
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MILENA BANDIERA, GIORGIO MORPURGO, ROBERTA
RICCI

Effetti del saccarosio irradiato sulla crescita di tessuti vegetali e su altri sistemi biologici

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.3, p. 426–434.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_3_426_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_3_426_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Radio biologia. — *Effetti del saccarosio irradiato sulla crescita di tessuti vegetali e su altri sistemi biologici.* (*) Nota di MILENA BANDIERA, GIORGIO MORPURGO e ROBERTA RICCI, presentata (**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — Different biological systems have been used to test growth inhibition and genetic effects produced by irradiated sucrose. Sucrose has been irradiated with rays from a source of Co-60 with 2 Mrads.

The irradiated sucrose produces a strong inhibition on the growth of cell of the wild carrot *Daucus carota*. The growth of two strains of *E. coli* K 12 was also inhibited by irradiated sucrose which also dramatically affects survival of the cells.

Only a slight effect was noted on a third strain of *E. coli*, while a strain of *B. subtilis* was totally resistant to irradiated sucrose.

In *Aspergillus nidulans* irradiated sucrose does not affect either viability or mutation and somatic segregation frequencies.

INTRODUZIONE.

È noto che un mezzo potenziale di conservazione degli alimenti è l'irradiazione degli stessi con dosi di raggi γ tali da portare alla totale sterilizzazione. Tuttavia non si è certi che tale metodo sia di pratica attuazione; infatti, a prescindere dalla possibilità di alterazioni del valore nutritivo e dei caratteri organolettici, si avverte la necessità di avere maggiori informazioni sulla eventuale produzione di materiali tossici e sulla determinazione di danni a livello genetico ad opera dell'irradiazione.

Numerose ricerche (Phillips-1, Allen-2, Molin-3) hanno dimostrato che i raggi γ inducono negli zuccheri la formazione di sostanze tossiche per tessuti sia animali che vegetali. In particolare Holsten, Sughi e Steward [4] hanno notato che il saccarosio irradiato inibisce fortemente la crescita di culture *in vitro* di tessuto di *Daucus carota*, mentre Show ed Hayes [5] hanno riscontrato che è ancora più tossico su culture di cellule animali.

Il presente lavoro ha lo scopo di confermare i dati precedenti e di estendere ad altri sistemi biologici lo studio degli effetti del saccarosio irradiato. Tali effetti sono stati studiati esaminando la crescita in varie condizioni di cultura di cellule di *Daucus carota*. Sono state considerate inoltre le curve di crescita e la sopravvivenza delle cellule in tre ceppi di *Escherichia coli* K 12 e di un ceppo di *B. subtilis*, la sopravvivenza e diversi parametri genetici, quali la mutazione, il *crossing-over* e la non disgiunzione, in *Aspergillus Nidulans*.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Genetica dell'Università di Roma, presso il Centro di Radiobiologia applicata a problemi agricolo-alimentari del C.N.R. Sezione II.

(**) Nella seduta dell'11 marzo 1967.

MATERIALI E METODI.

Irradiazione del saccarosio. — Una soluzione di saccarosio al 2% è stata esposta ad una sorgente di cobalto 60 fino a ricevere la dose di 2 Mrad, e quindi concentrata a freddo (40%) secondo le indicazioni di Show ed Hayes [5].

Tessuti vegetali in cultura. — Nel presente lavoro è stato usato un ceppo di *Daucus carota* da noi stessi isolato da una radice della pianta, circa due anni fa, e da allora mantenuto sul terreno di White [6] modificato (Steward e coll. [7]), agarizzato.

I terreni usati sono il già citato terreno di White modificato da Steward [6 e 7] ed il terreno di Skoog e Mourashige [8] opportunamente addizionato con acido indol-acetico e kinetina (6-furfuril-amino-purina), agarizzato all'1%.

Le piastre Petri sono state chiuse con nastro adesivo per diminuire l'essiccamento e rendere più difficile la contaminazione ambientale.

Aspergillus nidulans. — Come ceppo test per misurare la frequenza di mutazione e di aploidizzazione è stato usato un diploide; per misurare la frequenza di mutazione è stato usato il ceppo 18 aploide (su₁ad₂₀, ribo₁, pro₁, bi₁, ad₂₀, nic₂).

La costituzione genetica del primo cromosoma del ceppo diploide è qui indicata:

| | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------|---|------------------|-------------------|-----|------------------|-----------------|
| su ₁ ad ₂₀ | ribo ₁ | + | + | o | pro ₁ | + | + | ad ₂₀ | bi ₁ |
| + | + | p ₁ p ₁ | an ₁ | ? | + | paba ₁ | y | + | + |
| 39 | 0,2 | 19 | 24 | ? | 8 | 16 | 0,1 | 6 | + |

Sono stati utilizzati un terreno di cultura completo (CM) ed uno minimo (MM) agarizzati, già descritti in un precedente lavoro (Fratello e coll. [9]).

Le tecniche selettive e quantitative per saggiare la frequenza di *crossing-over* somatico, di non-disgiunzione e la frequenza di mutazione sono già state ampiamente descritte (Morpurgo [10] [11]).

In breve, la frequenza di mutazione è stata saggiata calcolando il numero di colonie resistenti alla para-fluoro-fenilalanina (PFP) su terreno MM supplementato con PFP alla concentrazione di 0,02 mM. Il *crossing-over* somatico e la non-disgiunzione sono stati valutati contando il numero di colonie resistenti alla PFP di un diploide test eterozigote per un gene che determina la resistenza alla para-fluoro-fenilalanina, comparse su terreni supplementati in modo da soddisfare le possibili esigenze nutrizionali delle colonie segreganti. La distinzione tra colonie originate per non-disgiunzione e per *crossing-over* è, in questo caso, particolarmente facile poiché le colonie del primo tipo sono gialle e le altre verdi.

I conidi da seminare sui terreni selettivi sono stati prelevati da culture su terreno agarizzato (sia MM che CM) in cui, come fonte di carbonio, era

stato aggiunto saccarosio irradiato alla concentrazione finale dell'1 %; ovviamente il controllo era costituito da campioni di conidi coltivati in condizioni identiche, ma con saccarosio non irradiato.

Batteri. - I ceppi test sono tre ceppi di *E. coli* K 12: HfrC65, HfrCR34, HfrU37, ed il ceppo di *B. subtilis* ICI-NCTC8236.

Le curve di crescita sono state eseguite in terreno liquido minimo di Jacob e Wollmann [12] supplementato con saccarosio sia irradiato che non, alla concentrazione finale dello 0,5 %.

Il livello della crescita batterica è stato determinato misurando la densità ottica (λ 650) dei campioni prelevati ad intervalli di tempo da una cultura aerea a 37° C.

RISULTATI.

Effetti su Daucus carota. - La crescita di culture di callus di *Daucus carota* è stata influenzata in maniera netta dalla presenza del saccarosio in terreni di cultura variamente supplementati.

TABELLA I.

Influenza del saccarosio irradiato sulla crescita di tessuti di Daucus carota.

| Terreni di cultura | Indol acetico mg/l | Kinetina mg/l | Saccarosio irradiato - peso secco (*) in mg. | Controllo peso secco in mg |
|-----------------------|-----------------------|------------------|--|----------------------------------|
| Whithe modificato . . | 0 | 0 | 10 | 30 |
| | 0,1 | 0,1 | 32,5 | 60 |
| | 5 | 0,1 | 12,5 | 55 |
| | 5 | 1 | 12,5 | 67,5 |
| Skoog e Mourashige . | 0,1 | 0,1 | 10 | 15 |
| | 5 | 0,1 | 12,5 | 112,5 |
| | 1 | 1 | 10 | 35 |

(*) I valori sono la media di due campioni.

Nella Tabella I sono riportati i pesi secchi di espanti di culture parallele con saccarosio irradiato e non, a trenta giorni dall'inoculo. Tale inoculo era costituito da prelievi omogenei di callus coltivato su terreno di White modificato. Dai dati risulta chiaro l'effetto inibitore della crescita dovuto al saccarosio irradiato.

TABELLA II.

Effetti del saccarosio irradiato sulla frequenza della segregazione somatica in Aspergillus nidulans.

| | Terreno di cultura | N° conidi esaminati | N° colonie trovate | Frequenza c.o. somatico $\times 10^{-4}$ | Frequenza non disgiunzione $\times 10^{-4}$ |
|------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--|---|
| Saccarosio irradiato . | MM | $6 \cdot 10^5$ | 80 | 1,1 | 0,16 |
| | CM | $6 \cdot 10^5$ | 35 | 0,48 | 0,1 |
| Controllo | MM | $6 \cdot 10^5$ | 81 | 1,25 | 0,1 |
| | CM | $6 \cdot 10^5$ | 46 | 0,65 | 0,1 |

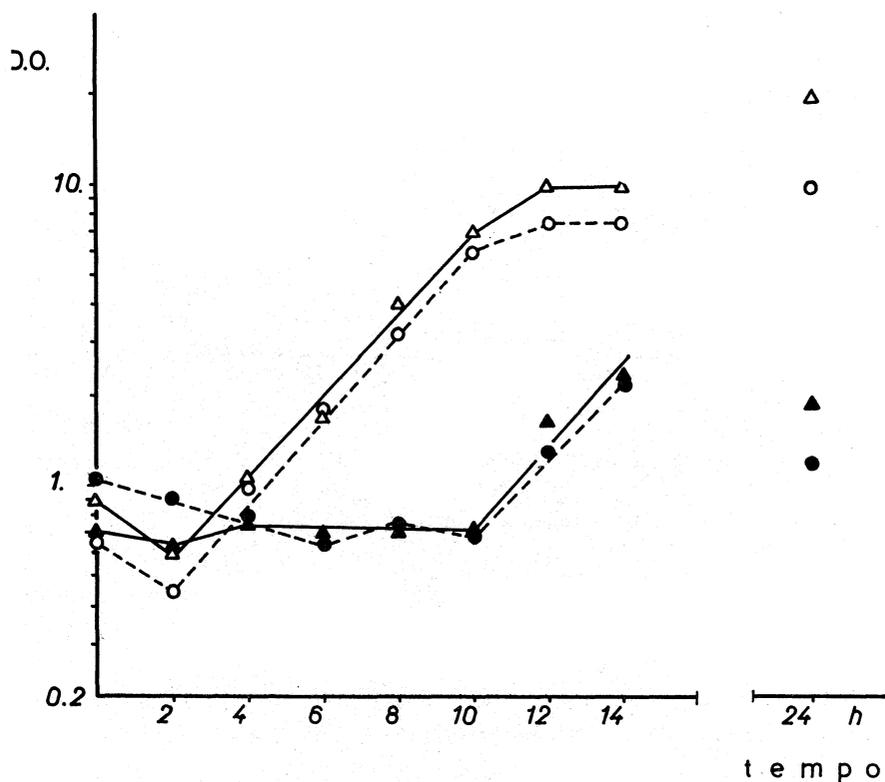


Fig. 1. - Curva di crescita dei ceppi di *E. coli* HfrC65 ed HfrU37 in presenza ed in assenza di saccarosio irradiato.

○ MM + saccarosio } HfrC65; △ MM + saccarosio } HfrU37.
 ● MM + saccarosio irradiato } ▲ MM + saccarosio irradiato }

Effetti su Aspergillus nidulans. - La presenza come fonte di carbonio del saccarosio irradiato, non ha provocato alcuna alterazione significativa nella frequenza del *crossing-over* somatico e della non-disgiunzione. Risultati negativi sono stati ottenuti coltivando il diploide in esame sia su MM che su CM. I dati sono riportati nella Tabella II.

Per saggiare se il saccarosio irradiato avesse un effetto mutageno, il ceppo 18 è stato coltivato in presenza di saccarosio normale ed irradiato; quindi i conidi sono stati seminati su MM supplementato con PFP. Su 36 milioni di

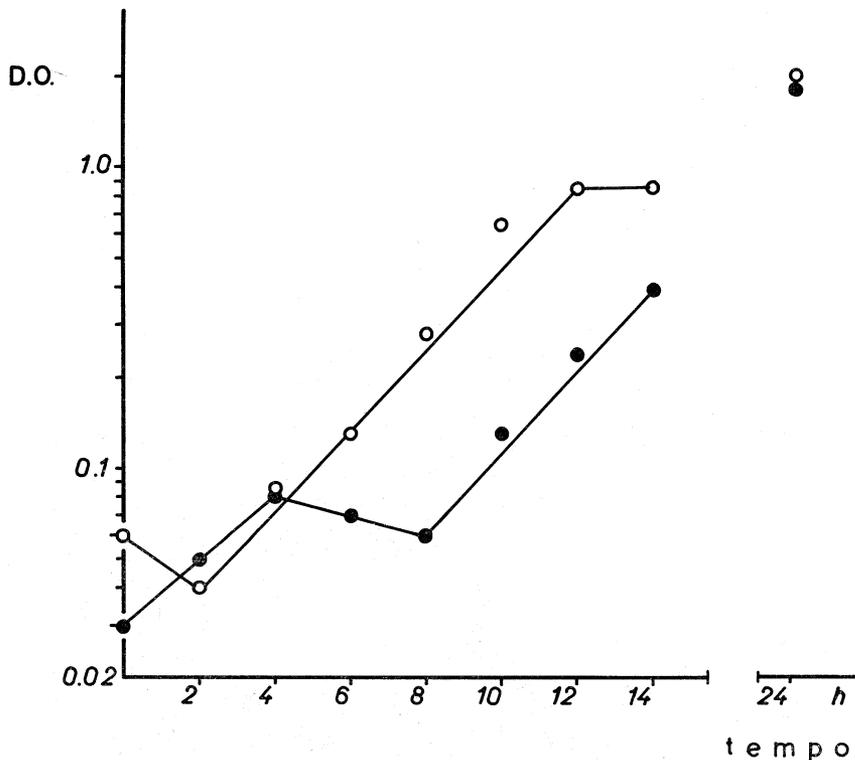


Fig. 2. - Curve di crescita del ceppo HfrCR34 di *E. coli* in presenza ed in assenza di saccarosio irradiato.

○ MM + saccarosio; ● MM + saccarosio irradiato.

conidi coltivati su saccarosio irradiato si è trovato un solo mutante resistente alla PFP. Lo stesso numero di conidi di controllo ha dato quattro colonie mutanti.

Sopravvivenza. - La semina dei conidi sui terreni supplementati con saccarosio irradiato non altera né l'efficienza di piastramento, né la morfologia delle colonie.

Effetti sui Batterii. - Nelle figg. 1, 2 e 3, sono riportate le curve di crescita dei batteri test in terreno MM, in presenza ed in assenza di saccarosio irradiato. È da notare come il comportamento dei quattro ceppi sia tutt'altro che omogeneo per quanto riguarda la crescita su saccarosio irradiato. La

crescita del *B. subtilis* non è influenzata affatto dalla presenza dello zucchero irradiato. I ceppi HfrU37 ed HfrC65 di *E. coli* sono completamente inibiti, mentre il ceppo HfrCR34 presenta una crescita notevolmente rallentata.

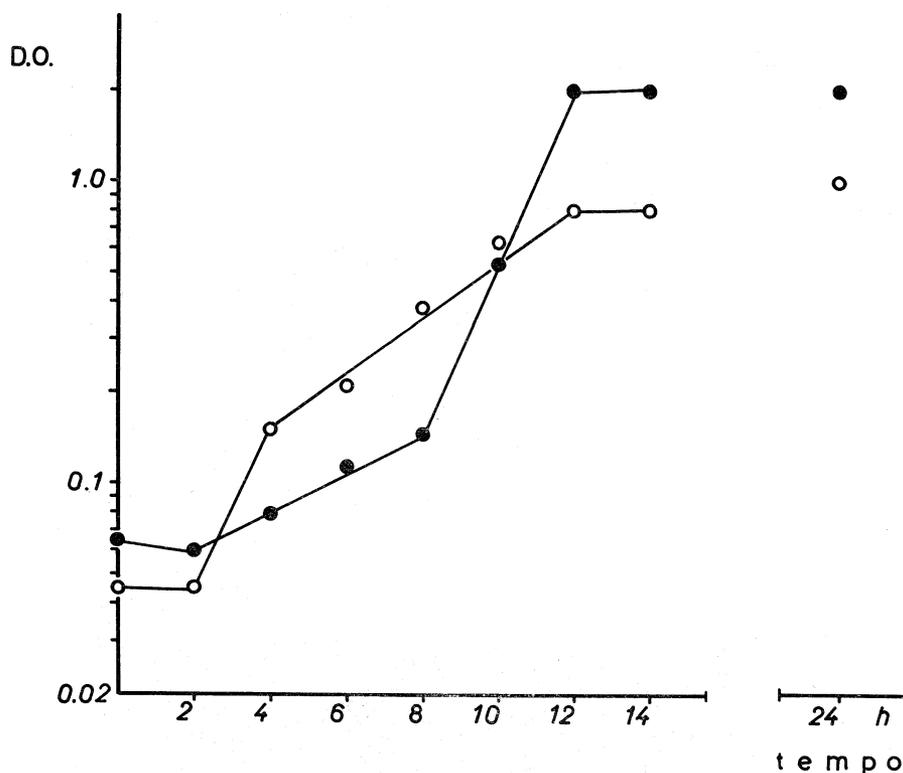


Fig. 3. - Curve di crescita del ceppo *B. subtilis* ICI-NCTC 8236 in presenza ed in assenza di saccarosio irradiato.

○ MM + saccarosio; ● MM + saccarosio irradiato.

Le cellule cresciute in presenza di saccarosio irradiato sono state seminate ad opportune diluizioni, su CM per confrontarne la vitalità con quelle del controllo. Le figg. 4, 5 e 6 mostrano il numero di cellule vive a vari tempi di crescita. Risulta evidente che almeno nei due ceppi di *E. coli* HfrU37 ed HfrC65 il saccarosio ha anche una azione letale oltre che inibitrice della crescita.

Identici esperimenti sono stati condotti su CM: in tutti i batteri esaminati in queste condizioni non vi è stata alcuna alterazione della curva di crescita.

CONCLUSIONI.

Dai dati esposti risulta evidente che il saccarosio irradiato è potenzialmente dannoso alle cellule. La tossicità del saccarosio irradiato è tuttavia molto diversa nei vari sistemi biologici esaminati. In accordo con i dati di Hol-

sten ed altri, si è notato un marcato effetto inibitorio sulla crescita dei tessuti di carota. Si è cercato di mettere in evidenza un effetto inibitorio anche sullo *Aspergillus nidulans* ma non vi è alcuna azione né al livello morfologico, né al livello genetico.

Le ricerche sui batteri hanno messo in evidenza una forte azione inibitrice della crescita e germicida del saccarosio irradiato.

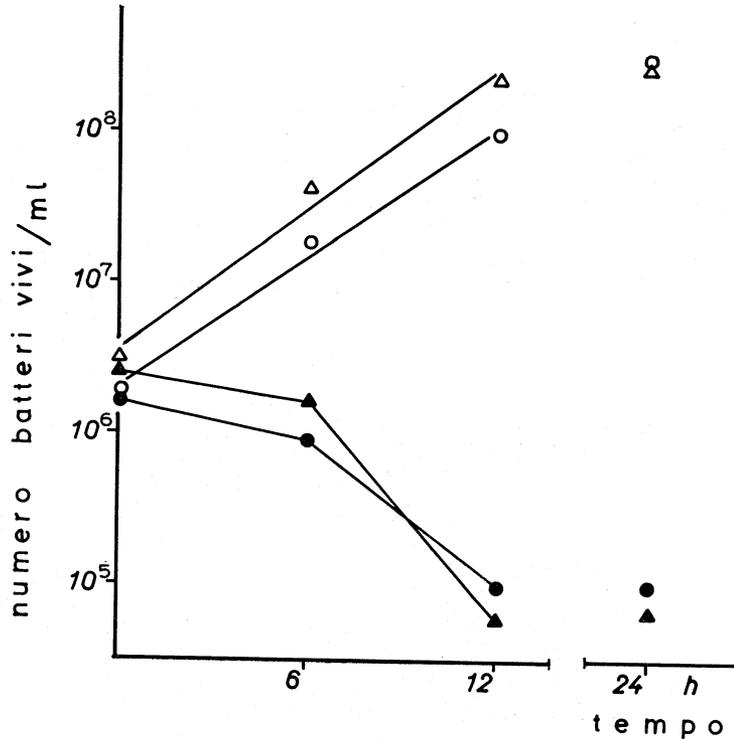


Fig. 4. - Numero di batteri vivi presenti a vari tempi in culture di *E. coli* HfrC65 ed HfrU37 con e senza saccarosio irradiato.

○ MM + saccarosio } HfrC65; △ MM + saccarosio } HfrU37.
 ● MM + saccarosio irradiato } ▲ MM + saccarosio irradiato }

Si deve però notare che uno dei tre ceppi esaminati è molto meno sensibile degli altri due, per cui esiste evidentemente una notevole variabilità anche nell'ambito della stessa specie. Nessun effetto si è invece notato su *B. subtilis*.

Il saccarosio irradiato esercita una azione soltanto in terreno MM dal momento che la crescita in terreno completo rimane inalterata.

Non vogliamo qui discutere quale sia il prodotto della radiazione responsabile di tali effetti, ma solo mettere in evidenza quanta cautela si debba avere prima di decidere sulla possibile pericolosità degli alimenti irradiati, dato che si può facilmente giungere a conclusioni opposte usando diversi sistemi biologici o variando le condizioni ambientali.

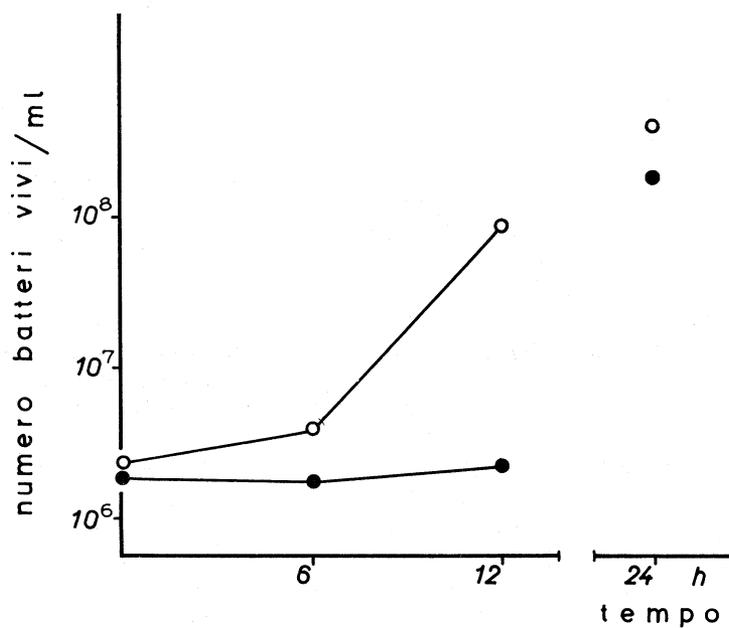


Fig. 5. - Numero di batteri vivi presenti a vari tempi in culture di *E. coli* HfrCR34 con e senza saccarosio irradiato.

○ MM + saccarosio; ● MM + saccarosio irradiato.

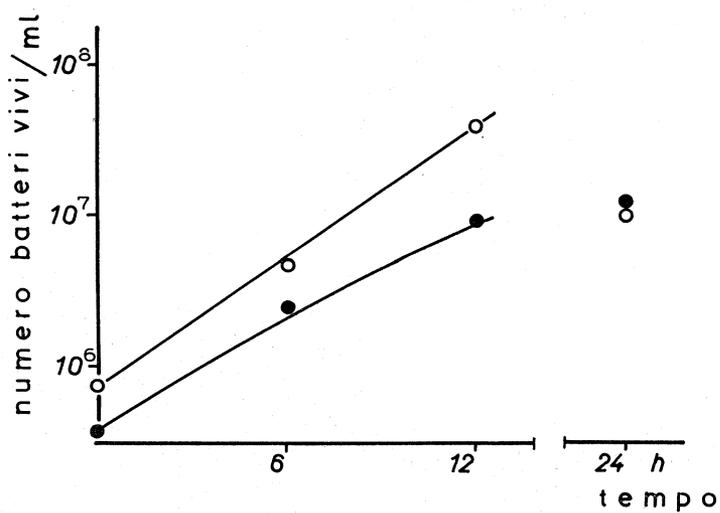


Fig. 6. - Numero di batteri vivi presenti a vari tempi in culture di *B. subtilis* ICI-NCTC8236 con e senza saccarosio irradiato.

○ MM + saccarosio; ● MM + saccarosio irradiato.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. O. PHILLIPS, « Radiat. Res. », 18, 446-460 (1963).
- [2] A. O. ALLEN, « Radiat. Res. Suppl. », 4, 54-73 (1964).
- [3] N. MOLIN e L. EHRENBURG, « Int. J. Rad. Biol. », 8, 223-231 (1964).
- [4] R. HOLSTEN, M. SUGHI e F. C. STEWARD, « Nature », 208, 850 (1965).
- [5] M. W. SHOW e E. HAYES, « Nature », 211, 1254 (1966).
- [6] P. R. WHITE, *The cultivation of Animal and Plant Cells*, Ronald Press Co., New York, 228 (1963).
- [7] F. C. STEWARD, M. O. MAPES e R. MEARS, « Am. J. Botany », 45, 705-708 (1958).
- [8] T. MOURASHIGE e F. SKOOG, « Physiol. Plant. », 15, 473-497 (1962).
- [9] B. FRATELLO, G. MORPURGO e G. SERMONTI, « Genetics », 45, 786-800 (1960).
- [10] G. MORPURGO, « Sci. Repts. Ist. Super. Sanità », 2, 9-12 (1962).
- [11] G. MORPURGO « Sci. Repts. Ist. Super. Sanità », 2, 324-329 (1962).
- [12] F. JACOB e E. L. WOLLMANN, *Sexuality and Genetics of Bacteria*, Academic Press, New York, 61 (1961).