca foi encontrada em plantas. A outra muito semelhante, é produzida pela condensação de arginina com um outro ácido cetônico, o ácido  $\alpha$ -cetoglutá-

rico, denominada nopalina. Alguns tumores contêm octopina, outros a nopalina, sabendo-se que a natureza da guanidina sintetizada na célula tumoral depende da cepa utilizada na inoculação (*GOLDMAN et al., 1968*). Ora, a célula da planta antes de ser transformada, é incapaz de realizar a síntese destas substâncias, portanto ela deve ocorrer durante a transformação. A síntese de octopina, bem estudada nos moluscos, necessita uma enzima muito específica que não se encontra na célula vegetal. Tem-se então imaginado que a informação necessária a síntese dessa enzima é transmitida pela bactéria no decorrer do processo de transformação. Parece ser efetivamente isso que ocorre, uma vez que as bactérias que induzem a produção de octopina na célula vegetal são capazes de cin-dir esta molécula em arginina e piruvato mas não o fazem para a nopalina e vice-versa (*MOREL et al., 1969*). Este parentesco bioquímico só pode ser explicado pela transfe-rência de uma informação permanente da bactéria à célula tumoral durante a transformação.

O papel exato do agente cancerígeno é discutível; não se sabe se ele fornece uma informação que codifica a síntese específica da condensação dos ácidos cetônicos com a arginina, ou provoca uma de-repressão dos genes que normalmente não atuam na célula normal, uma vez que aqueles metabólitos nunca foram encontrados nas células normais de plantas.

Uma primeira série de experimentos realizados por *De ROPP (1948)* e por *CAMUS e GAUTHERET (1948)* mostraram que em certas condições as propriedades tumorais podem ser transmitidas de célula à célula, transplantando um fragmento de tecido tumoral em tecido normal cultivado sem regulador de crescimento. Estas experiências leva-

ram muitos pesquisadores a tratar as plantas com extratos de bactérias cultivados na presença do suco da ferida, de modo a fazê-las elaborar o princípio indutor (KLEIN, 1953; KLEIN e KNUPP, 1957; BENDER e BRUCKER, 1954, 1956, 1958). Estas primeiras experiências não foram decisivas porque estes autores não puderam mostrar que as protuberâncias obtidas eram verdadeiros tumores. Além disso, esses resultados não tiveram o mesmo sucesso daqueles obtidos por MANIGAULT e STOLL (1960) que conseguiram a indução e o crescimento de tumores vegetais isentos de bactéria com a aplicação de DNA bacteriano. Mais recentemente KOVOOR (1967) observou após aplicação de DNA de *Agrobacterium tumefaciens* em culturas de tecidos normais de *Scotzonera*, a proliferação de tecidos com características tumorais.

Uma prova definitiva da passagem de uma informação do princípio indutor no processo de transformação foi obtida de maneira muito elegante por AARON-DA CUNHA (1970) que transplantou tecido tumoral de fumo após ter sido irradiado por uma dose de raios X de 5000 röntgens. Nessas condições as células permaneceram vivas, mas perderam toda a capacidade de se dividir. O tecido transplantado perdeu a faculdade de proliferação, mas as células dos tecidos entraram em divisão e formaram verdadeiros tumores que continham precisamente as guanidinas da bactéria utilizada para se obter o tumor inicial. Houve portanto, passagem para as células normais que entraram em contacto com o tecido tumoral, de uma informação genética.

Há outros trabalhos procurando pesquisar se o DNA tumoral possui as sequências de bases análogas ao DNA da bactéria indutora. Através de técnicas de hibridação que permitem estimar o grau de complementariedade

de duas cadeias de DNA ou de um DNA e um RNA, vários autores têm procurado verificar se a transformação tumoral comporta a introdução no genoma da planta de um fragmento de cromossoma bacteriano. A descoberta recente de bacteriófagos de *A. tumefaciens* em tecidos tumorais cultivados assepticamente, portanto em ausência total de bactéria, vem repor em questão a etiologia do "crown-gall". Com efeito, pode-se pensar que nesse caso, como no do vírus cancerígeno SV40, que induz o sarcoma de Rous, é o fago que seria o agente cancerígeno e transformaria a célula normal, integrando-se ao seu genoma. Estes fagos foram postos em evidência por *PARSONS e BEARDSLEY (1968)* em tecidos tumorais de girassol. Os ensaios preliminares pareceram indicar que o DNA desses fagos provoca proliferações análogas ao "crown-gall". Entretanto para essa hipótese há algumas objeções: o fato de que muitas bactérias livres de seus fagos, como e o caso da cepa B<sub>6</sub>806, que é uma cepa indicadora, permanece ainda virulenta. Mas isto não exclui a possibilidade de que estes fagos exerçam algum papel no decorrer da infecção, porque embora eles normalmente sejam difíceis de serem postos em evidência e nem sempre são encontrados nos tecidos tumorais (*SCHILPEROORT et al., 1973*), observa-se através de microscopia eletrônica que eles se tornam muito numerosos na ferida de inoculação a partir da 10a. e 28a. hora após a inoculação da bactéria, isto é no tempo em que se inicia a transformação (*KUKDJIAN, 1968*).

Entretanto a hipótese de que um fragmento de DNA da bactéria penetre na célula hospedeira e leve consigo o fago (*MOREL, 1972*) é bastante discutível. *DRLICA e KADCO (1974)* sugerem que o conceito de que ácidos nucleicos de *A. tumefaciens* permaneçam em tumores "crown-gall" isentos de bactéria deve ser revisto. Uma vez que a pre-

sença ou ausência de DNA bacteriano em células tumorais é importante para a explicação da formação do tumor "crown-gall", estes autores analisaram o DNA de tumores "crown-gall" de *Vinca rosea* L., e o DNA de *A. tumefaciens*, em ensaios de hibridização. Foi estimado em menos de 0,02% a homologia entre DNA tumoral e DNA bacteriano; isto representa cerca de 1/3 do genoma bacteriano correspondendo a menos de 0,2 equivalentes de genoma bacteriano por célula tumoral. Com bases nesses experimentos os autores acreditam que não há ácidos nucleicos de *A. tumefaciens* em tumores "crown-gall" isentos de bactéria, ou que este ácido nucleico bacteriano se encontra em quantidades abaixo dos limites dos ensaios de hibridização usados.

## 2.2. As di- e poliaminas e tumores "crown-gall"

Um outro aspecto a ser abordado no estudo dos tumores "crown-gall" é o possível papel das di- e poliaminas na indução desses tumores em plantas e suas implicações nos processos de crescimento.

As poliaminas alifáticas que estão distribuídas em todas as células vivas (TABOR e TABOR, 1964; SMITH, 1971), podem ligar e estabilizar os ácidos nucleicos permitindo uma mais rápida e definida transcrição do DNA; além disso estimulam a síntese de proteína e a multiplicação celular (GOLDSTEIN, 1966; MANDEL, 1962; NAKAMOTO e HAMEL, 1968; ASCOLI, 1968 e COCUCCI e BAGNI, 1968). É bem conhecido que existe uma íntima relação entre as poliaminas e os processos de crescimento. Nas plantas superiores, o conteúdo de poliaminas aumenta antes da di-



visão celular como foi verificado por *COCUCCI e BAGNI (1968)* em fatias de tubérculos de *Helianthus tuberosus* ativadas com ácido indolacético.

Desde que ácido indolacético e citocininas aumentam em tecidos tumorais (*KULESCHA e GAUTHERET, 1948; BRAUN e NÄF, 1954*) existe a possibilidade de que as poliaminas tenham alguma relação com o crescimento anormal das células tumorais. Além do mais, em alguns tumores animais as poliaminas são encontradas em grandes quantidades (*KREMZHNER et al., 1970*) bem como em tumores de plantas, como foi verificado por *BAGNI et al., (1972)* com tecidos "crown-gall" de *Scorzonera hispanica L.*, onde espermidina e putrescina aparecem em maiores quantidades do que em tecido normal.

Entre outros aspectos bioquímicos, os tumores de plantas apresentam o metabolismo nitrogenado alterado (*MOREL, 1970*), mas até agora o metabolismo das poliaminas não está totalmente esclarecido. Um possível papel das poliaminas talvez seja o do controle do pH na região do ferimento e conseqüentemente permitir condições mais favoráveis à proliferação da bactéria indutora do tumor. O fato de que as poliaminas são necessárias na estabilização da membrana e no balanço do pH foi documentado por *SMITH e SINCLAIR (1967)*. Esses pesquisadores trabalhando com "seedlings" de cevada propuzeram que a formação e excreção das poliaminas contribuíram para um mecanismo interno de compensação para a manutenção do pH.

Além disso, é interessante salientar que a replicação de um fago em certas situações depende do conteúdo de poliaminas no organismo hospedeiro (*DION e COHEN, 1972*). Possivelmente as poliaminas estabilizam os ácidos nucléi-

cos estranhos que provavelmente estão envolvidos no processo de transformação celular. Esta hipótese se baseia na hibridização dos ácidos nucleicos das células transformadas e de cepas virulentas de *A. tumefaciens* (MILO e SRIVASTAVA, 1969; QUETIER *et al.*, 1969). Os ácidos nucleicos estranhos produzidos pela *A. tumefaciens* ou a um fago a ela associado, estão unidos com as poliaminas resultando em uma estabilização e proteção contra a degradação efetuada por nucleases liberadas da região do ferimento. Uma vez tendo os ácidos nucleicos estranhos penetrado na célula hospedeira, aparentemente a síntese de poliaminas na célula é estimulada e isto permite uma rápida transcrição do episoma e subsequente incorporação no genoma da planta. Por outro lado, a diamina putrescina foi relatada como sendo precursora das poliaminas espermina e espermidina, tanto em microrganismos (TABOR *et al.*, 1958), como em animais (PEEG e ASHMAN, 1969). Em plantas, SMITH (1970) verificou a incorporação de putrescina-<sup>14</sup>C em espermidina e espermina trabalhando com "seedlings" de cevada.

Ademais plantas deficientes em potássio mostram um aumento na atividade de decarboxilases de arginina e citrulina (SMITH, 1963; CROCOMO *et al.*, 1970), levando ao acúmulo das respectivas aminas agmatina, N-carbamilputrescina e putrescina, ocorrendo principalmente um aumento acentuado no "pool" de putrescina. Pode-se então correlacionar esses dados com os obtidos em tumores de plantas onde também são encontradas grandes quantidades de di- e poliaminas.

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

---

#### 3.1. Tumores obtidos de plantas cultivadas em solução nutritiva em ausência e presença de várias doses de potássio

##### 3.1.1. Cultivo das plantas

Sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L., var. venezuela 51) foram germinadas em areia lavada, em estufa a 28°C, regando-se com solução nutritiva de *HOAGLAND* e *ARNON* (1950), diluída a 10%. Quando as plantas tinham cerca de 6 cm de altura foram divididas em dois lotes, um

deles sendo transplantado para bandejas de plástico contendo solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon n.2 (6 mM de potássio). O outro lote de "seedlings" foi subdividido em 3 lotes que foram mantidos em solução nutritiva com as seguintes doses de potássio: 0,0; 10,0 e 20,0 mM.

Cinco dias após o transplante os "seedlings" de todos os lotes foram divididos em dois grupos. Em um deles inoculou-se *Agrobacterium tumefaciens* (suspensão de  $35 \times 10^6$  bactérias/ml), cepa virulenta B<sub>6</sub>, e em outro Ensaio idênticos foram conduzidos com cepa avirulenta de *A. tumefaciens* II BNV6, utilizando-se também plantas de gergelim.

Trinta dias após a inoculação com a bactéria, tumores, caules e folhas foram colhidos para a análise de aminoácidos e aminas.

### 3.2. Cultura de *Agrobacterium tumefaciens*

As cepas de *A. tumefaciens* virulentas B<sub>6</sub> e avirulenta II BNV6, foram gentilmente cedidas por Dr. W. R. Sharp, The Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A.

A manutenção dessas cepas é feita no seguinte meio de cultura, à 4°C:

Bacto triptone . . . . .	5 g
Extrato de levedura . . . . .	5 g
Glicose . . . . .	1 g
Fosfato dibásico de potássio . . . . .	1 g
Agar . . . . .	15 g
Água desionizada . . . . .	1 litro

### 3.3. Efeito de putrescina no desenvolvimento de tumores *in vivo*

Plantas de gergelim cotidas como em 3.1.1. foram separadas em 3 lotes cada um deles recebendo respectivamente injeções de 0,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de putrescina - HCl, dois dias após a inoculação com *A. tumefaciens*. As injeções foram aplicadas seja no ápice de cada plantinha seja imediatamente acima do ponto de inoculação com a bactéria. Trinta dias após a inoculação com a bactéria os tumores foram colhidos, estimando-se o peso seco de cada tratamento.

### 3.4. Cultura de tumores *in vitro*

Tumores de plantas cultivadas em solução nutritiva completa (ver 3.1.) foram extraídos das mesmas e separados em 2 lotes. Em um dos lotes, os tumores foram lavados com detergente e em seguida com solução nutritiva estéril de hipoclorito comercial ("Q-bon") a 20%, durante 20 minutos.

Em câmara asséptica explantes de tumores foram semeados em frascos contendo 10 ml de meio de cultura de Nash modificado por *SOMMERS* (citado em *SHARP e CALDAS, 1972*). Foram acrescentadas ao meio as seguintes doses de putrescina: 0,0; 0,25; 0,50; 2,50; 5,0; 10,0; e 20,0  $\mu\text{moles}/10$  ml de meio. No segundo lote de tumores e também em amostras de folhas colhidas das plantas, foram realizadas análises de putrescina, espermina e espermidina.

### 3.5. Análise química

#### 3.5.1. Extração de aminoácidos e aminas

Tumores, caules e folhas colhidos do experimento 3.1 foram tratados com etanol 80% em ebulição e macerados em Omni Mixer (Sorvall) a 16.000 rpm durante 1 minuto e em seguida centrifugados (5.600 x g, 5 minutos). Os pigmentos foram removidos por extração com  $\text{CCl}_4$ . Os extratos alcoólicos obtidos foram primeiramente fracionados em resina Amberlite IRC-50 (H) com agitação durante 60 minutos em presença de 1 g de resina em frascos Erlenmayer. A seguir a resina foi lavada com 3 porções sucessivas de 10 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  4N por agitação durante 30 minutos cada uma.

Uma primeira fração contendo agmatina (eluída totalmente) e putrescina (eluída parcialmente) foi obtida pela lavagem da resina com 10 ml da solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (SMITH e RICHARDS, 1962). O material eluído com  $\text{NH}_4\text{OH}$  4N foi evaporado até resíduo seco (a  $60^\circ\text{C}$ ), retomado em 10 ml de água destilada e novamente fracionado em coluna de vidro de 1 cm de diâmetro interno contendo 5 ml de resina Dowex-50 W X-8 ( $\text{H}^+$ ). A segunda fração obtida contendo os aminoácidos foi eluída com 30 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2N. A última fração contendo N-carbamilputrescina e a putrescina remanescente, foi coletada por eluição com 20 ml de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ .

As frações obtidas foram evaporadas até resíduo seco a  $60^\circ\text{C}$  sob corrente de ar comprimido e retomadas em 1 ml de álcool isopropílico a 10% e que era 0,05N em  $\text{HCl}$ . Os aminoácidos e aminas foram assim transformadas em clo<sub>2</sub>ridratos.

### 3.5.1.1. Cromatografia em papel de filtro

Alíquotas de 10 a 100 ml das soluções obtidas como anteriormente descrito foram cromatografadas em papel de filtro Whatman nº 1. Para a separação dos aminoácidos utilizou-se como solvente a mistura butanol: fenol: ácido acético: água (2:2:1:1, v/v) o qual se desenvolveu de forma ascendente por duas vezes consecutivas. As aminas foram separadas segundo *SMITH e RICHARDS (1962)*, usando-se como solvente a mistura butanol: metiletilcetona: amônia: água (5: 3: 1: 1, v/v), em desenvolvimento ascendente por 3 vezes. Juntamente com as amostras a serem analisadas foram cromatografados os padrões de aminoácidos e aminas (todas na forma de cloridrato). Os cromatogramas foram então pulverizados com solução de ninhidrina a 1% (em etanol) e aquecidos em estufa a 65°C. Feita a identificação dos compostos, procedeu-se às determinações quantitativas.

### 3.5.1.2. Determinação quantitativa de citrulina, N-carbamilputrescina e putrescina

As regiões correspondentes a cada um dos compostos revelados com ninhidrina foram cortadas e eluídas em 5 ml de tampão fosfato, pH 7,0, 0,025M (em etanol 50%), conforme método descrito por *CROCOMO e ROSSI (1967)*. As leituras de densidade ótica foram efetuadas em espectrofotômetro Coleman Jr. II e transformadas em µg/g com auxílio de reta padrão previamente elaborada para cada composto a ser dosado.

### 3.5.1.3. Determinação da ornitina, arginina e agmatina

Regiões dos cromatogramas correspondentes a cada um desses compostos foram localizadas e cortadas sem prévia reação com ninhidrina. Isto era conseguido repetindo-se a aplicação da amostra no cromatograma, do qual fitas correspondentes a cada amostra eram reveladas separadamente. A eluição foi feita com água destilada quente (60°C) e no eluído procedeu-se à dosagem. A amina agmatina e o aminoácido, arginina foram estimados pelo método descrito por *GILBOE e WILLIAMS (1956)* e o aminoácido ornitina segundo *CHINARD (1952)*.

### 3.5.2. Determinações de putrescina, espermina e espermidina

#### 3.5.2.1. Tumores e folhas colhidos de plantas (experimento 3.4)

O método empregado na extração de putrescina, espermina e espermidina foi segundo *SMITH (1970)*. Amostras em duplicata de tumores (7,5 g), e folhas (10 g), foram colhidas e tratadas com ácido tricloroacético (8 ml/g de matéria fresca) seguida de maceração em homogeneizador Virtis durante 1 minuto. Após centrifugação a 5600g durante 5 minutos, o sobrenadante foi agitado por 1 hora em presença de 1 g de resina Dowex 50W x 8 (H<sup>+</sup>), 20 - 50 mesh. A seguir a resina foi lavada com 20 ml de água destilada, sendo as aminas (putrescina, espermina e espermidina) extraídas pela agitação da resina com 10 ml de HCl 12N durante 2 horas.



Removeu-se o ácido e lavou-se a resina três vezes com cerca de 3 ml de água destilada cada vez. As águas de lavagem foram adicionadas ao extrato ácido. Acrescentou-se 1 ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1% (em água) à solução que foi em seguida evaporada até resíduo seco, a 60°C sob vácuo. Os resíduos assim obtidos foram ressuspensos em tampão citrato pH 2,2. A determinação quantitativa de putrescina, espermina e espermidina foi efetuada segundo o método de *HATANO et al.*, (1970), usando-se analisador automático de aminoácidos (Beckman, modelo 120C).

#### 3.5.2.2. Calos obtidos da cultura de tumores *in vitro* (experimento 3.4.)

O método empregado foi uma adaptação feita por *SMITH (1973)*. Os calos obtidos da cultura de tecido de explantes de tumores em meio de cultura (experimento 3.4) com várias doses de putrescina foram macerados com ácido tricloroacético a 5% (8 ml/g de matéria fresca) em homogenizador Virtis durante 1 minuto. Após centrifugação a 5.600 g durante 5 minutos o sobrenadante foi agitado durante 1 hora em presença de 1 g de resina Dowex 50W x 8 (H<sup>+</sup>), 20 - 50 mesh. A seguir a resina foi lavada com 20 ml de água destilada, sendo as aminas (putrescina, espermidina e espermina) extraídas pela agitação da resina com 10 ml de HCl 12N, durante 2 horas. A fração contendo as aminas foi evaporada até resíduo seco a 60°C sob vácuo, e dissolvida em 1 ml de HCl 0,1N. Desta solução, alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para tubos de ensaio com tampa esmerilhada, 5 ml de capacidade, jun

tamente com 50 mg de  $\text{NaHCO}_3$  e 0,2 ml de solução de cloreto de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonila (cloreto de dansilo) (300 mg/10 ml de acetona). A reação processou-se por 16 horas em temperatura ambiente quando então 15 mg de prolina em 0,1 ml de água destilada foram adicionados. Após 60 minutos os derivados fluorescentes das aminas foram extraídos em 2,5 ml de tolueno por agitação mecânica, durante 15 segundos. Os tubos foram então centrifugados e alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  da camada de tolueno foram submetidas a cromatografia em camada delgada.

Foram empregadas placas de 20 x 20 cm com camada de gel de sílica (250  $\mu$  de espessura) que haviam sido ativadas a 100°C por 2 horas. Como solventes cromatográficos foram usadas as misturas ciclohexana: acetato de etila (3:2) para a separação de putrescina, e ciclohexana: acetato de etila (1:1) para a separação de espermina e espermidina.

Logo após a separação cromatográfica, que foi acompanhada mediante iluminação da placa com luz ultravioleta, as placas foram retiradas da câmara e pulverizadas com 25 ml de uma mistura de trietanolamina: isopropanol (1:4). Após evaporação do isopropanol as placas foram mantidas sob vácuo em presença de gel de sílica como desidratante durante 20 horas.

A seguir as placas foram submetidas a análise usando-se um densitômetro Vitraton TLD 100. Mediu-se a intensidade de fluorescência, a 507 nm, de cada derivado de amina pela ativação dos compostos com luz de 365 nm. Como padrões, 0,1  $\mu\text{moles}$  de cada amina foram submetidos a reação para formação de derivados fluorescentes e igualmente submetidos a cromatografia em camada delgada. Para

se contornar o problema da desuniformidade das placas, os padrões foram cromatografados juntamente com as amostras.

### 3.5.3. Determinação quantitativa de lipídios totais e ácidos graxos

Dos calos obtidos da cultura de tumores *in vitro* (experimento 3.4) com várias doses de putrescina adicionadas ao meio de cultura, foram feitas análises de lipídeos totais, ácidos graxos e estimativa da matéria seca. Os lipídeos totais foram determinados segundo o método de *FOLCH et al.*, (1957). Os ácidos graxos foram analisados por cromatografia em fase gasosa (cromatógrafo CG-17 com detetor de ionização de chama), esterificados segundo método de *LUDDY et al.*, (1960), sendo os picos identificados por comparação com ácidos puros através do processo de *Equivalent Chain Length* segundo *HOFSTETTER et al.* (1965).

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1. Níveis de aminoácidos e aminos correlacionadas

#### 4.1.1. Níveis de citrulina, N-carbamilputrescina e putrescina (experimento 3.5.1.2.)

A Figura 1 mostra que o teor mais elevado de citrulina nos caules e folhas de plantas não inoculadas foi na dose de 0mM de potássio, com valor mais alto nas folhas. Nos tumores e caules de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* (Figura 2) o teor mais elevado de citrulina foi na dose de 10 mM de potássio. Nas folhas a concentração mais alta de citrulina ocorreu na dose de 0mM de potássio.

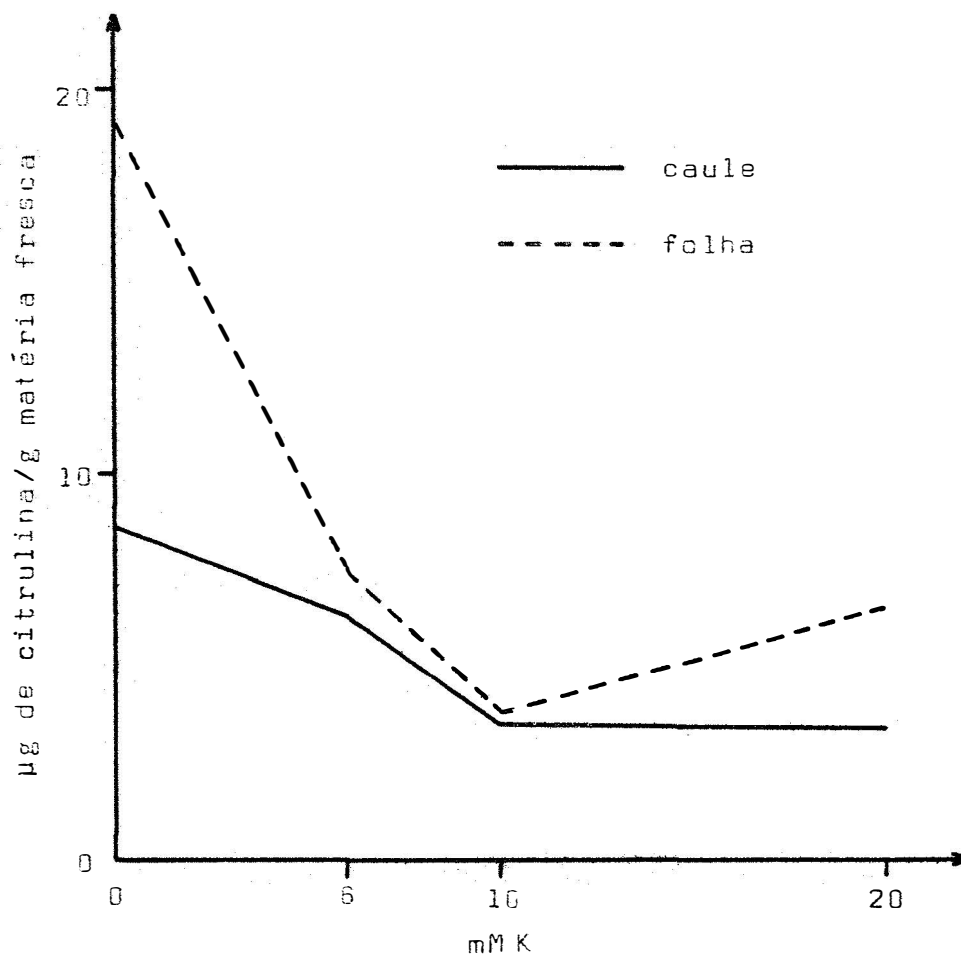


Figura 1 - Variações nos teores de citrulina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

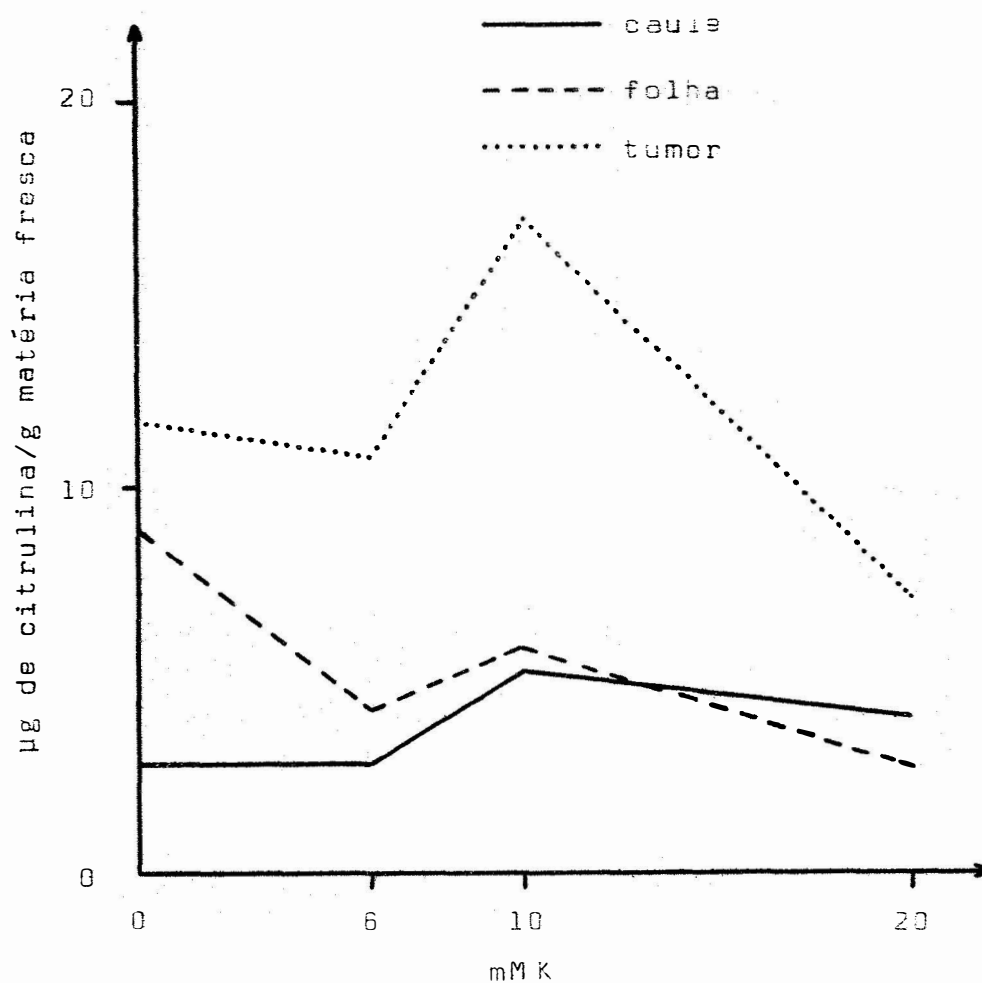


Figura 2 - Variações nos teores de citrulina de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

A Figura 3 mostra que nas folhas e caules de plantas não inoculadas a concentração mais elevada de N-carbamilputrescina ocorreu na dose de 0mM de potássio, embora na folha essa concentração seja aproximadamente 90% superior a do caule. Observa-se também nas folhas um decréscimo de cerca de 86% na concentração de N-carbamilputrescina na dose de 0mM de potássio para a de 6mM de potássio. Na Figura 4 observa-se que a concentração de N-carbamilputrescina nos tumores, caules e folhas foi também maior na dose de 0mM de potássio sendo que nas folhas esse teor é maior, cerca de 27% a mais do que nos tumores.

A Figura 5 mostra que o teor de putrescina nas folhas e caules de plantas não inoculadas foi maior na dose de 0mM do potássio. A análise dos valores obtidos indicou que houve um decréscimo de 99% e 98% na concentração de putrescina nas folhas e caules respectivamente da dose de 0mM de potássio para a de 6 mM de potássio. Nos caules, folhas e tumores (Figura 6) de plantas inoculadas com *A. tumefaciens*, a concentração de putrescina foi maior também na dose de 0mM de potássio. Houve um decréscimo no teor de putrescina de 98% nas folhas e nos caules e de 99% nos tumores aproximadamente, da dose de 0mM de potássio para a de 6mM de potássio.

#### 4.1.2. Níveis de ornitina, arginina e agmatina (experimento 3.5.1.3.)

A Figura 7 mostra que o teor mais elevado de ornitina em caules e folhas de plantas não inoculadas ocorreu na dose de 0mM de potássio, com valor mais alto nas folhas. Os tumores, caules e folhas de plantas inocula-

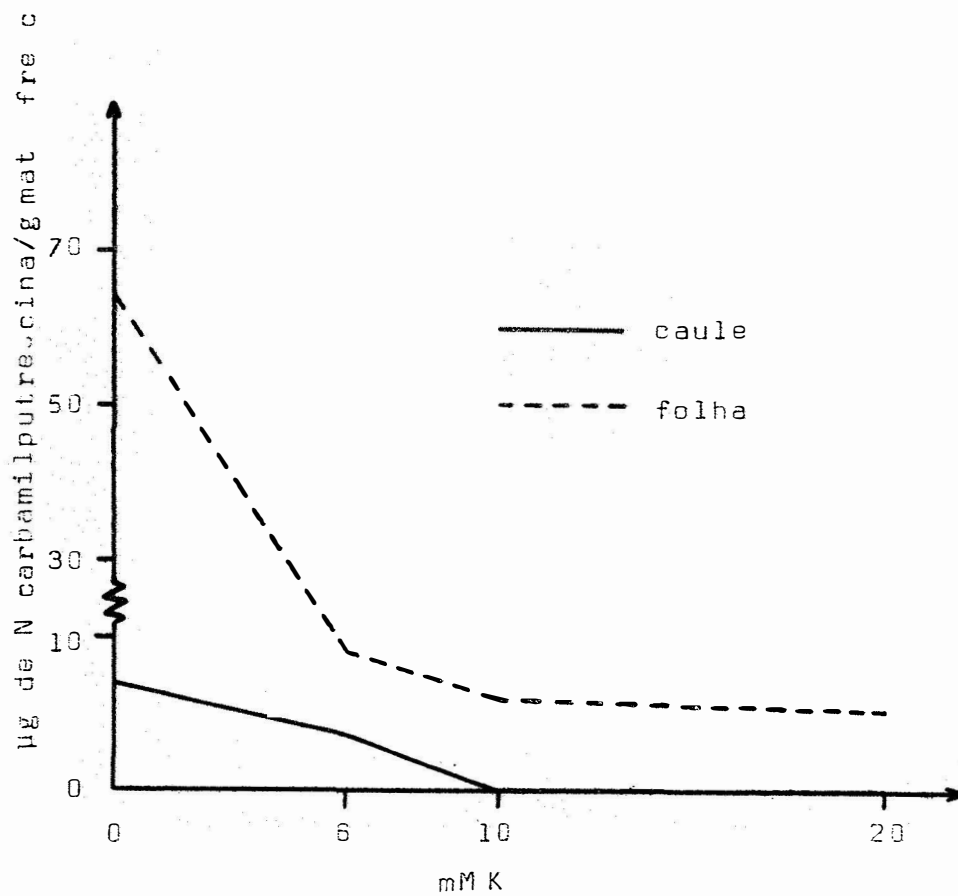


Figura 3 - Variações nos teores de N-carbamilputrescina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.



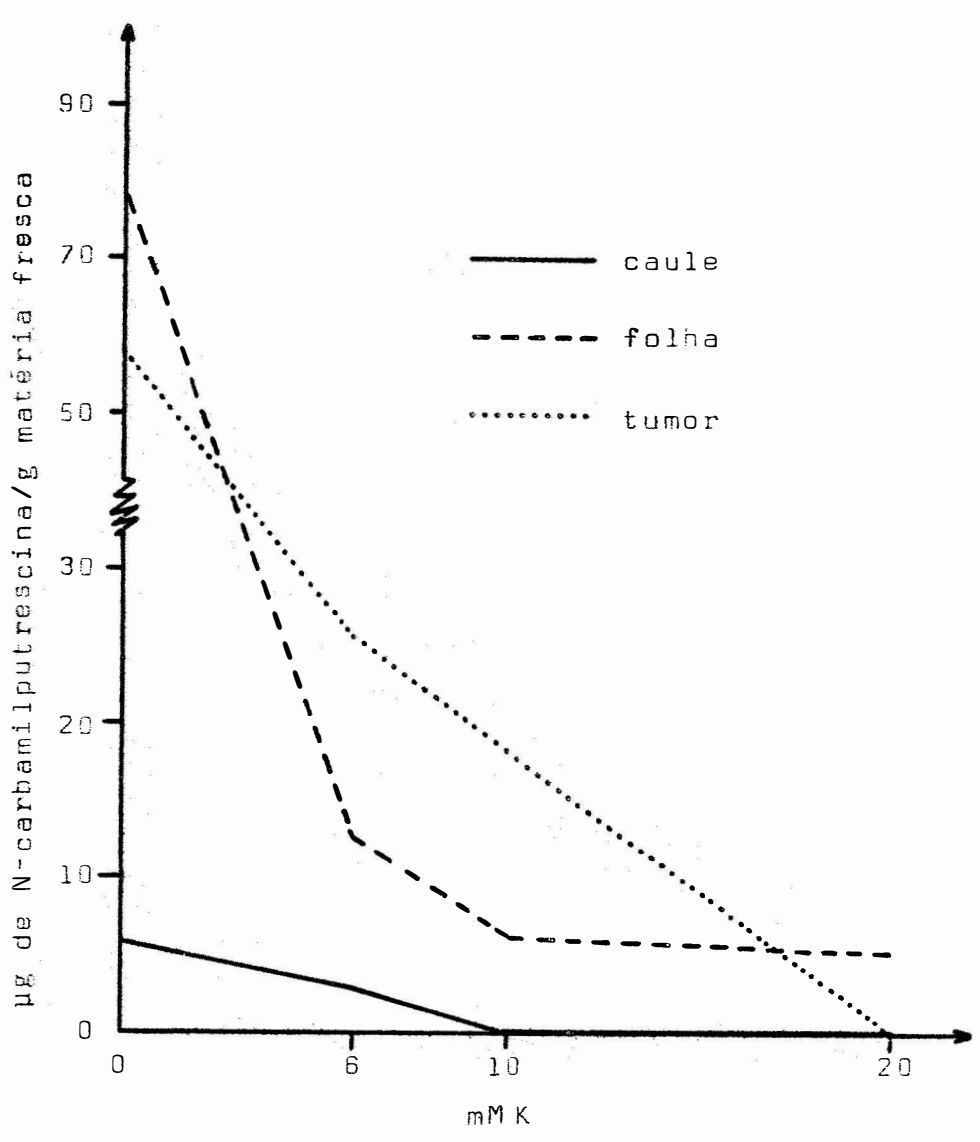


Figura 4 - Variações nos teores de N-carbamil-putrescina de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

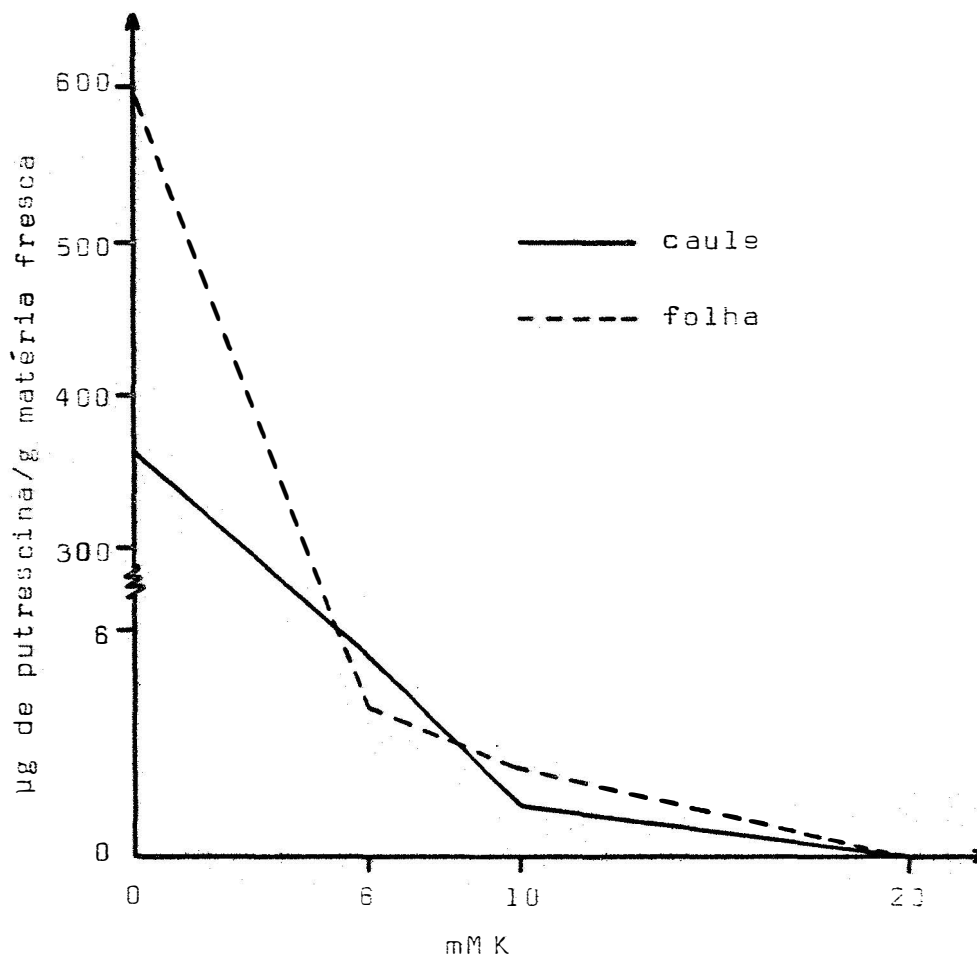


Figura 5 - Variações nos teores de putrescina de plantas, não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

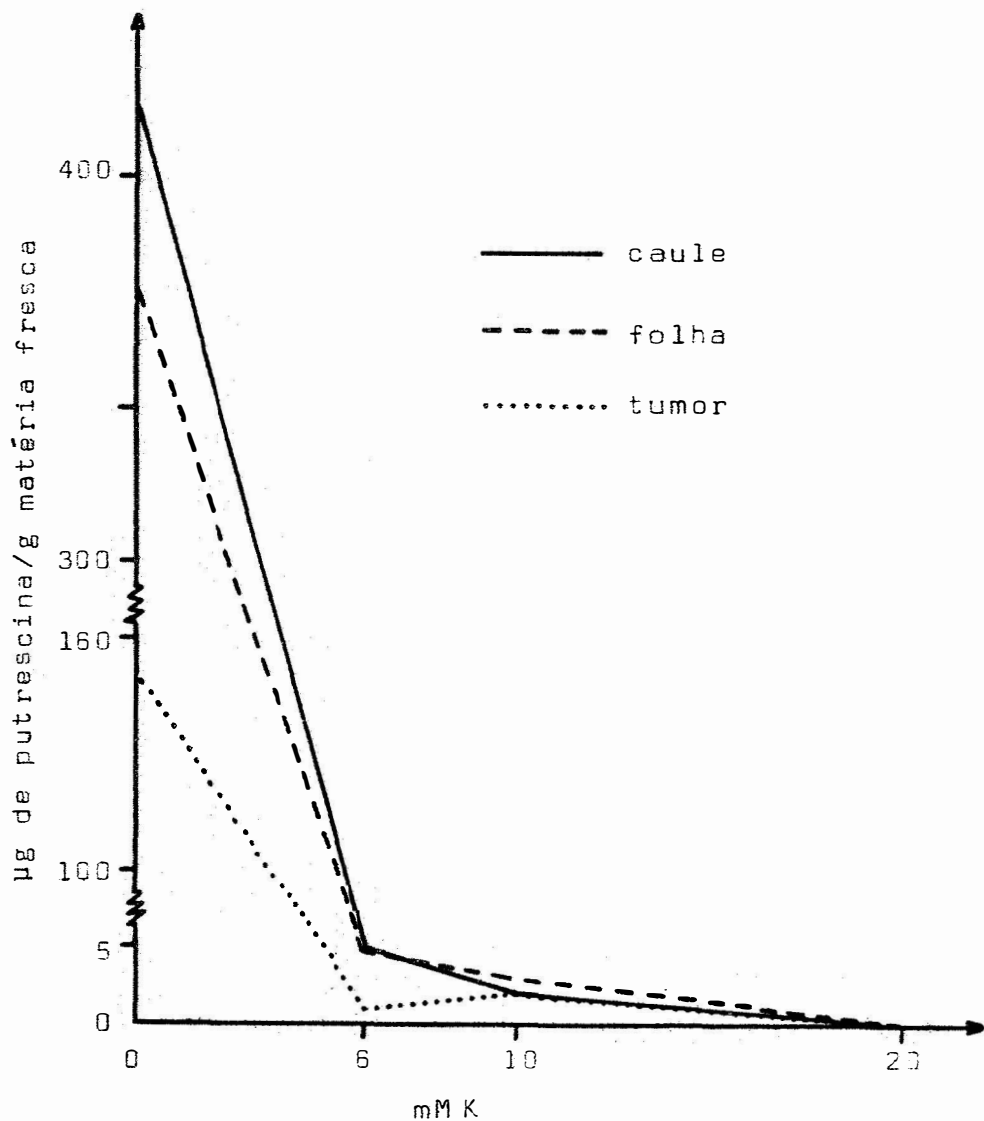


Figura 6 - Variações nos teores de putrescina de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

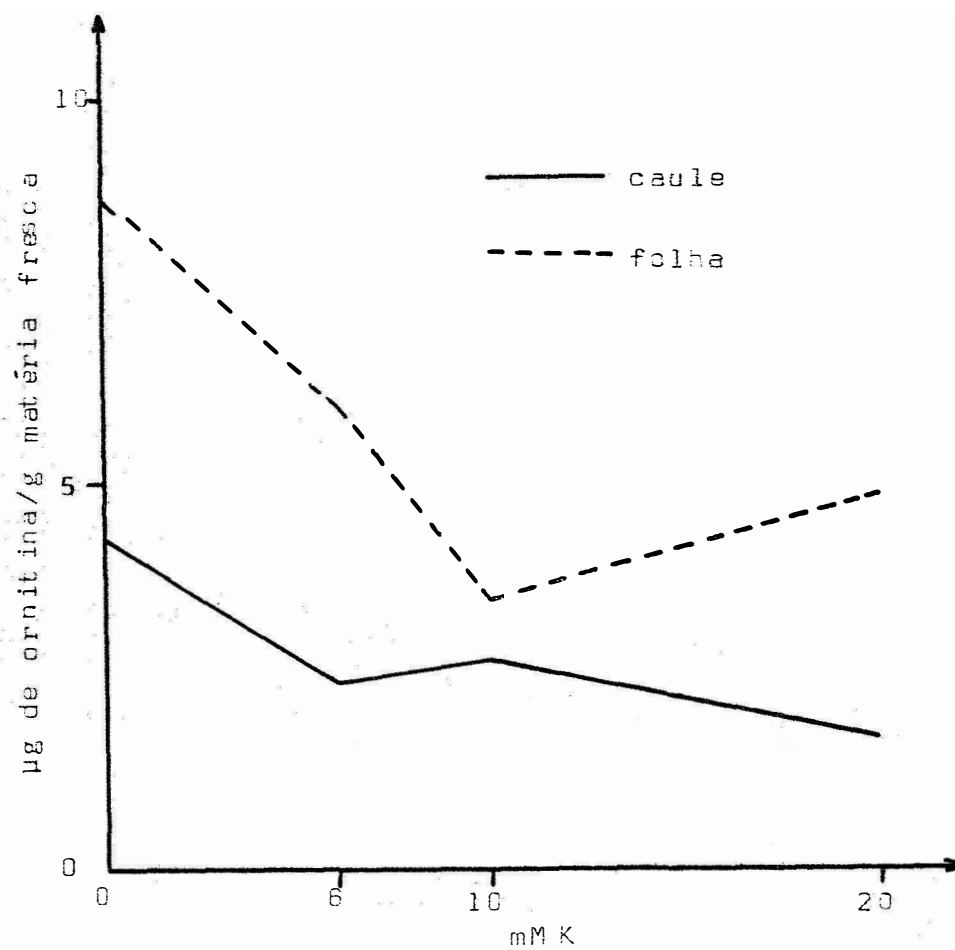


Figura 7 - Variações nos teores de ornitina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

das com *A. tumefaciens* (Figura 8) também apresentaram concentrações mais altas de ornitina na dose de 0mM de potásssio, com teor mais elevado nos tumores.

O teor mais alto de arginina em folhas e caules de plantas não inoculadas (Figura 9) foi na dose de 0mM de potássio; nas folhas, o valor obtido foi aproximadamente o dobro daquele encontrado nos caules. Nos tumores e caules de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* (Figura 10) o teor mais elevado desse aminoácido foi na dose de 0mM de potássio. As folhas apresentaram, na dose de 0mM de potássio, concentração de arginina inferior a de tumores e caules, sendo os valores obtidos praticamente constantes em todas as doses de potássio.

A Figura 11 mostra que em folhas e caules de plantas não inoculadas, os teores mais elevados de agmatina foram na dose de 0mM de potássio; observa-se um decréscimo de 65% no teor de agmatina da dose de 0mM de potásssio para a de 6mM de potássio na análise dos caules. Nos tumores obtidos de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* (Figura 12) a concentração mais alta de agmatina foi na dose de 10mM de potássio; nas doses de 0; 6,0 e 20,0mM de potássio houve um decréscimo no teor de agmatina que variou de 55 a 60%. Nas folhas e caules o teor mais elevado foi na dose de 0mM de potássio.

Os teores mais elevados dos aminoácidos arginina, citrulina e ornitina em caules e folhas de plantas de gergelim não inoculadas e deficientes em potássio podem ser interpretados como decorrência da diminuição na incorporação dos mesmos em peptídeos. Desses aminoácidos que fazem parte do ciclo da ornitina-uréia, apenas arginina é conhecida como constituinte de proteínas. O aumento no

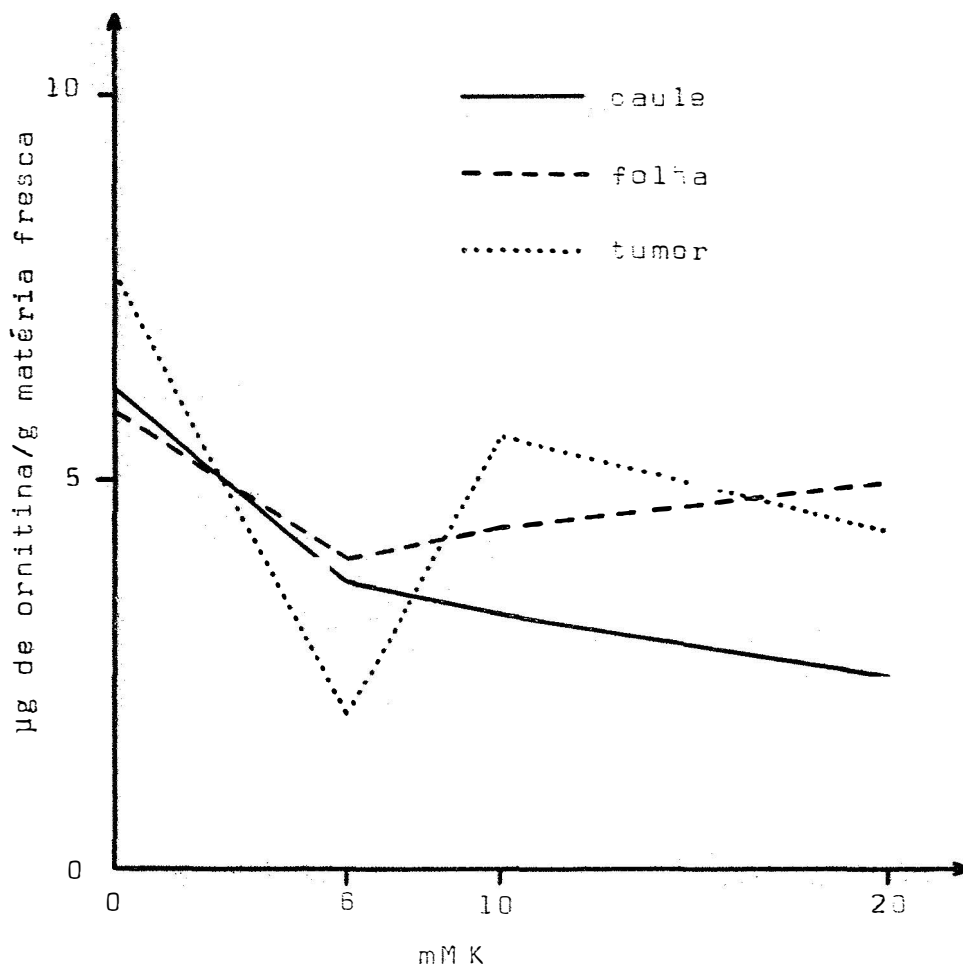


Figura 8 - Variações nos teores de ornitina de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

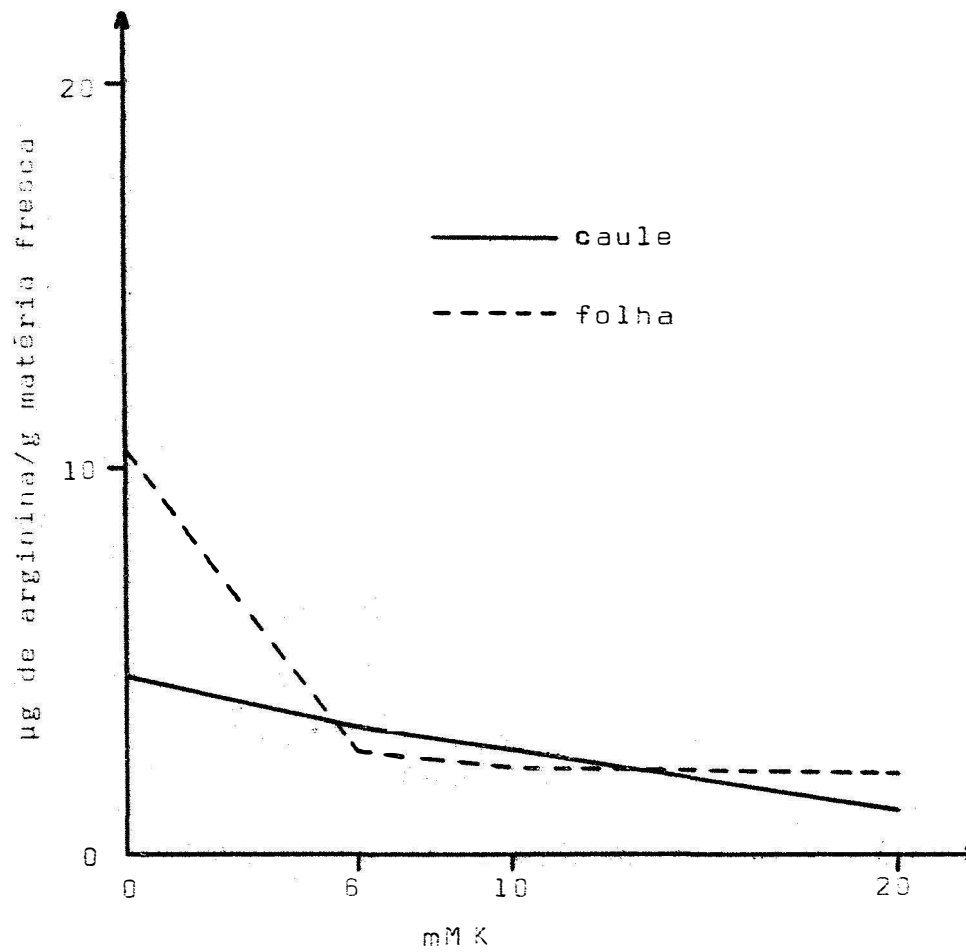


Figura 9 - Variações nos teores de arginina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

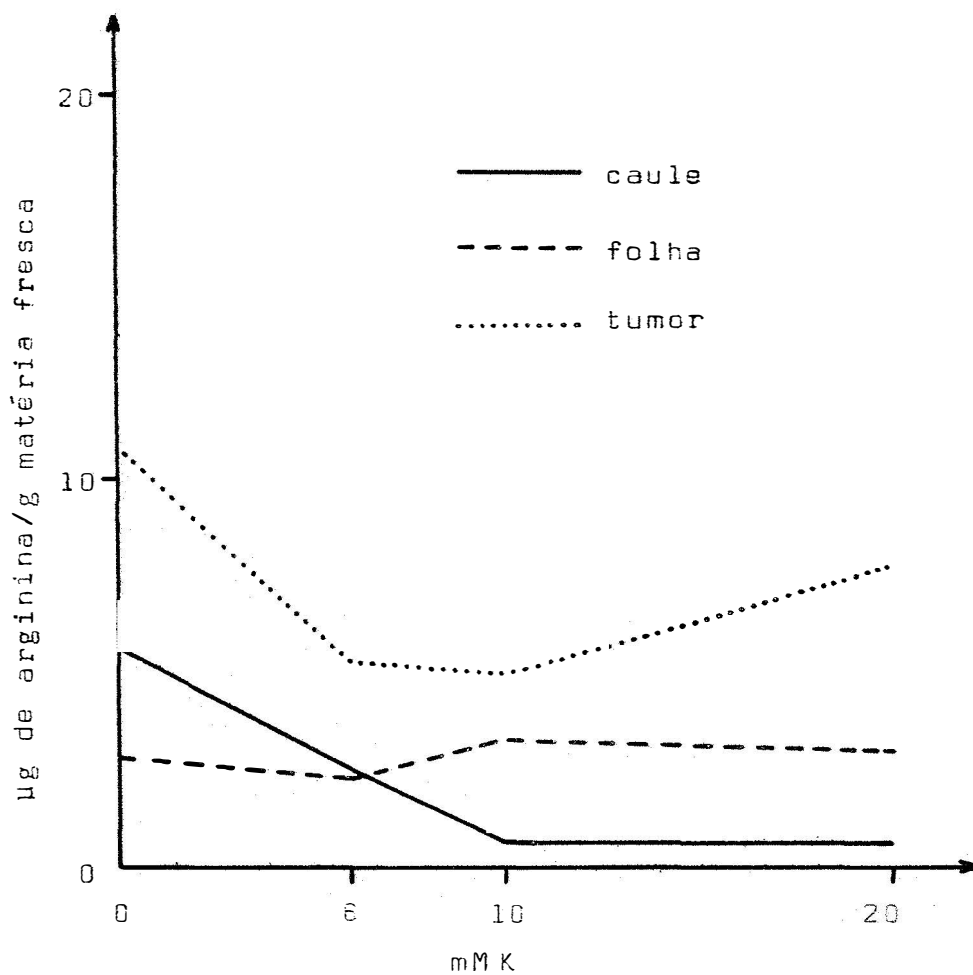


Figura 10 - Variações nos teores de arginina de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.



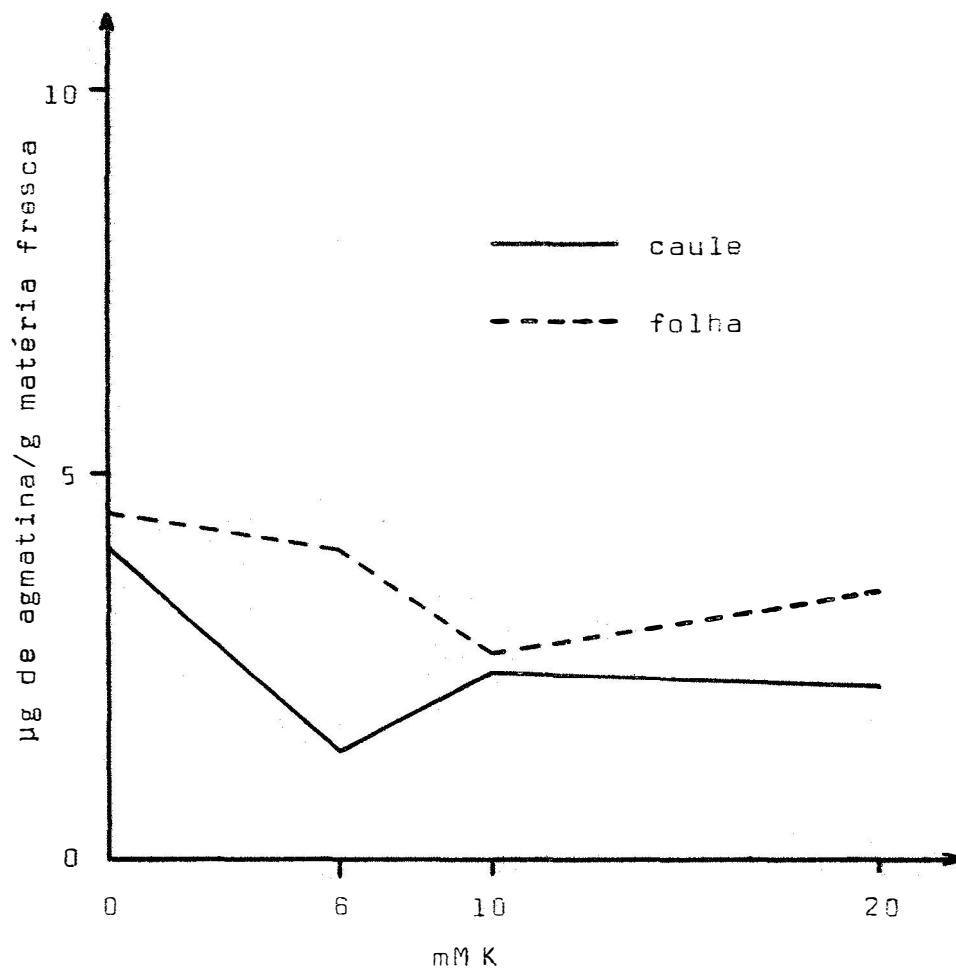


Figura 11 - Variações nos teores de agmatina de plantas não inoculadas e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

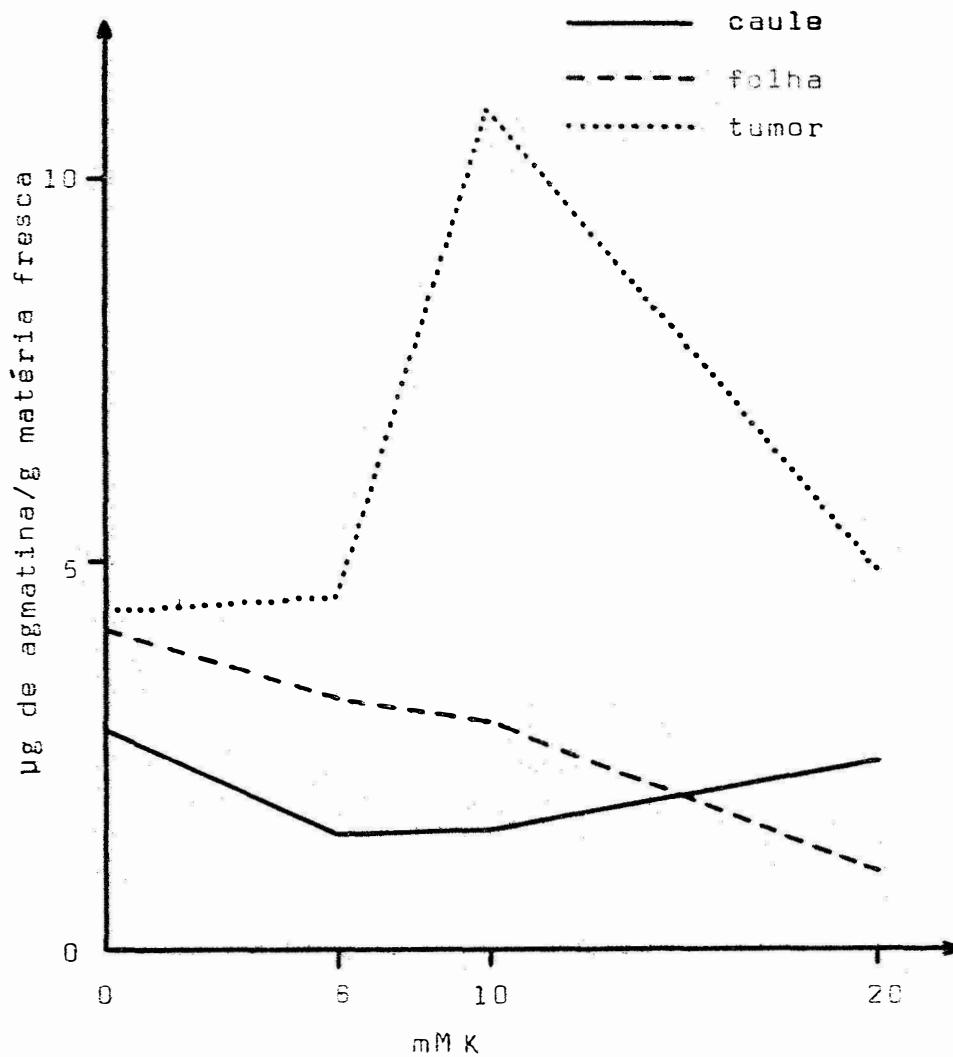


Figura 12 Variações nos teores de agmatina de plantas inoculadas com *A. tumefaciens* e desenvolvidas em diferentes níveis de potássio.

teor de arginina decorrente de sua não utilização na síntese de proteínas poderia ocasionar uma elevação nos teores de citrulina e ornitina, aminoácidos não protéicos.

Ademais os resultados obtidos eram esperados uma vez que plantas deficientes em potássio mostram um aumento na atividade de decarboxilases desses aminoácidos, levando ao acúmulo das respectivas aminas, agmatina, N-carbamilputrescina e putrescina (SMITH, 1963; CROCOMO *et al.*, 1970). Os dados obtidos mostraram que os teores de putrescina foram bem mais elevados do que os das outras a<sup>mi</sup>nas e isto está de acordo com a bibliografia correlata já que uma característica da deficiência de potássio no metabolismo nitrogenado é o acúmulo de putrescina; além disso, o acúmulo de putrescina em maiores quantidades foi compatível com a sequência de sua síntese segundo esquema metabólico operante em plantas superiores proposto por SMITH (1970).

Nos tumores obtidos de plantas inoculadas com *A. tumefaciens*, o teor de putrescina endógena, na dose de 0mM de potássio, foi superior ao das outras aminas e aminoácidos do ciclo da ornitina-uréia. Em tumores de *Scorzonera hispanica*, BAGNI (1972) encontrou maiores quantidades de putrescina do que em tecidos normais. Além do efeito da deficiência de potássio, a alta concentração de putrescina nos tumores pode estar relacionada com o teor hiperauxínico apresentado pelas células tumorais. COCUCCI e BAGNI (1968) observaram que o teor de poliaminas rapidamente se eleva quando explantes de tubérculos foram incubados com ácido indolacético (AIA) e sugerem que o efeito do AIA em promover o crescimento e a síntese de proteínas depende da indução promovida pela auxina em ativar a síntese de poliaminas. O alto teor de putrescina encontrado

nos tumores do presente experimento mostra realmente que esta substância parece ser essencial à divisão celular uma vez que putrescina e poliaminas interagem com ácidos nucleicos (STEVENSON, 1970; COHEN, 1971) e portanto é lícito supor-se que ela esteja envolvida com o rápido crescimento dos tumores (BAGNI e FRACASSINI, 1974) e com a bioquímica da morfogênese.

#### 4.2. Níveis de putrescina, espermina e espermidina

##### 4.2.1. Tumores e folhas de gergelim (experimento 3.5.2.1.)

A Tabela 1 mostra que o conteúdo de putrescina nos tumores foi maior do que nas folhas. Neste experimento as plantas se desenvolveram em solução nutritiva completa, portanto com teor normal em potássio. O acúmulo de putrescina em condições de deficiência de potássio é uma característica já descrita em várias espécies de plantas. Ora, apesar do maior teor de putrescina ter sido nos tumores, os baixos valores aí encontrados parecem comprovar o papel do potássio no metabolismo das poliaminas também em tecido neoplástico.

Tabela 1 - Resultados da análise de putrescina, espermidina e espermina em tumores "crown-gall" e folhas de plantas de gergelim.

Amostras	µmoles/g de amostra			PUT/SPD*	PUT/SPN*
	Putrescina	Espermidina	Espermina		
Tumor	$71,50 \times 10^{-3}$	$61,0 \times 10^{-3}$	$11,35 \times 10^{-3}$	1,17	6,29
Folha	$61,50 \times 10^{-3}$	$118,0 \times 10^{-3}$	$18,0 \times 10^{-3}$	0,52	3,41

\* PUT = Putrescina; SPD = Espermidina; SPN = Espermina

Aliás, *INOUE e PARDEE (1970)* demonstraram que as poliaminas são essenciais à divisão celular em *Escherichia coli*. Nessa bactéria, a relação molar entre putrescina e espermidina influenciou na indução da síntese de proteínas envolvidas na formação da membrana celular, que em última análise afeta a proliferação celular. Alta concentração de putrescina relativa à espermidina parece ser necessária na divisão celular. Em nosso experimento essa relação nos tumores foi 2,25 vezes maior do que nas folhas onde o metabolismo é bastante ativo. Este resultado parece sugerir que as poliaminas exercem algum papel na divisão anômala de células cancerosas que se dividem de maneira contínua não respondendo mais aos sinais reguladores. Por outro lado, o teor de espermidina nas folhas foi aproximadamente 2 vezes maior do que nos tumores, embora nestes o teor de putrescina tenha sido maior. Esta observação pode estar relacionada com modificações metabólicas devido ao estado tumoral, pois os nossos dados parecem in

dicar uma diminuição na síntese de espermidina nessas células. Os teores de espermina tanto em tecido normal como nos tumores são bem menores do que os de putrescina nesses mesmos tecidos, como o atestam as relações putrescina/espermina indicadas na última coluna da Tabela 1. Em tecido de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), *BASSO e CROCOMO, 1975* (não publicado) observaram que de fato, em folhas de plantas deficientes ou não em potássio, à medida que o teor de putrescina aumenta com o tempo, o nível de espermina decresce de uma maneira correspondente. Os dados relativos a tecidos de folhas de gergelim, uma oleaginosa parecem comprovar aquela observação feita em feijão, uma leguminosa. Ainda mais, essa condição parece repetir-se nas células de tumores "crown-gall".

#### 4.2.2. Calos obtidos da cultura de tumores *in vitro* (experimento 3.5.2.2.)

Observa-se pela Tabela 2, a tendência do teor de putrescina aumentar nos calos quando se aumenta o teor de putrescina no meio. Uma possível explicação para os resultados obtidos nas doses de 2,5 e 5,0  $\mu$ moles seria uma intensa metabolização da putrescina absorvida. Considerando-se a relação molar de putrescina e espermidina, que é crítica na divisão celular (*INOUE e PARDEE, 1970*), nota-se que a dose ótima de putrescina como fator de crescimento foi a de 0,25  $\mu$ moles de putrescina adicionada ao meio de cultura, uma vez que aquela relação foi mais alta nessa dose. Evidentemente, tratando-se de células não diferenciadas, a dose de putrescina que determinou melhor resultado (0,25  $\mu$ moles) foi bem menor do que a melhor dose observada (2,5  $\mu$ M) no desenvolvimento de tumores *in vivo*, como pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 2 - Resultados da análise de putrescina, espermidina e espermina em calos de tumores obtidos em meio de cultura com várias doses de putrescina.

Putrescina $\mu$ moles/10 ml meio	$\mu$ moles/g de amostra			PUT/SPD
	Putrescina	Espermidina	Espermina	
0,0	4.674	925,5	324	5,05
0,25	4.920	308,5	756	15,94
2,5	2.214	740,4	324	2,99
5,0	2.460	740,4	540	3,32
15,0	7.134	987,2	432	7,22
20,0	8.266	1.234,0	324	6,69

Os dados mostrados na Tabela 3 foram obtidos quando as plantas se desenvolveram em solução nutritiva completa e deficiente em potássio (experimento 3.3.) e foram injetadas com 0,0, 0,25 e 5,0  $\mu$ M de putrescina. Os resultados mostram a média e os valores máximo e mínimo obtidos em cada tratamento. Esses dados mostram claramente que a formação de tumores *in vivo* em termos de peso seco foi maior quando as plantas estavam crescendo em solução nutritiva contendo 6 mM de potássio por litro. Isto poderia ser esperado uma vez que essas plantas crescendo em condições normais estavam melhor desenvolvidas do que as que eram mantidas em ausência de potássio (0,0 mM de potássio). Entretanto, em ambas as condições os tumores "crown-gall" apresentaram melhor desenvolvimento em presença de 2,5  $\mu$ M de putrescina injetada seja no caule, seja no ápice.

Tabela 3 - Pesos fresco e seco de tumores "crown-gall" induzidos em rúcula de ger-  
gelim (*Sesamum indicum* L.) por *A. tumefaciens* B<sub>6</sub>.

		0		6	
Potássio (mM)		peso fresco*	peso seco*	peso fresco*	peso seco*
	Putrescina ( $\mu$ M)	Gramas tumor/planta			
0,0	17,92 $\times 10^{-2}$	8,94 $\times 10^{-2}$	1,15 $\times 10^{-2}$	19,28 $\times 10^{-2}$	2,93 $\times 10^{-2}$
		2,30 $\times 10^{-2}$	3,66 $\times 10^{-2}$	23,95 $\times 10^{-2}$	3,64 $\times 10^{-2}$
		28,42 $\times 10^{-2}$		30,75 $\times 10^{-2}$	4,67 $\times 10^{-2}$
2,5	30,50 $\times 10^{-2}$	29,43 $\times 10^{-2}$	3,53 $\times 10^{-2}$	29,40 $\times 10^{-2}$	4,91 $\times 10^{-2}$
		3,66 $\times 10^{-2}$	3,90 $\times 10^{-2}$	36,23 $\times 10^{-2}$	6,05 $\times 10^{-2}$
		32,55 $\times 10^{-2}$		47,04 $\times 10^{-2}$	7,86 $\times 10^{-2}$
5,0	16,12 $\times 10^{-2}$	14,66 $\times 10^{-2}$	2,41 $\times 10^{-2}$	24,20 $\times 10^{-2}$	3,80 $\times 10^{-2}$
		2,65 $\times 10^{-2}$	2,92 $\times 10^{-2}$	28,58 $\times 10^{-2}$	4,49 $\times 10^{-2}$
		17,73 $\times 10^{-2}$		45,00 $\times 10^{-2}$	7,08 $\times 10^{-2}$

\* O número situado à direita e acima do número principal, indica o peso mínimo e o número situado à direita e abaixo indica o peso máximo obtido. Desse modo o número à esquerda (número principal) é a média dos pesos fresco e seco encontrados.



## 4.3. Lipídeos totais e ácidos grãxos (Experimento 3.5.3)

A Tabela 4 mostra que entre os níveis 0,25 a 20,0  $\mu$ moles de putrescina, praticamente não houve diferença nos teores de lipídeos totais. Observa-se, porém, que no nível 0,0, isto é, quando putrescina não foi adicionada ao meio, o teor de lipídeos foi mais alto, mostrando com isso possivelmente um consumo de lipídeos na formação dos calos, o que estaria relacionado com o peso seco apresentado pelos calos desses mesmos tumores (Tabela 5).

Tabela 4 - Teores de lipídeos totais nos calos obtidos de explantes de tumores "crown-gall" cultivados em meio de cultura com várias doses de putrescina.

PUTRESCINA $\mu$ moles/10 ml meio	LIPÍDEOS TOTAIS g/100 g matéria seca
0,0	9,78
0,25	4,89
0,50	6,97
5,00	5,19
10,00	6,33
15,00	6,32
20,00	5,98

Observa-se pela Tabela 5 que o maior teor de matéria seca foi na dose de 0,0  $\mu$ moles de putrescina onde os calos obtidos foram muito pequenos. Nas outras doses de putrescina, os calos obtidos foram maiores e isto implicou numa maior absorção de água e conseqüentemente numa diminuição da matéria seca.

Tabela 5 - Peso seco dos calos obtidos de explantes de tumores "crown-gall" cultivados em meio de cultura com várias doses de putrescina.

PUTRESCINA $\mu$ moles/10 ml meio	PESO SECO g/100 g (%)
0,0	12,79
0,25	5,21
0,50	5,52
5,00	5,47
10,00	5,13
15,00	7,81
20,00	6,65

Os teores de ácidos graxos saturados e insaturados nos calos dos tumores estão apresentados na Tabela 6. Entre os primeiros, o ácido palmítico (16:0) foi encontrado em maior teor, seguido do ácido esteárico (18:0). Não se considerando a dose de 0,25  $\mu$ moles de putrescina, observa-se que o teor de ácido palmítico (16:0) aumenta até a dose de 5,0  $\mu$ moles de putrescina e depois decresce nas doses seguintes; o mesmo ocorre para o ácido araquídico (20:0). Em relação aos ácidos insaturados, obser-

va-se que o ácido oleico (18:1) predomina em alguns tratamentos. Nas doses mais elevadas de putrescina (10,0 e 20,0  $\mu$ moles), os teores de ácido linoleico (18:2) foram bem maiores do que nas outras doses.

Tabela 6 - Teores de ácidos graxos nos calos obtidos de explantes de tumores "crown-gall", cultivados em meio de cultura com várias doses de putrescina.

ÁCIDOS GRAXOS*	PUTRESCINA							
	$\mu$ moles/10ml de meio	0	0,25	0,50	5,0	10,0	15,0	20,0
% em relação aos ácidos graxos totais								
14:0	1,41	1,64	1,15	1,31	1,46	1,81	1,48	
16:0	42,38	60,46	45,51	51,63	47,73	45,31	41,66	
18:0	8,15	9,42	17,94	11,61	12,10	13,58	10,19	
20:0	3,69	6,07	5,19	7,59	7,26	3,39	4,10	
22:0	3,39	5,60	4,81	7,06	14,35	3,67	2,78	
Total de saturados	59,02	83,19	74,60	79,20	82,90	67,76	60,21	
16:1	1,95	2,39	2,56	3,14	2,49	3,62	2,22	
16:2	1,22	1,68	1,79	1,67	2,34	2,89	1,33	
16:3	0,99	1,02	2,59	2,00	2,14	2,04	1,33	
18:1	9,12	9,23	13,45	10,20	5,24	10,00	14,94	
18:2	20,85	1,05	2,56	1,77	1,38	10,77	15,57	
18:3	6,84	1,42	2,54	2,01	3,49	2,90	4,34	
Total de insaturados	40,97	16,79	25,49	20,79	17,08	32,22	38,40	

\* Número de átomos de carbono: número de duplas ligações.

---

## 5. CONCLUSÕES

---

---

Os resultados obtidos nos experimentos aqui discutidos permitiram as seguintes conclusões gerais:

- A deficiência de potássio levou a um aumento nos teores dos aminoácidos do ciclo da ornitina-uréia (arginina, citrulina e ornitina e das aminas correspondentes (agmatina, N-carbamil-putrescina e putrescina) nos caules, folhas e tumores "crown-gall" de plantas de gergelim.

- O alto teor de putrescina relativo à espermidina encontrado nos tumores *in vivo* de plantas desenvolvidas em solução nutritiva completa, parece indicar que as poliaminas tenham alguma influência na divisão anômala de células cancerosas.
  
- Na formação de calo a partir de explantes de tumores "crown-gall", a dose ótima de putrescina adicionada ao meio de cultura foi de 0,25  $\mu\text{moles}$ , enquanto que no desenvolvimento dos tumores *in vivo*, a dose ótima de putrescina injetada nas plantas foi de 2,5  $\mu\text{M}$ .
  
- Os diferentes teores de putrescina adicionados ao meio de cultura não afetaram os teores de lipídeos totais, porém alteraram a proporção dos ácidos graxos dos calos formados a partir de explantes de tumores "crown-gall".

---

## 6. RESUMO

---

---

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo do papel de aminas no desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de tumores "crown-gall" em gergelim (*Sesamum indicum L.*).

As plantas de gergelim foram cultivadas em soluções nutritivas de Hoagland e Arnon, variando-se os níveis de potássio. Os "seedlings" foram inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*, cepa virulenta B<sub>6</sub>, e os tumores obtidos foram colhidos 30 dias após inoculação.

Para se verificar a influência de putrescina no

desenvolvimento dos tumores *in vivo*, 3 lotes de plantas obtidas como acima mencionado, receberam injeções de 0,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de putrescina - HCl, dois dias após a inoculação da bactéria.

Explantos de tumores obtidos de plantas cultivadas em solução nutritiva completa (6 mM de potássio) foram inoculados em meio de cultura com várias doses de putrescina.

Os aminoácidos (arginina, citrulina e ornitina), as aminas (agmatina, N-carbamilputrescina e putrescina), extraídos com etanol 80% de folhas intactas, caules e tumores, foram fracionados em resina de troca catiônica Amberlite IRC-50 ( $\text{H}^+$ ) e Dowex 50W X-8 ( $\text{H}^+$ ). Depois de isolados por cromatografia em papel de filtro foram feitas as determinações quantitativas.

Os níveis de putrescina, espermina e espermidina foram determinados usando-se analisador automático de aminoácidos (Beckman, modelo 120C). Essas mesmas substâncias foram analisadas nos calos obtidos da cultura de tumores *in vitro*, por cromatografia em camada delgada usando-se densitômetro (Vitraton TLD-100) para se medir a intensidade de fluorescência.

Os dados obtidos permitiram mostrar que também em tumores "crown-gall" de plantas de gergelim, a deficiência de potássio foi crítica no aumento dos teores dos aminoácidos do ciclo da ornitina-uréia e das aminas correspondentes, principalmente putrescina. A relação molar entre putrescina e espermidina encontrada nos tumores *in vivo* pareceu indicar possível influência das poliaminas na indução e regulação da proliferação de célu-

las cancerosas. Também foi observado que putrescina, em determinadas doses, influenciou a formação de calos a partir de explantes de tumores "crown-gall", bem como o desenvolvimento dos tumores *in vivo*.



---

## 7. SUMMARY

---

The objective of this work was to investigate the role of amines *in vivo* and *in vitro* in the development of tumors in "gergelim" (*Sesamum indicum* L.).

Seedlings of "gergelim" (*Sesamum indicum* L.) were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*, strain B<sub>6</sub>, and grown in the nutrient solution of Hoagland and Arnon at several concentrations of potassium (0.0; 6.0; 10.0; 20.0 mM) to study the effects of potassium on amine synthesis and tumor development. Tumors were harvested 30 days following inception for initiating plant tissue cultures and/or for chemical analysis. The tumor tissue

cultures were maintained on PSR tissue culture medium.

The influence of putrescine concentration on tumor development was studied in seedlings injected with specific concentrations of putrescine (0.0; 2.5; 5.0  $\mu$ M). The injection was administered two days following the inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* at a site apical to the bacterial inoculation.

The amino acids (arginine, citrulline and ornithine) and amines (agmatine, N-carbamylputrescine and putrescine) were extracted from intact leaves, stems and tumors, with 80% ethanol and fractionated on cation exchange resins Amberlite IRC-50 ( $H^+$ ) and Dowex 50W X-8 ( $H^+$ ). After their subsequent separation by paper chromatography, each compound was determined quantitatively.

The putrescine, spermine and spermidine concentrations were determined using a Beckman amino acid analyzer, model 120C. These substances were analysed fluorimetrically for the tumor tissue grown *in vitro*.

In crown-gall tumors, the endogenous concentrations of amino acids and amines, mainly putrescine, are significantly higher for plants grown in nutrient solution containing 0.0 mM of potassium compared to the 6.0; 10.0; 20.0 mM concentrations of potassium.

The size of tumors are large for plants grown at the 0.0 and 6.0 mM concentrations of potassium being slightly larger in the latter.

Chemical analysis reveal an almost three-fold increase in the endogenous putrescine/spermidine concentrations ratios in crown-gall tumor tissues as compared to normal tissues. Likewise, tumor tissues grown *in vitro* are characterized by high putrescine/spermidine concentration ratios which exceed those observed *in vivo*. Tumor tissues cultured on a medium supplemented with 0.25  $\mu$ moles putrescine undergo rapid cell proliferation and have an extremely high putrescine/spermidine concentration ratio of 15.94. The results suggest a possible role for the polyamines in the induction and regulation of cancer cell proliferation.

---

## 8. BIBLIOGRAFIA

---

---

AARON DA CUNHA, M.I. (1972). Recherches sur la permanence et la transmission des propriétés tumorales des cellules de crown-gall. Ann. Sc. Nat. Bot., 12<sup>e</sup> série, 11:333-408.

ASCOLI, F. (1968). Controllo delle poliammine sulla asimmetria della sintesi DNA-dipendente dell'RNA. Quaderni de "La ricerca scientifica", 47:126-129.

BAGNI, N., D.S. FRACASSINI e E. CORSINI (1972). Tumor of *Scorzonera hispanica*: their content in polyamines. Z. Pflanzenphysiol., 67:19-23.

BAGNI, N. e D.S. FRACASSINI (1974). The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. Proc. Conf. on Plant Growth Substances, Tokyo (1973), part VII (in press).

BASSO, L.C. (1973). Significado bioquímico da deficiência de potássio na formação de amins em gergelim (*Sesamum indicum* L.). Tese de Doutorado, 80 pág. mimeogr., Botucatu (SP).

BASSO, L.C. (1974). Formação de di- e poliaminas em plantas deficientes em potássio e magnésio. Tese de Mestrado, 40 pág. mimeogr., Piracicaba (SP).

BENDER, E. e W. BRUCKNER (1954). Weitere versuche zur zellfreien tumorerzeugung an pflanzen. III. Zeit. Bot., 10(47):258-269.

BENDER, E. e W. BRUCKNER (1956). Studien zur zellfreien tumorübertragung an pflanzen. I. Zeit. Bot., 44: 531-542.

BENDER, E. e W. BRUCKNER (1958). Studien zur zellfreien tumorübertragung an pflanzen. II. Zeit. Bot., 46: 121-124.

*BRAUN, A.C. (1943)*. Studies on tumor inception in the crown-gall disease. *Amer. J. Bot.*, 30:674-677.

*BRAUN, A.C. (1974a)*. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall. *Amer. J. Bot.*, 34:234-240.

*BRAUN, A.C. (1947b)*. Recent advances in the physiology of tumor formation in the crown-gall disease of plants. *Growth*, 11:325-337.

*BRAUN, A.C. (1951b)*. Cellular autonomy in crown-gall. *Phytopathology*, 41:963-966.

*BRAUN, A.C. (1952)*. Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in crown-gall. *Growth*, 16:63-74.

*BRAUN, A.C. e U. NÄF (1954)*. A non-auxinic growth-promoting factor present in crown-gall tumor tissue. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 86:212-214.

*BRAUN, A.C. e T. STONIER (1958)*. Morphology and physiology of plant tumors. *Protoplasmatologia*, 10(5a):1-93.

*CHINARD, F.P. (1952)*. Photometric stimulation of proline and ornithine. *Journ. Biol. Chem.*, 199:91.

- COCUCCI, S. e N. BAGNI (1968). Polyamine induced activation of protein ribosomal preparation from *Helianthus tuberosus* tissue. Life Science, 7:113-120.
- COHEN, S.S. (1971). Introduction to the polyamines. Printice-Hall Inc. Englewood Cliffs. N.J., 178 pág.
- CROCCOMO, O.J. e C. ROSSI (1967). Determinação quantitativa de putrescina por cromatografia em papel de filtro. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 24:131-140.
- CROCCOMO, O.J., O.G. BRASIL e L.C. BASSO (1970). Formation of N-carbamylputrescine from citrulline in *Sesamum*. Phytochemistry, 9:1487-1489.
- DE ROPP, R.S. (1947a). The response of normal plant tissue and of crown-gall tumor tissues to synthetic growth hormones. Amer. J. Bot., 34:53-62.
- De ROPP, R.S. (1948). The interaction of normal and crown-gall tumor tissue *in vitro* grafts. Amer. J. Bot., 35:372-377.
- DION, A.S. e S.S.COHEN (1972). Polyamine in the synthesis of bacteriophage deoxiribonucleic acid: II. Requirement for polyamine in T<sub>4</sub> infection of polyamine auxotroph. Journal of Virology, 9:423-430.

- DRLICA, K.A. e C.I. KADO (1974)*. Quantitative estimation of *Agrobacterium tumefaciens* DNA in crown-gall tumor cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71(n.9): 3677-3681.
- FOLCH, J., M. LESS e G.H. SLOANE-STANSLEY (1957)*. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226:497-508.
- GAUTHERET, R.J. (1947a)*. Existe-t-il un cancer des plants? Université de Paris. Conference au Palais de la Découverte, Paris, France.
- GIBBOE, D.D. e J.N. WILLIAMS (1956)*. Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 91:535-536.
- GOLDMANN, A., J. TEMPÉ e G. MOREL (1968)*. Quelques particularités de diverses souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. C.R. Soc. Biol., 102:630-631.
- GOLDMANN, A. (1970)*. Recherches sur le métabolisme azoté des tissus de crown-gall cultivés *in vitro*. Ann. Sc. Nat. Bot., 12<sup>e</sup> série, 11:223-310.
- GOLDSTEIN, J. (1966)*. Resistance of RNA to thermal denaturation in the presence of polyamines. Biochim. Biophys. Acta, 123:620-623.



HATANO, H., K. SUMIZU, S. ROKUSHIKA e F. MURAKAMI (1970).

Automatic liquid chromatography of primary mono and diamines on a cation-exchange resin. Analytical Biochemistry, 35:377-383.

HOAGLAND, D.R. e D.I. ARNON (1950). The water culture

method of growing plants without soil. Circ. Calif. Agric. Exp. Sta, n° 347.

HOFSTETTER, H.H., N. SEN e R.T. HOLMAN (1965). Character-

ization of insaturated fatty acids by gas-liquid chromatography. J. Am. Oil Chemists', 42:537-540.

INOUE, M. e A.B. PARDEE (1970). Requirement of

polyamines for bacterial division. Journal of Bacteriology, 101:770-776.

JENSEN, C.O. (1910). Von echten geschwülsten bei

pflanzen. Deuxième Conférence Intern. pour l'Étude du Cancer. Paris, pg.243-254., in den Kgl. Veterinaer-og Landbohojskoles Serumlab. VII.

KLEIN, R.M. (1953). Mechanisms of crown-gall induction.

Brookhaven Symposia in Biology, 6:96-114.

KLEIN, R.M. e J.L. KNUPP (1957). Sterile induction of

crown-gall tumors on carrot tissue *in vitro*. Proc. nation. Acad. Sci. U.S., 43:199-203.

KOVOOR, A. (1967). Sur la transformation des tissus normaux de *Scorsonère* provoquée *in vitro* par l'acide désoxyribonucléique d'*Agrobacterium tumefaciens*. C.R. Acad. Sci., 265:1613-1626.

KREMZNER, L.T., R.E. BARRET e M.J. TERRANO (1970). Polyamine metabolism in the central and peripheral nervous system. Ann. N.Y. Acad. Sci., 171:735-748.

KUKDJIAN, A. (1968). Apparition de phages au cours de l'induction de tumeurs de crown-gall. Microsc., 7: 1039-1044.

KULESCHA, Z. e R. GAUTHERET (1948). Sur l'élaboration de substances de croissance par 3 types de cultures de tissus de *Scorsonère*: cultures normales, cultures de crown-gall et cultures accoutumées à l'hétéro-auxine. C. R. Acad. Sci. Par., 227:292-294.

KULESCHA, Z. (1954). Croissance et teneur en auxine de divers tissus normaux et tumoraux. L'Année Biologique 3<sup>e</sup> sér. 30:319-327.

LUDDY, F.E., R.A. BARFORD e R.W. RIEMENSCHNEIDER (1960). Direct conversion of lipid components to their fatty acid methyl esters. J. Am. Oil Chemists' Society, 37:447-451.

MANDEL, M. (1962). The interaction of spermine and native deoxyribonucleic acid. J. Mol. Biol., 5: 435-441.

MANIGAULT, P. e C. STOLL (1960). Induction et croissance de tumeurs végétales exemptes de bactéries. *Phytopath. Zeit.*, 38:1-12.

MILO, G.E. e B.I.S. SRIVASTAVA (1969). RNA-DNA hybridization studies with the crown-gall bacteria and the tobacco tumor tissue. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 34:196-199.

MOREL, G.M., A. GOLDMANN e J. TEMPÉ (1969). Evidence for the transmission of a permanent information from *A. tumefaciens* to the plant cell during tumoral transformation. XI<sup>e</sup> International Botanical Congress, Seattle, Abstracts, 151.

MOREL, G. (1970). Le problème de la transformation tumorale chez les végétaux. *Physiol. Vég.*, 8:189.

MOREL, G. (1972). Le cancer des plantes. *La Recherche*, n° 20, 3:119-128.

NAKAMOTO, T. e E. HAMEL (1968). The activation of 50S and 30S *E. coli* ribosomes for polyphenylalanine synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 59:233-245.

PARSONS, C.L. e R.E. BEARDSLEY (1968). Bacteriophage activity in homogenate of crown-gall tissue. *J. Virol.* 2:651.

PEEG, A.E. e H.G. WILLIAMS-ASHMAN (1969). On the role of S-adenosyl-L-methionine in the biosynthesis of spermidine by rat prostate. Journ. Biol. Chem., 224:682-693.

QUÉTIER, F., T. HUGUET e E. GUILLE (1969). Induction of crown-gall: partial homology between tumor-cell DNA, bacterial DNA and the G+C-rich DNA of stressed normal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 34: 128-133.

SCHILPEROORT, R.A., N.J. van SITTERT e J. SCHELL (1973). The presence of both phage PS8 and *Agrobacterium tumefaciens* A<sub>6</sub> DNA base sequences en A<sub>6</sub> induced crown-gall tissue cultured *in vitro*. Eur. J. Biochem., 33:1-7.

SHARP, W.R. e L.S. CALDAS (1972). Course on application of nuclear energy in plant tissue culture. Vol. II, pag.8, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba (SP).

SMITH, E.F. e C.O. TOWNSEND (1970a). Einpflanzen tumor bakteriellen. Ursprungs. Cbl. Bakter. usw., Abt. II, 20:89-91.

SMITH, E.F. e C.O. TOWNSEND (1970b). A plant-tumor of bacterial origin. Science, 25:671-673.

SMITH, T.A. e F.J. RICHARDS (1962). The biosynthesis of putrescine in higher plants and its relation to potassium nutrition. Biochem. Journal, 84:292-294.

SMITH, T.A. (1963). L'arginine carboxy-lyase of higher plants and its relation to potassium nutrition. *Phytochemistry*, 2:241-252.

SMITH, T.A. e C. SINCLAIR (1967). The effect of acid feeding on amine formation in barley. *Annals of Botany*, 31(121):103-111.

SMITH, T.A. (1970). The biosynthesis and metabolism of putrescine in higher plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 171:988-1001.

SMITH, T.A. (1971). The occurrence, metabolism and functions of amines in plants. *Biological Reviews*, 46:201-241.

SMITH, T.A. (1973). Amine levels in mineral deficient *Hordeum vulgare* leaves. *Phytochemistry*, 12: 2093-2100.

STEVENS, L. (1970). The biochemical role of naturally occurring polyamines in nucleic acid synthesis. *Biol. Reviews*, 45:1-27.

TABOR, H., S.M. ROSENTHAL e C.W. TABOR (1958). The biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine and methionine. *Jour. Biol. Chem.*, 223: 907-914.

TABOR, H. e C.W. TABOR (1964). Spermidine, spermine and related amines. *Pharmacol. Rev.*, 16:245.