

CROWN GALL: UN TUMORE VEGETALE

Benché l'idea di tumore evochi immediatamente l'idea dei neoplasmi cancerosi che attaccano l'uomo e gli animali superiori, il problema della trasformazione tumorale oltrepassa largamente il quadro della biologia animale. Si conoscono in effetti nei vegetali numerosi tipi di tumori la cui eziologia ha talvolta delle forti analogie con quella dei tumori animali.

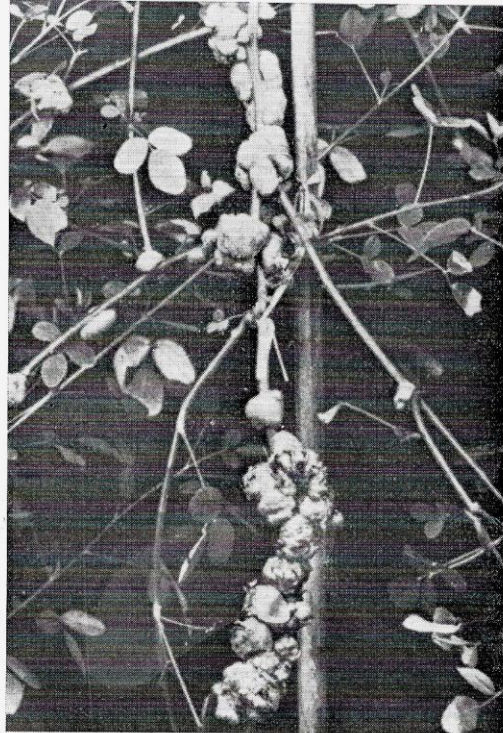
Innanzitutto è necessario definire cosa si intende per tumore ed indicare i criteri su cui è basata questa definizione. Su scala cellulare, la trasformazione tumorale appare come una modificazione molecolare permanente, dotata di continuità genetica che conferisce alle cellule infettate la proprietà di sfuggire alle correlazioni organiche a cui sono sottoposte tutte le cellule dell'individuo. Ciò porta come conseguenza la formazione di masse di tessuto a crescita anarchica che costituiscono il neoplasma.

In campo vegetale per riconoscere se un tessuto è tumorale o meno si può ricorrere principalmente a due metodi: l'innesto e la coltura in vitro. Se si innestano delle cellule normali su un individuo sano e intero, le cellule o restano inerti o si moltiplicano ordinatamente dando eventualmente anche un organo, mentre le cellule cancerose trapiantate danno di nuovo un tumore più o meno esuberante. La prima osservazione di questo fenomeno è dovuta a JENSEN che nel 1910 mostrò come un frammento di tumore di barbabietola rossa innestato su barbabietola saccarifera continuava a svilupparsi in

modo autonomo e formava un tumore ancora colorato in rosso dal pigmento della barbabietola: la betacianina.

La coltura «in vitro» è un altro metodo utilissimo in campo vegetale per stabilire lo stato tumorale delle cellule. Infatti i tessuti normali, salvo talune eccezioni, crescono «in vitro» solo se si somministrano loro delle sostanze di crescita quali per es. l'acido indolacetico (IAA), mentre i tumori crescono anche senza tali fattori.

Tumore provocato dal virus *Aureogenus magnivena* su *Melilotus officinalis*. (da Gautheret, 1958)



(*) Dr.ssa. DONATELLA BAGNI SERAFINI-FRACASSINI, Istituto ed Orto Botanico dell'Università di Bologna.

Questo metodo permette di riconoscere i veri tumori dalle galle provocate da parassiti vari, quali, ad es. Insetti, Funghi (*Exobasidium*), o anche Batteri (*Corynebacterium fascians*), i cui tessuti inoltre non superano la prova di innesto in quanto attecchiscono, ma poi cessano di svilupparsi in modo autonomo.

Fattori cancerogeni

I tumori in genere sia animali che vegetali possono essere provocati da vari fattori e cioè: virus, prodotti chimici, fattori genetici, batteri e radiazioni.

L'agente patogeno dei tumori virali è stato sicuramente dimostrato nei vegetali, per esempio dalla scoperta del virus « wound tumor virus » (WTV) in *Rumex acetosa* o dal virus *Aureogenus magnivena* in varie piante. Quest'ultimo, un virus a RNA di forma poliedrica di circa 80 m μ di diametro, è trasmesso alla pianta da insetti: *Agallia*, *Agalliopsis*.

I tumori prodotti da sostanze chimiche sono causati o da idrocarburi o da ormoni. Nelle piante si ha un esempio di trasformazione tumorale indotta dall'IAA nel caso del fenomeno dell'anergizzazione o abitudine: un tessuto vegetale coltivato « in vitro » (scorzona, vite vergine, tabacco ecc.) è stimolato a crescere dall'IAA, ma un certo punto se ne può affrancare e crescere in modo autonomo. In questo caso l'IAA funziona come una sostanza cancerogena e la sua azione è paragonabile a quella prodotta dall'estradiolo sugli animali.

Tumori genetici si ottengono negli ibridi di certe piante, quali ad es., talune specie di *Nicotiana* (*glauca*, *langsdorffii* ecc.) che producono tumori sia spontaneamente sia, soprattutto, in seguito a ferite. Le speci parentali non mostrano una particolare attitudine alla cancerizzazione, mentre è la presenza dei due genomi nella stessa cellula che genera le proprietà neoplastiche.

Modificazioni simili a tumori si sono ottenute per es. con raggi γ su foglie di *Graptopetalum* (Crassulacea) e con raggi X su felci. È noto inoltre che la frequenza di tumori viene aumentata dalla irradiazione.

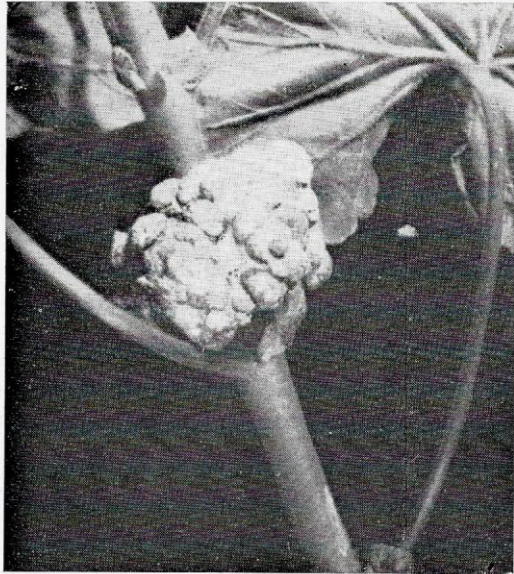
Il crown gall

I tumori che ho enumerato finora si possono riscontrare anche nel mondo animale, mentre vi è un particolare tumore che è tipico del regno vegetale. Le note che seguono esamineranno principalmente i vari aspetti di quest'ultimo e la sua eziologia. Il fattore carcinogeno che lo rende così ben caratterizzabile è un batterio: *Agrobacterium tumefaciens* che è stato descritto nel 1907 da SMITH e TOWNSEND ed è stato accertato come causa del cosiddetto « crown gall » nel 1911. *Agrobacterium* è gram-negativo, ha forma a bastoncino, è mobile per ciglia polari, non sporula. Attacca circa 170 specie di piante e pare che induca la formazione di tumori solo se è in fase di crescita. Vi sono poi altre specie di *Agrobacterium* (ma secondo recenti studi sistematici si tratterebbe viceversa solo di ceppi diversi della stessa specie) che attaccano specificamente un solo determinato genere di ospiti: ad es. *A. pseudotsugae* su *Pseudotsuga*, *A. gypsophylae* su *Gypsophyla* ecc.

La scoperta di un batterio come causa di tumori nelle piante ha scatenato a suo tempo le affannose ricerche di un analogo fattore anche negli animali, ma tali ricerche non hanno mai approdato ad alcun risultato.

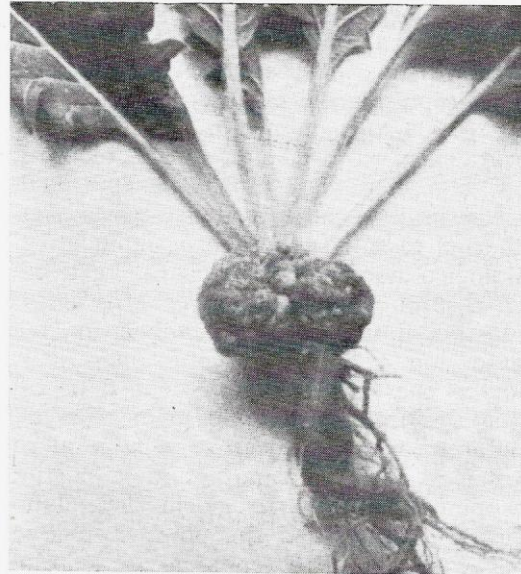
All'interno dell'ospite, il batterio appare localizzato negli spazi intercellulari, e, mentre è abbondante nei tumori molto giovani, in seguito, quando il tumore diviene esuberante, esso man mano scompare. È sufficiente che il batterio sia presente per qualche ora nel tessuto perché si produca la trasformazione tumorale.

Il crown gall è un tumore particolarmente esuberante che si sviluppa frequentemente nelle Dicotiledoni, in molte Conifere e solo rarissimamente nelle Monocotiledoni (asparago e cipolla). Esso provoca nella pianta, per esempio lungo il fusto, la formazione di grossi ammassi globosi di tessuto inframezzati da segmenti sani. I crown gall coltivati « in vitro » assumono aspetto e consistenza diversi: in genere si tratta di tessuti di aspetto più o meno traslucido e senza piani di simmetria definibili; ve ne sono di aspetto esterno compatto, composto o dissociato.



1

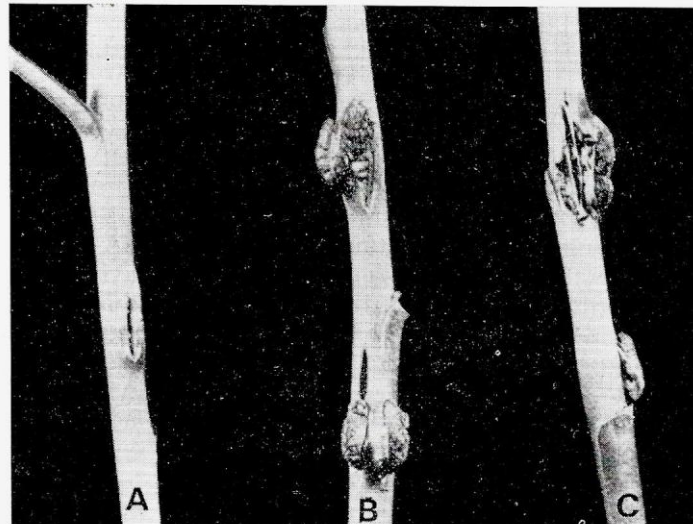
1 Tumore provocato da *Agrobacterium tumefaciens* su un fusto di *Pelargonium*. (da Gautheret, 1958).



2

2 Tumore prodotto da *Agrobacterium tumefaciens* su giusquiamo. (da Gautheret, 1965)

3 Fusto di tabacco innestato con diversi tipi di tessuto. A) Il fusto è stato innestato con una linguetta di tessuto normale; non si è formato alcun tumore. B) Il fusto è stato innestato con tessuto proveniente da un ceppo che ha subito una trasformazione tumorale sotto l'azione prolungata dell'acido indolacetico (tessuto anergico); si sono sviluppati dei voluminosi tumori. C) Il fusto è stato innestato con frammenti di colonie di crown gall; esso ha prodotto dei tumori. (da Gautheret, 1958)



3

Il tessuto tumorale non è costituito da un parenchima indifferenziato, in quanto in realtà esso produce per esempio delle tracheidi, che tuttavia hanno un andamento anarchico a groviglio, o dei tessuti suberificati se il tumore esce all'esterno del tessuto ospite.

Praticamente ogni cellula del tessuto ospite in via di tumorizzazione, anche se molto differenziata, come ad es. cellule endodermiche ecc. può andare incontro a sdifferenziamenti e modificazioni dram-

matiche. Viceversa il crown gall talvolta ridà organi differenziati quali gemme e radici e queste, coltivate « in vitro » isolatamente, hanno ridato un tessuto tumorale di aspetto disorganizzato perdendo la morfologia tipica ad es. della radice.

Dal punto di vista citologico, le cellule tumorali presentano un aumento quantitativo di reticolo endoplasmatico e di ribosomi e anche l'apparato del Golgi è più sviluppato del normale; ma queste modificazioni sono prevedibili in quanto

si trovano anche nelle cellule meristematiche normali in crescita e il crown gall è un tessuto in crescita. Si sono trovati nel citoplasma dei corpi cristallini di circa 200-300 Å di diametro, con struttura a graticcio, avvolti da una singola membrana, che comunque non sono particelle virus-simili e che talvolta si trovano anche nei tessuti sani. Il loro significato fisiologico non è stato chiarito. Particelle virus-simili sono state invece trovate in plastidi di tumori di *Kalanchoë*, ma tale dato non è più stato confermato. Pare invece che siano caratteristiche delle cellule tumorali durante le prime fasi del differenziamento canceroso, alcune microvescicole che penetrano nei nuclei per micropinocitosi, quattro giorni dopo l'inoculo del batterio e che poi scompaiono.

Vi sono inoltre fenomeni di poliploidia che tuttavia non sono infrequenti nelle cellule vegetali e fenomeni di divisioni amitotiche o di mitosi con ineguale distribuzione dei cromosomi.

Condizionamento dell'ospite

I diversi tipi di tumore, per potersi sviluppare, hanno tutti un'esigenza comune: che l'ospite sia « condizionato » cioè che le sue cellule diventino sensibili all'attacco tumorale. Questa fase di condizionamento viene raggiunta per es. dalle cellule che si trovano in prossimità di una ferita. Il fattore ferita si è dimostrato una « conditio sine qua non » ed è un elemento che favorisce l'insorgere del cancro anche negli animali, nei quali è sufficiente anche solo un'irritazione o una infiammazione.

Nel caso del tumore vegetale di origine virale, il virus iniettato per es. dall'insetto può restare quiescente per molto tempo finché una ferita fa scatenare la malattia; nel caso dei tumori genetici, l'insorgere del fenomeno patologico viene favorito da una ferita e infatti le neoformazioni si sviluppano nei punti di attacco delle foglie o delle radici. Nel caso del crown gall indotto sperimentalmente, è di estremo interesse la scoperta che il tessuto ferito si mostra recettivo all'azione cancerogena del batterio solo in un certo intervallo di tempo (24-96 ore dopo

la ferita). È pertanto evidente che la pianta deve essere predisposta fisiologicamente all'attacco batterico. La recettività è in rapporto coi processi cicatriziali che iniziano intorno alle 24-48 ore.

Gli effetti della ferita comportano una modificazione della permeabilità della membrana con aumento degli ioni minerali intracellulari, modificazioni della respirazione, aumento di sintesi di DNA e di sostanze di crescita. In circostanze normali, dopo la riparazione di ferite, le cellule tornano allo stato quiescente tipico delle cellule mature. Quando invece è intervenuta un'infezione tumorale, questo ritorno alla normalità è bloccato e le cellule continuano a proliferare indefinitamente.

Le sostanze di crescita nel crown gall

Nelle piante vi è un tipico fattore stimolante per la proliferazione cellulare, indispensabile ai tessuti sani coltivati « in vitro »: l'acido indolacetico. In tutti i tumori in cui questo aspetto è stato studiato (tumori virali, genetici, anergici e crown gall), pare che l'acido indolacetico sia molto più abbondante che nei tessuti sani.

Il batterio è in grado di sintetizzare l'IAA dal triptofano in forte quantità, tuttavia non si può affermare che l'iperauxinità del crown gall sia dovuta all'apporto batterico, ma pare piuttosto che sia dovuta ad un aumento endogeno o a una maggiore attività degli inibitori dell'indolacetico-ossidasi che, come è noto, degrada l'indolacetico.

Esempi di questi inibitori sono la scopoletina, una cumarina naturale, e le sostanze « protector » trovate in gran quantità nel crown gall da STONIER (1969). L'importanza dell'acido indolacetico è rilevante in quanto esso è un cofattore indispensabile nella fase di condizionamento della cellula poiché provoca quella proliferazione durante il processo cicatriziale che rende le cellule sensibili all'azione cancerogena. La scorzonera, ad esempio, è assai poco sensibile all'azione di *Agrobacterium*, ma se si somministra anche dell'IAA si ottengono dei neoplasmici di natura cancerosa assai voluminosi. Vi sono inoltre ceppi di batteri poco virulenti che

pertanto non danno luogo a tumori a meno che la pianta ospite non sia stata trattata con forti dosi di IAA.

Certi tessuti, come ad esempio il tabacco, hanno bisogno per proliferare « in vitro » oltre che dell'auxina, cioè dell'IAA, anche di altre sostanze di crescita quali le citochinine (o kinetina); questi tessuti però quando sono trasformati, crescono « in vitro » anche senza citochinine e si è scoperto che in essi vi è la scomparsa completa dell'attività citochinino-ossidasi. D'altra parte sostanze ad attività citochinica sono state trovate nel crown gall. Wood (1969) ha identificato nel tessuto tumorale, due sostanze di crescita, chimicamente non del tutto caratterizzate una delle quali è tipica di questo particolare tessuto, mentre l'altra è comune al tessuto normale all'anergicé.

Si è visto che il tasso di crescita del tumore riflette in parte il rapporto auxina-citochinina stabilitosi durante il condizionamento della cellula.

Benché l'aumento di IAA e di citochinine sia un evento ormai accertato e determinante per lo svolgersi di quelle trasformazioni innanzi descritte, tale evento tuttavia non è che una conseguenza e non certamente la causa dell'oncogenesi.

Alterazioni metaboliche

Nei tumori vi sono vistose modificazioni a carico del metabolismo delle sostanze azotate e specialmente dell'arginina la quale subisce delle trasformazioni del tutto caratteristiche: infatti dà origine a delle guanidine monosostituite quali a lisopina, l'octopina e la nopalina, ciascuna delle quali è specifica di certi tumori indotti da un determinato ceppo di *Agrobacterium*. Anche presso il nostro laboratorio sono state osservate delle differenze notevoli nel metabolismo di composti azotati quali le poliammine. Il crown gall coltivato « in vitro » presenta infatti un contenuto di putrescina paragonabile a quello contenuto nell'*Agrobacterium* ma dalle 50 alle 100 volte maggiore che nel ceppo normale; l'energicé ne contiene una quantità intermedia ai due tessuti normale e tumorale. Il significato di questo

ritrovamento è notevole in quanto le poliammine sono delle sostanze di crescita presenti in tutti gli organismi, sono in stretto rapporto funzionale con gli acidi nucleici e inoltre quantità abnormi di esse sono presenti anche nei tumori animali.

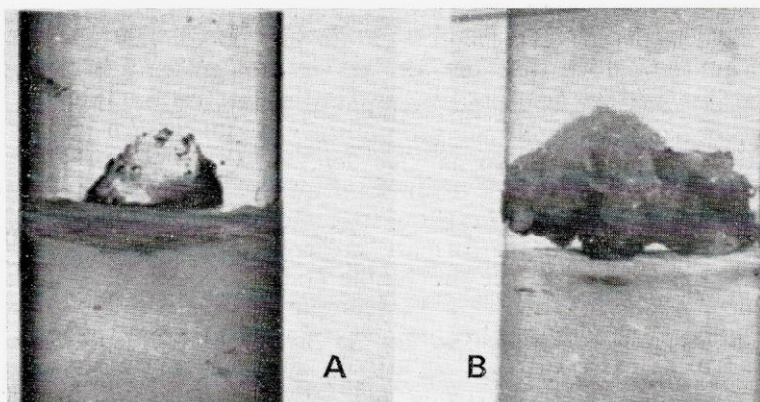
Benché i risultati concernenti la respirazione del crown gall non siano certo univoci, appare tuttavia che la citocromoossidasi diminuisca in modo notevole e che l'ossidazione dei vari substrati, sia in genere più lenta. Pare che la tumorigenesi comprometta l'efficacia dei meccanismi di fosforilazione. Altri autori tuttavia trovano delle differenze molto deboli fra respirazione nei tessuti tumorali e nei tessuti normali.

Ricerche condotte soprattutto da BRAUN mostrano che la trasformazione tumorale è progressiva e che interessa successivamente diversi sistemi biochimici. Infatti vi è un bisogno sempre decrescente di vari metaboliti quali citochinine, auxine, inositolo, nucleotidi e certi aminoacidi man mano che la trasformazione diviene completa. I diversi gradi della trasformazione tumorale si manifestano con la diversa velocità di proliferazione delle cellule interessate.

La sintesi di taluni composti necessari alle cellule coltivate « in vitro » è attivata dalla presenza massiccia di ioni: infatti aumentando la concentrazione di K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e Mg^{2+} , certi tessuti sintetizzano dei regolatori di crescita indispensabili e possono divenire addirittura autonomi dall'IAA, carattere che si considera come criterio assoluto per distinguere i tessuti normali dai tumorali. La permeabilità delle cellule tumorali al potassio e al fosforo è aumentata rispetto al normale e infatti i tessuti tumorali crescono su concentrazioni anche molto basse di soluzioni minerali, contrariamente ai tessuti normali.

La corretta interpretabilità di molte di queste ricerche è condizionata dalla difficoltà di avere un controllo paragonabile poiché spesso questo si trova in fase di proliferazione cellulare più o viceversa meno intensa del crown gall oppure perché una fase di sintesi proteica massima non corrisponde sempre ad una fa-

Culture « in vitro » di tessuto normale (A) e di tessuto anergico (B) di *Scorzonera*. Il tessuto A prolifera solo in presenza di auxina mentre il tessuto B si sviluppa in assenza di sostanze di crescita. (da Gautheret, 1965)



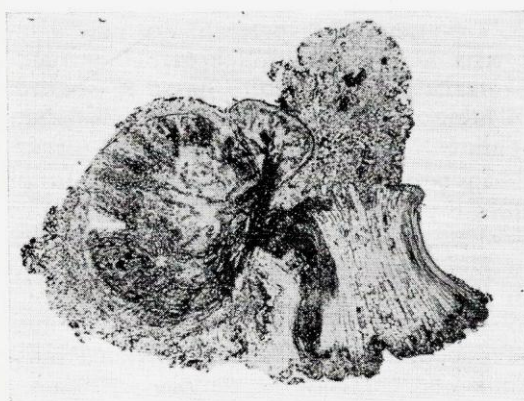
se di attiva crescita. Lavorando con tessuti coltivati « in vitro », non solo si ha un continuo controllo del materiale e del suo stato normale o tumorale, ma si può anche ovviare almeno in gran parte a grossolani errori di comparazione fra due tessuti fisiologicamente diversissimi.

Teorie sulla natura del fattore tumorale

Il punto più appassionante del problema della trasformazione tumorale del crown gall consiste nell'identificazione del principio inducente il tumore (TIP). Infatti benché sia evidente un rapporto causa-effetto tra batterio e tumore, tuttavia dopo un certo tempo dalla sua entrata, il microorganismo non è più identificabile nell'ospite mentre la modificazione del tessuto è permanente. Quindi la pianta acquisisce un qualche cosa che ne modifica il metabolismo in modo stabile e

che continua ad agire anche dopo la scomparsa del batterio. Sembra quindi che l'*Agrobacterium* passi un'informazione permanente alla cellula vegetale nel corso della trasformazione.

Vi sono numerosi fattori di cui bisogna tener conto nel formulare delle ipotesi sulla natura del TIP. Innanzitutto si sa che l'attività cancerogena è diminuita a 26° C e annullata a 30° C, quindi la temperatura ha un peso determinante nel momento in cui avviene la tumorizzazione. Questo fenomeno ha indotto taluni autori a supporre che il TIP sia un composto termolabile (proteina, nucleoproteina?) prodotto dalla cellula ospite o indotto dal batterio. Né il batterio né la pianta subiscono alterazioni in seguito all'innalzamento della temperatura. Altro fattore è la necessità di una ferita. L'ospite per essere suscettibile di trasformazione deve trovarsi in un determinato stato



Azione induttrice esercitata da un tessuto di crown gall. Nella foto, a destra in basso, si osserva la sezione longitudinale di un segmento di fusticino di girasole su quale è stato innestato un frammento di tessuto di crown gall (in alto a destra). Quest'ultimo ha indotto la formazione da parte del fusticino di un voluminoso callo visibile a sinistra. Lo sviluppo di questo callo non è dovuto all'intervento dell'*Agrobacterium* poiché il crown gall innestato è privo di batteri. Questo tumore indotto ha una struttura analoga a quella di un tumore primitivo e contiene delle formazioni libro-lesnose. (da Gautheret, 1965)

fisiologico: deve cioè essere condizionato; il che significa che il tessuto deve compiere in quel particolare momento i processi cicatriziali necessari per riparare la ferita; ciò comporta un aumento di IAA e di sostanze di crescita in genere, nonché una sintesi di acidi nucleici e di proteine.

Il problema particolare dell'anergic può forse in sostanza essere equiparato al caso di un tessuto condizionato (le ferite sono causate per esempio dai tagli subiti durante i trapianti « in vitro ») che permane invece in questo stato di « eccitazione » indefinitamente.

Un altro fattore da ricordare è la trasmittibilità per innesto del tumore o dello stato di anergizzazione che pure è uno stato tumorale.

Tenendo conto di quanto detto sopra sono state proposte varie teorie sulla natura del TIP.

La teoria virale ipotizza la presenza di un batteriofago che, una volta entrato col microorganismo nella cellula ospite, può esercitare la sua azione patogena dopo l'eliminazione del batterio. Questa ipotesi darebbe ragione della trasmissibilità e della termolabilità del TIP e ricondurrebbe perciò il crown gall al caso di un tumore virale come gli altri già noti. Nel caso particolare dell'anergic si dovrebbe supporre che il tessuto contenga un fantomatico principio trasformante simile a un virus.

La seconda teoria ipotizza che la cancerizzazione derivi da una trasformazione di particelle cellulari che si autoduplicano normalmente nella cellula sana e il batterio elaborerebbe un fattore che ne provoca la trasformazione e che può operare quando le particelle si riproducono, cioè durante i processi cicatriziali. Il fattore esterno potrebbe essere un virus, l'IAA nel caso dell'anergic o variazioni intracellulari al momento dell'ibridazione nel caso di ibridi tumorali di *Nicotiana*. Questa ipotesi potrebbe avere un significato concreto identificando le « particelle cellulari autoduplicanti » come DNA.

Altre numerose ipotesi non sufficientemente documentate o plausibili sono sta-

te proposte nel corso delle ricerche ormai pluridecennali sulla formazione del crown gall.

Ultime ricerche sull'induzione del crown gall

Recenti osservazioni su particolari aspetti della tumorizzazione stanno portando delle schiarite molto promettenti per la risoluzione di questo problema. Già da tempo era stato osservato un incremento nel contenuto in acidi nucleici, e in particolare di DNA, dopo che la pianta era stata inoculata con batteri virulenti. Inoltre entro 48 ore dall'inoculo si forma un secondo picco di DNA oltre a quello trovato nel controllo.

Questi dati sono stati recentemente confermati da SRIVASTAVA e coll. (1968, 1969 e 1970) con l'osservazione anche di una più rapida incorporazione di ^{32}P negli acidi nucleici. Con centrifugazione su gradiente di cloruro di cesio di DNA sonicated estratto da una pianta infettata, SRIVASTAVA ottiene due DNA diversi, uno corrispondente al DNA della pianta sana e l'altro al DNA dell'*Agrobacterium*. Con esperienze di ibridazione di DNA batterico con vari RNA della pianta infettata si è trovato che certi RNA si ibridano bene col DNA batterico, cosa che non avviene con gli RNA dei controlli sani. Quindi, anche con controlli della percentuale di ibridazione fra DNA tumorale e batterico, SRIVASTAVA può concludere che il genoma batterico si è integrato nel DNA della cellula ospite. Con esperimenti analoghi SCHILPEROORT e coll. (1967) erano giunti alle stesse conclusioni.

BOGERS (1971) studiando al microscopio elettronico l'inserzione dell'*Agrobacterium* sulla parete cellulare, ottiene delle indicazioni circa la possibilità che il batterio inietti una masserella di DNA nella cellula ospite.

GUILLÉ e coll. (1968), tenendo conto di lavori precedenti concernenti un temporaneo aumento di DNA nei tessuti vegetali feriti (KUPILA e STERN, 1961; LIPETZ 1967), hanno cercato e trovato la comparsa transitoria di un DNA ricco in basi C e G (Nh DNA) nei tessuti 48 ore dopo la ferita. L'interesse di questa scoperta

risiede nel fatto che questo Nh DNA, si ibrida bene con il DNA batterico e non si trova né nel tessuto intatto, né nel tessuto tumorale (QUÉTIER e coll. 1969).

BOPP (1964) osserva inoltre che inibendo specificamente la sintesi del DNA extra-cromosomico che avviene nel periodo intercorrente fra la ferita e l'infezione, la tumorizzazione viene inibita.

La necessità di una ferita per permettere l'oncogenesi, si potrebbe spiegare con lo scatenarsi di divisioni cellulari che comportano naturalmente lo srotolamento del DNA, condizione necessaria per l'eventuale integrazione del DNA batterico. L'ipotesi di QUÉTIER e coll. (1969) ammetterebbe quindi che la pianta ferita produca un certo DNA che si può combinare facilmente col DNA batterico (questo complesso naturale tuttavia non è ancora stato osservato), ma che, dopo l'infezione esso scompaia o comunque che le sue rare sequenze possano sfuggire all'osservazione. Questa ipotesi di un DNA transitorio, prodotto dalla cellula in divisione, darebbe ragione del fenomeno dell'anergizzazione e dell'evidente compartecipazione dell'ospite durante l'oncogenesi. SRIVASTAVA tuttavia, in una pianta diversa, non è mai riuscito a identificare l'Nh DNA.

La possibilità di trasmissione di cromosomi o di parti di cromosomi fra organismi anche diversissimi (virus-procarioti-eucarioti) è ormai confermata da numerose ricerche. Ad esempio, in tessuti vegetali non tumorali infettati da vari batteri, si è osservato che il DNA batterico penetra nelle cellule dell'ospite e si lega al loro DNA. Questa penetrazione di DNA in una pianta superiore può avvenire addirittura attraverso le radici (LÉDOUX, 1965) o, in semi germinanti, attraverso l'endosperma (LÉDOUX e HUART, 1968).

Lo scambio di materiale genico fra batteri era già stato osservato nel 1928 e del resto una conferma recente particolarmente interessante è data dalla constatazione che iniettando del DNA di *Agrobacterium tumefaciens* in un *Rhizobium*, quest'ultimo diviene tumorigeno (KERN, 1965a e 1965b; KERR, 1969). È noto inoltre che i virus lisogenizzanti possono integrare il loro DNA nel cromosoma batterico assu-

mendo così il nome di profago. L'*Agrobacterium tumefaciens* (ceppo B₆) per esempio, è un batterio lisogeno e contiene più specie di profagi (BEARDSLEY, 1955 e 1960).

In tessuti tumorali coltivati « in vitro », privi di batteri, sono stati identificati e isolati dei batteriofagi. Da uno di questi (PS 8) è stato estratto il DNA che ha mostrato attività tumorigena. Tuttavia i batteriofagi non hanno mai mostrato attività oncogena, ma ciò potrebbe essere dovuto a una difficoltà di penetrazione del fago come tale.

Pare che vi sia una certa identità fra il fago temperato dell'*Agrobacterium tumefaciens* (PB 6) e il fago PS 8 trovato nel tessuto tumorale (LEFF e BEARDSLEY, 1970).

In sezioni di embrioni di pisello inoculate con *A. t.* PB 6 si sono osservati, 29 ore dopo l'inoculo, dei fagi intracellulari localizzati nell'apparato nucleare delle cellule batteriche mentre nello stesso ceppo batterico non inoculato non erano mai stati visti fagi (KURKDJIAN A., BEARDSLEY R. e MANIGAULT P., 1967). Inoltre ceppi di *Agrobacterium t.* selezionati privi di fagi, ma suscettibili, inducono ugualmente tumori (BRAUN 1958). Si potrebbe allora supporre che il profago portato dal batterio sia attivabile da qualche fattore della cellula vegetale e che di conseguenza operi la lisi batterica. Successivamente il virus così liberato potrebbe integrarsi di nuovo sotto forma di profago nella cellula della pianta superiore. Esperienze con raggi ultravioletti e con mitocina C indurrebbero a credere che l'aumento d'infettività dei batteri sia legato all'induzione del profago causata da questi stimoli esterni (HEBERLEIN e LIPPINCOTT, 1967).

Ricerche di BRAUN e WOOD (1966) mostrano che la ribonucleasi somministrata in opportuni momenti e in opportune concentrazioni ad una pianta ferita prima o contemporaneamente al batterio, inibisce la tumorizzazione, cosa che invece non accade con la desossiribonucleasi. Si potrebbe allora pensare a un virus a RNA sul genere dei virus tumorigeni trovati nei tumori animali, ma è noto che questi virus a RNA, quando infettano una cellu-

Particolare di una sezione di tessuto di crown gall coltivato «in vitro». Al centro si osservano delle tracheidi con andamento anarchico. (fotografia originale)



la utilizzano delle DNA polimerasi RNA dipendenti cellulari, stampando così sul proprio RNA un DNA che poi verrà trascritto dalla cellula ospite. Quindi, anche ammettendo che si tratti di un virus a RNA, non è ben spiegabile perché la deossiribonucleasi non abbia effetto: probabilmente è molto critico il momento della somministrazione dell'enzima. Il fatto che non si siano praticamente mai osservate particelle virus-simili nel crown gall potrebbe non essere un argomento determinante in quanto in tumori di sicura origine virale, quale quello causato dal virus a RNA WTV in *Rumex acetosa*, il virus è apparentemente assente. Tale fenomeno viene spiegato con la possibilità che nel tessuto tumorizzato non si formi più una particella virale completa (virone), ma potrebbero essere presenti solo frammenti di RNA con attività inducente un tumore (oncogeni) (STREISSLE, 1970). Anche nel caso del crown gall si potrebbe ragionevolmente pensare ad una sintesi defettiva del fago nella cellula tumorale e in tal caso il profago resterebbe mascherato.

Non sarebbe pertanto impossibile, sulla base di quanto esposto, supporre che il batterio veicoli insieme al suo DNA anche un episoma cioè una particella genetica del fago lisogeno, dotata di attività oncogena. Questa ipotesi potrebbe essere in accordo anche con le prove di ibridazione del DNA batterico col DNA delle cellule di piante superiori tumoriz-

zate. MILO e SRIVASTAVA stessi (1969) ammettono che l'agente tumorigeno del batterio del crown gall possa essere un virus.

L'ipotesi di MANOCHA (1970) che le microvescicole pinocitate dal nucleo di cellule infettate, dopo 4 giorni dall'inoculo, contengano il DNA batterico darebbe una spiegazione di come il DNA possa raggiungere intatto il nucleo della cellula ospite. Microvescicole simili sono state osservate nelle cellule infettate con le *Mycoplasmales* che sono gli agenti patogeni di varie malattie delle piante.

Queste esperienze sembrano pertanto portarci a concludere che gli acidi nucleici, e verosimilmente il DNA di origine esclusivamente batterica o proveniente da batteri infettati da profagi, siano responsabili delle trasformazioni tumorali. Le modificazioni osservate nel metabolismo delle cellule cancerose, sarebbero dovute perciò all'introduzione di parti nuove estranee di genoma e forse anche a conseguenti derepressioni del genoma originario.

Le prospettive aperte da queste ricerche sono molto promettenti, ma probabilmente la dimostrazione inequivocabile della natura del fattore oncogenetico è meno prossima di quanto si potrebbe pensare.

BIBLIOGRAFIA GENERALE

- BRAUN A. C. e STONIER T., *Morphology and physiology of plant tumors*. Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung. 10 (ed. Heilbrunn L. V. e Weber F.) Springer Verlag. Wien 1958.

- BRAUN A. C., « Ann. Rev. Plant. Physiol. », 13, 533-555, 1962.
- GAUTHERET R. J., *Réflexions d'un botaniste sur le problème du cancer*. Travaux dédiés a Lucien Plantefol. (ed. Masson et C^{ie}). Paris 1965.
- GAUTHERET R. J., *La culture des tissus végétaux*. Pag. 744-787 (ed. Masson et C^{ie}). Paris 1959.
- MANIGAULT P., *Transformations tumorales*. Monographies de Physiologie végétale (ed. Masson et C^{ie}). Paris 1968.
- MOREL G., « *Physiol. Veg.* », 8, 189-204, 1970.
- BIBLIOGRAFIA SPECIALE**
- BEARDSLEY R. E., « *Am. Naturalist* », 89, 175, 1955.
- BEARDSLEY R. E., « *J. Bact.* », 80, 180, 1960.
- BOPP M., « *Z. Naturf.* », 19b, 62, 1964.
- BOGERS R. J., « Third Int. Conference on Pathogenic Bacteria ». Wageningen 14-21 aprile 1971.
- BRAUN A. C. e WOOD H. N., « *Proc. Natl. Acad. Sci.* », 56, 1417, 1966.
- GUILLÉ E., QUÉTIER F. e HUGUET T., « *C. R. Acad. Sc. Paris* », 266, 836, 1968.
- HEBERLEIN G. e LIPPINCOTT J. A., « *J. Bact.* », 93, 1246, 1967.
- KERN H., « *Archiv. für Mikrobiol.* », 51, 140, 1965a.
- KERN H., « *Archiv. für Mikrobiol.* », 52, 206, 1965b.
- KERR A., « *Nature* », 223, 1175, 1969.
- KUPILA S. e STERN H., « *Plant. Physiol.* », 36, 216, 1961.
- KURKDJIAN A., BEARDSLEY R. E., e MANIGAULT P., « *Ann. Inst. Pasteur* », Paris, 114, 555, 1967.
- LÉDOUX L., in « *Progres in N. A. Res. and Mol. Biol.* », vol. 4, 231, N. Y. Acad. Press 1965.
- LÉDOUX L. e HUART R., « *Nature* », 218, 1256, 1968.
- LEFF J. e BEARDSLEY R. E., « *C. R. Acad. Sc. Paris* », 270, 2505, 1970.
- LIPETZ J., « *Annals N. Y. Acad. Sci.* », 144, 320, 1967.
- MANOCHA M. S., « *Can. J. Bot.* », 48, 1455, 1970.
- MILO G. E. e SRIVASTAVA B. I. S., « *Biochem. Biophys. Res. Commun.* », 34, 196, 1969.
- QUÉTIER F., HUGUET T. e GUILLÉ E., « *Biochem. Biophys. Res. Commun.* », 34, 128, 1969.
- SCHILPEROORT R. A., VELDSTRA H., WARNAAR S. O., MULDER G. e COHEN J. A., « *Biochim. Biophys. Acta* », 145, 523, 1967.
- SMITH E. F. e TOWNSEND C. O., « *Science* », 25, 671, 1907.
- SRIVASTAVA B. I. S., « *Arch. Biochem. Biophys.* », 125, 817, 1968.
- SRIVASTAVA B. I. S. e MILO G. E., « *Life Sci.* », 8, 967, 1969.
- SRIVASTAVA B. I. S., « *Life Sci.* », 9, 889, 1970.
- SRIVASTAVA B. I. S. e CHADHA K. C., « *Biochem. Biophys. Res. Commun.* », 40, 968, 1970.
- STONIER T., « *Plant. Physiol.* », 44, 1169, 1969.
- STREISSLE G., « Deuxieme Conference Internationale sur les Cultures de Tissus de Plantes ». Strasbourg 6-10 luglio 1970.
- WOOD H. N., in *Current Topics in Plant Science*. Pag. 74-77 (ed. J. E. Gunkel), Acad. Press N.Y. e London 1969.