

Ernesto P e s c e

Effetti di irradiazione cronica con radiazioni α su apici radicali di *Lycopersicum esculentum* Mill.

INTRODUZIONE

Gli effetti mutageni delle radiazioni corpuscolari α sulla germinabilità dei semi e sullo sviluppo di plantule di *Lycopersicum esculentum* Mill. sono stati messi in evidenza in un nostro precedente lavoro (PESCE 1961).

Con il presente esperimento si è voluto controllare gli effetti di tali radiazioni corpuscolari su plantule di pomodoro a livello macroscopico, in termini di ritardo di sviluppo e cariologico, in termini di mutazioni cromosomiche nei nuclei di cellule meristematiche radicali.

Ricerche effettuate da diversi Autori hanno messo in luce un particolare comportamento delle cellule sottoposte all'azione della radioattività: in una coltura *in vitro* si può dimostrare che non tutte le cellule sono ugualmente sensibili alle radiazioni, tuttavia, essendo tale coltura derivata da relativamente poche cellule trapiantate nel mezzo colturale, la radioresistenza di alcune di esse non può essere attribuita ad una normale variabilità biologica (GUSTAFSON 1954).

Esiste dunque uno stadio dello sviluppo delle cellule durante il quale esse sono particolarmente sensibili all'azione della radioattività: gli esperimenti hanno dimostrato che il periodo di particolare radiosensibilità corrisponde all'interfase o all'inizio della profase mitotica (ALEXANDER 1959).

Tenuto conto di quanto precedentemente è stato esposto, nel presente lavoro si è voluto cercare, mediante esposizione

cronica ad una medesima quantità di raggi α , in condizioni strettamente controllate l'effetto di tale tipo di radiazione ionizzante su un maggior numero di cellule meristematiche di apici radicali di pomodoro durante lo stadio della loro maggiore radiosensibilità.

Tenendo presente che la durata del ciclo mitotico di tali cellule dura circa 12 ore, alla temperatura di 26°C, il tempo massimo prescelto di 24 ore di irradiazione risulta sufficiente a che tutte le cellule del materiale in esame possano ricevere una certa dose di radioattività nel periodo durante il quale esse sono particolarmente sensibili alle radiazioni ionizzanti.

TECNICA

5 apici radicali appena germogliati da semi di pomodoro, posti a germinare al buio ed alla temperatura costante di 26°C, sono stati disposti a raggiera al centro di un vetrino da orologio sul quale era stato precedentemente applicato un disco di carta da filtro imbevuto di acqua. Sulle plantule, così preparate, è stata sospesa, mediante un anello di vetro del diametro di 3 cm e dello spessore di 2 mm, una sorgente α emmettrice di Pu^{239} avente un'attività specifica di 1 mc ed una energia iniziale di 6,6 meV.

Tale sorgente veniva così a trovarsi alla distanza di circa 1 mm dai germinelli.

L'irradiazione è stata protratta per tempi variabili da 30 minuti a 24 ore. Dopo 24 ore, qualunque fosse stato il periodo di irradiazione, gli apici radicali trattati venivano fissati in miscela alcool-acido acetico (3:1) per 30 minuti e colorati mediante trattamento con reattivo di Schiff, previa idrolisi in N/HCl per 7 minuti. Gli apici colorati sono stati schiacciati in acido acetico al 45% e i preparati sono stati resi permanenti mediante montaggio in euparal.

Le osservazioni sono state condotte usando un fortissimo ingrandimento (1.500 X) con obiettivo ad immersione omogenea.

Per il rilevamento delle mitosi normali ed aberranti è stata usata la medesima tecnica adottata dagli ematologi per la determinazione della formula leucocitaria: il campo microscopico è stato cioè spostato da destra a sinistra e viceversa esplorando così il vetrino a zig-zag.

Sono state prese in considerazione soltanto le cellule in metafase ed anafase essendo pressocchè impossibile rilevare, con assoluta certezza, aberrazioni mitotiche in profase e telofase.

Per ogni vetrino sono state esaminate circa 100 cellule in attività mitotica; tuttavia, per i tempi di irradiazione più lunghi è stato possibile prendere in esame soltanto una cinquantina di cellule per vetrino, essendosi rilevata un'attività mitotica notevolmente ridotta.

Prima di fissare gli apici radicali è stata misurata la lunghezza della plantula in toto, essendo questa misura considerata, da parte dei ricercatori, quale valutazione del danno genetico subito dalla pianta in seguito a qualsiasi trattamento mutageno.

I dati sperimentali sono stati riportati graficamente e saggiati statisticamente, onde evitare qualsiasi dubbio circa la loro significatività.

RISULTATI SPERIMENTALI E DISCUSSIONE

Una prima valutazione dell'effetto mutageno dovuto all'irradiazione cronica colle particelle corpuscolari α , viene messa in evidenza dal grafico in fig. 1 sul quale sono riportati, in ascissa i diversi tempi di irradiazione, in ordinata i singoli valori della lunghezza di ciascuna delle 5 plantule irradiate: si può rilevare come lo sviluppo di dette plantule viene notevolmente e significativamente ritardato dal trattamento ionizzante protratto per tempi molto lunghi.

In fig. 2 si riportano graficamente le percentuali delle mitosi normali (metafasi + anafasi). Anche qui si può notare una significativa diminuzione della attività mitotica normale, che tende a livellarsi su valori pressocchè costanti, per tempi di trattamento molto prolungati.

I grafici, sono stati costruiti in modo da mettere in evidenza anche la variabilità osservata nelle singole plantule e, rispettivamente, nei singoli preparati ottenuti fissando e colorando le plantule stesse: infatti, mentre per i singoli tempi di trattamento e, rispettivamente, per i singoli rilevamenti dai preparati l'ordinata è costante, l'ascissa varia in funzione della misura della plantula e, rispettivamente, delle mitosi normali

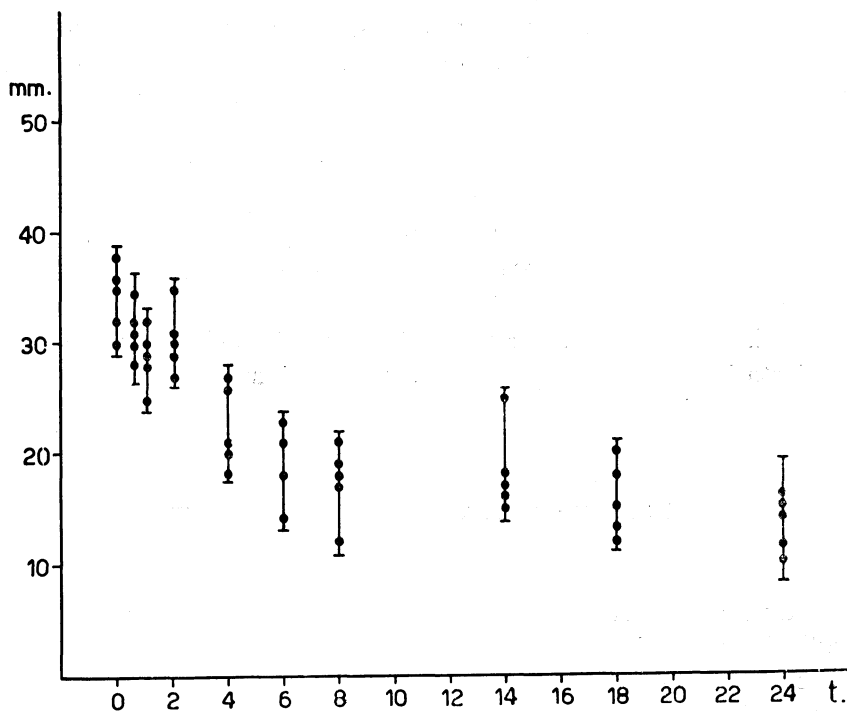


Fig. 1

osservate. Congiungendo i punti estremi delle ascisse, in corrispondenza della ordinata per la quale si rileva la massima variabilità, e riportando tale segmento sugli altri valori delle ascisse, in modo che i valori estremi siano equidistanti dagli estremi del segmento stesso, si ottiene una misura grafica della variabilità riscontrata per i singoli trattamenti (REVELL 1960).

Essendo i valori delle mitosi aberranti complementari di quelli normali, si è omesso di riportarli in grafico. Tuttavia, poichè sono stati tenuti distinti i singoli tipi di mutazioni cromosomiche, sia in metafase che in anafase, i valori per essi osservati sono stati tutti riuniti nelle tabelle I e II; tali valori sono stati confrontati statisticamente col metodo del « t » di Student.

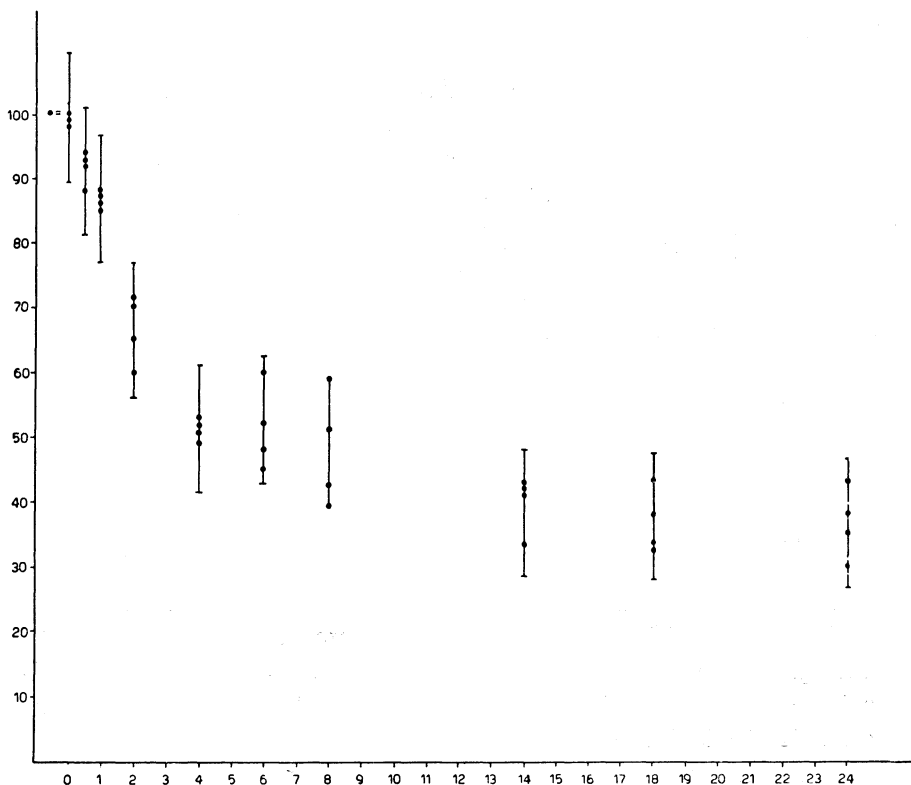


Fig. 2

Uno studio comparato dei dati riportati nelle due tabelle suggerisce importanti considerazioni. Si può notare, innanzitutto, un incremento delle differenze fra le medie dei rilevamenti parallelo all'incremento del trattamento ionizzante; tuttavia, questo incremento non si nota, oppure risulta scarsamente

significativo, per quanto riguarda il rilevamento delle translocazioni. Tale tipo di aberrazione è infatti dovuto all'urto di una particella ionizzante contro il materiale cromatidico; il frammento che ne risulta ha la capacità di riunirsi, in speciali condizioni, e quindi fondersi esattamente allo stesso punto dov'era prima della irradiazione, cosicchè il danno viene ad essere completamente riparato (GLÜCKSMANN 1954). Parte però dei frammenti rimane tale, soprattutto quando il nucleo è stato sottoposto ad elevate dosi di radioattività (CATCHESIDE et al. 1946).

Una riprova delle osservazioni precedentemente riportate viene appunto dalla scarsità delle translocazioni, parallela ad un forte aumento delle frammentazioni e dei cromosomi acentrici, osservabile dalle tabelle I e II.

Le riunificazioni dei frammenti cromatidici possono talvolta avvenire in modo anormale del tutto particolare (ALEXANDER 1959); ne risultano tipiche figure di aberrazioni cromosomiche: i cosiddetti « ponti ». Quanto è stato osservato nei rilevamenti e riportato nella tabella II induce a notare che questo tipo di aberrazione cromosomica risulta incrementata per alte dosi di radioattività, sebbene sia già abbastanza notevole anche a dosi più basse.

L'effetto delle radiazioni sui nuclei delle cellule meristematiche radicali del pomodoro, risultante dal presente esperimento è indubbiamente notevole; esso risulta infatti da una duplice azione del particolare tipo di radiazione usato: l'elevato effetto ionizzante specifico delle particelle α , emesse dal Pu^{239} , dovuto alla grande energia iniziale (6,6 meV) posseduta da tali particelle e l'azione cronica di esse sul materiale in esame (GRAY et al. 1942, 1950, 1951).

L'effetto più notevole che si riscontra nelle cellule, quando esse vengono irradiate con dosi di radioattività non sufficienti ad ucciderle, è un arresto della divisione per un limitato periodo di tempo e, di conseguenza, un arresto dello sviluppo della pianta stessa. Fra i molti autori che hanno condotto indagini su tale fenomeno ci si limita a citare ZIRKLE 1953 e KOLLER 1954.

Questo dato di fatto risulta evidente dal grafico in fig. 2 dove sono riportate le misure delle plantule, rilevate dopo 24

TAB. I
METAFASI ABERRANTI (in %)

Tempo di irradiazione	FRAMMENTAZIONI					TRANSLOCAZIONI					CROMOSONI ACENTRICI				
	R1	R2	R3	R4	M	R1	R2	R3	R4	M	R1	R2	R3	R4	M
Controllo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	1,0	0,0	0,0	0,0	0,250
30 min.	5,7	2,8	0,0	0,9	2,350	2,9	0,9	0,9	0,0	1,175	0,9	0,9	0,9	1,9	1,150
1 ora	1,9	3,0	2,0	3,2	2,525	0,9	1,0	0,0	1,0	0,725	2,9	1,0	2,0	0,0	1,475
2 ore	8,8	6,4	4,2	3,3	5,675	1,7	2,1	2,1	0,0	1,475	5,3	6,4	10,5	4,4	6,650
4 ore	7,6	9,9	12,3	10,4	10,050	1,7	0,0	0,8	1,6	1,025	10,2	8,8	9,7	8,0	9,175
6 ore	9,8	6,0	11,7	10,3	9,450	1,9	1,0	0,9	2,0	1,450	10,0	13,0	9,8	10,3	10,775
8 ore	9,6	9,8	11,9	11,1	10,600	0,0	0,0	0,0	1,5	0,375	5,7	11,3	6,7	6,3	7,500
14 ore	9,6	11,7	14,2	12,0	11,875	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	11,5	9,8	12,5	12,0	11,450
18 ore	13,3	20,0	10,0	16,6	15,025	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	6,6	5,0	7,5	9,2	7,075
24 ore	29,1	19,0	16,0	10,6	18,675	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	6,2	4,5	4,0	12,7	6,850
	D. M. S. 1% = 6,89 5% = 5,10					D. M. S. 1% = 0,83 5% = 0,61					D. M. S. 1% = 2,72 5% = 2,01				

TAB. II
ANAFASI ABERRANTI (in %)

Tempo di irradiazione	FRAGMENTAZIONI					TRANSLOCAZIONI					CROMOSONI ACENTRICI					PONTI				
	R 1	R 2	R 3	R 4	M	R 1	R 2	R 3	R 4	M	R 1	R 2	R 3	R 4	M	R 1	R 2	R 3	R 4	M
Controllo .	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000
30 min. .	0,9	0,9	0,9	0,9	0,900	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	0,9	1,9	1,9	1,9	1,650	3,8	3,8	3,8	3,8	3,800
1 ora . .	0,9	2,0	1,0	1,0	1,225	0,9	0,0	0,0	1,0	0,475	0,9	1,0	4,0	1,0	1,725	4,8	6,0	5,0	4,1	4,975
2 ore . .	8,8	3,2	3,1	2,2	4,325	0,8	0,0	0,0	0,0	0,400	3,5	3,2	3,1	5,5	3,825	10,6	7,5	13,6	10,0	10,425
4 ore . .	11,1	4,4	5,3	8,0	7,200	0,8	0,8	0,0	0,8	0,600	10,2	8,8	8,8	9,6	9,350	12,8	8,8	10,6	11,3	10,875
6 ore . .	10,7	6,0	6,8	13,4	11,725	0,9	1,0	0,0	0,0	0,475	6,8	7,0	5,8	6,1	6,425	10,7	13,0	8,2	6,8	9,675
8 ore . .	13,4	11,7	8,4	10,1	10,900	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	3,8	11,7	11,8	10,1	9,350	7,6	9,8	15,2	10,1	10,675
14 ore . .	13,4	9,8	14,2	12,0	12,350	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	11,5	11,7	10,7	10,3	11,05	13,4	15,6	14,2	12,0	13,800
18 ore . .	13,3	15,0	15,0	16,6	14,915	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	6,6	5,0	5,0	7,1	5,925	23,3	12,5	25,0	11,9	18,175
24 ore . .	16,4	16,6	20,0	10,6	15,900	0,0	0,0	0,0	0,0	0,000	8,3	4,7	14,0	10,6	9,400	10,4	16,6	16,6	10,6	9,400

D. M. S. 1% = 3,11
5% = 2,30

D. M. S. 1% = 0,033
5% = 0,024

D. M. S. 1% = 10,44
5% = 7,97

D. M. S. 1% = 4,17
5% = 3,09

ore dall'inizio dell'irradiazione. Ma, come è stato già detto, un notevole decremento del numero delle cellule in mitosi è stato potuto osservare nei preparati di apici sottoposti a tempi di irradiazione più lunghi, tanto che, per il rilevamento delle aberrazioni mitotiche, si è dovuto ridurre il numero delle cellule sottoposte all'osservazione.

Un altro fattore deve essere tenuto presente per spiegare un così notevole effetto mutageno delle radiazioni α : la decomposizione dell'acqua, largamente dimostrata da numerose ricerche di radiochimica, e l'effetto degli ioni risultanti da tale decomposizione sulle particelle della materia vivente.

Esiste infine una notevole correlazione fra il contenuto in DNA nel nucleo del materiale irradiato e la risposta di detto materiale all'effetto ionizzante in termini genetici e citogenetici (READ 1960).

Sono appunto in corso ulteriori ricerche, dirette in tal senso, da parte dell'Autore del presente lavoro, intese a chiarire i diversi aspetti di tale interessante problema biologico.

RIASSUNTO

Lotti di 5 plantule di pomodoro, appena germinate, sono stati sottoposti all'azione cronica di radiazioni α emesse da una sorgente di Pu^{239} per tempi variabili da 30 minuti a 24 ore.

24 ore dopo il trattamento è stata determinata la misura delle plantule e gli apici radicali sono stati fissati e colorati colla tecnica dello striscio alla Feulgen.

E' stato riscontrato un decremento dello sviluppo delle plantule ed un significativo incremento delle aberrazioni cromosomiche parallelo ad un ritardo dell'attività mitotica soprattutto nei lotti trattati per tempi molto lunghi.

SUMMARY

Groups of 5 tomato seedlings have been cronicly treated with α radiations emitted by a source of Pu^{239} , for times varying from 30 minutes to 24 hours.

After 24 hours from irradiation the seedlings have been measured and the root meristems have been fixed and stained with the Feulgen squash method.

A delay of growth of the seedlings, a significant increase of chromosomal aberrations and a strong delay of mitotic activity have been remarked at the longest times of irradiation.

RESUME'

Des groupes de 5 jeunes plantes de tomate ont été irradiés à l'aide d'une source de Pu²³⁹ pendant des temps variables de 30 minutes à 24 heures.

24 heures après l'irradiation les jeunes plantes ont été mesurées et les pointes des racines ont été fixées et colorées avec la technique de Feulgen.

On a trouvé un ralentissement de développement et un significatif incrément des aberrations chromosomiques avec un retard de l'activité mitotique surtout pour les groupes traités pendant des temps très longs.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, P. - *Atomic radiation and life*. - The Whitefriars Press. London 1959.
- GRAY, L. H. and READ, J. - *The effect of ionizing radiations on the broad bean root*. Part. IV. *The lethal effect of alpha radiations*. Brit. J. Radiol. 15: 320-366. 1942.
- GRAY, L. H. and READ, J. - *The effect of ionizing radiations on the broad bean root*. Part VII. *The inhibition of mitosis by alpha radiation*. - Brit. J. Radiol. 23: 300-303. 1950.
- GRAY, L. H. and SCHOLDS, M. E. - *The effect of ionizing radiations on the broad bean root*. Part. VIII. *Growth rate studies and histological analysis* - Brit. J. Radiol. 24: 82-92. 1951.
- GUSTAFSON, A. - *Mutation research in plants*. - Acta Agr. Scand. 4: 3-15. 1954.
- HERCIK, F. - *Über morphologische Veränderungen in Allium Zellen nach Bestrahlung*. - Protoplasma. 31: 228-233. 1938.
- KOLLER, P. C. - *Chromosome breakage*. In «*Progress in Biophysics*». Vol. IV. Pergamon Press. London 1954.
- NEARY, G. S., EVANS, H. I. and TONKINSON, S. M. - *A quantitative determination of the mitotic delay induced by gamma radiation in broad bean meristems*. J. Genet. 56: 363-394. 1959.
- PESCE, E. - *Effetti delle radiazioni ionizzanti sulla germinabilità dei semi e sullo sviluppo di plantule di Lycopersicum esculentum Mill.* - Delpinoa (n. s.). 3: 205-218. 1961.

- READ, J. - *Chromosome size, structure and radiation damage*. In « *Effects of ionizing radiations on seeds* ». - pp. 216-227. Karlsruhe 1960.
- REVELL, S. H. - *An attempt at continuous metaphase estimation of chromatid and chromosome aberration frequencies in bean meristem cells in the period 2-3 h. after 50 r of X rays*. In « *Effect of ionizing radiations on seeds* ». - pp. 229-242. Karlsruhe 1960.
- THODAY, J. M. - *The effect of ionizing radiation on broad bean roots*. Part. IX. *Chromosome breakage and lethality of ionizing radiations to the root meristems*. - *Brit. J. Radiol.* 24: 572-576.