

Matteo Giannattasio

**Contenuto in acidi nucleici e composizione in basi
del DNA nei tessuti normali e tumorali
di *Scorzonera hispanica* L. coltivati «in vitro»**

INTRODUZIONE

Nel corso della trasformazione tumorale, provocata dall'*Agrobacterium tumefaciens* SMITH & TOWN., le cellule differenziate della pianta ospite riacquistano la capacità di dividersi e proliferano in una maniera anarchica ed esuberante. I tumori che hanno origine da questo processo di crescita anomala, chiamati *crown-galls*, presentano caratteristiche morfologiche e fisiologiche diverse da quelle dei tessuti sani corrispondenti (BRAUN, 1962; KLEIN, 1965). Liberati dalle cellule del batterio, i loro tessuti possono essere coltivati indefinitamente *in vitro* su un substrato privo delle sostanze di crescita necessarie per la coltura dei tessuti normali, e, innestati su piante sane, possono, a loro volta, indurre la formazione di nuovi tumori (GAUTHERET, 1959; GAUTHERET, 1964).

Lo studio comparativo delle proprietà delle cellule normali e tumorali è stato affrontato convenientemente col metodo della coltura *in vitro* ed ha permesso di accertare notevoli differenze nella composizione degli zuccheri e degli acidi organici, nella respirazione e nel metabolismo proteico (GAUTHERET, 1959; GAUTHERET, 1964).

Poiché queste differenze possono riflettere quelle esistenti a livello degli acidi nucleici, abbiamo ritenuto interessante confrontare il contenuto in acidi nucleici e la composizione in basi del DNA in tessuti normali e tumorali coltivati *in vitro*.

MATERIALE E METODO

Colture in vitro: per le presenti ricerche abbiamo utilizzato un ceppo normale ed uno tumorale, che isolammo nel 1966 da espianti di radici di *Scorzonera hispanica* L. Il ceppo normale è stato ottenuto secondo la tecnica riportata da GAUTHERET (1959); esso viene trapiantato ogni due mesi su un substrato fresco contenente la soluzione minerale di Heller, glucosio (5%), vitamina B₁ (10⁻⁶) ed acido indolacetico (2 x 10⁻⁷). Il ceppo tumorale è stato ottenuto nel modo seguente: in alcuni espianti, prelevati tra quelli utilizzati per l'isolamento del ceppo normale, fu inoculata, due giorni dopo la messa in coltura, una sospensione di *A. tumefaciens* (ceppo virulento B₆); dopo due mesi, i tumori che si erano sviluppati furono trapiantati su un substrato avente la stessa composizione di quello utilizzato per il ceppo normale, ma privo dell'acido indolacetico. Questo substrato consentiva la crescita dei tessuti tumorali e non quella dei tessuti sani, in quanto solo i primi sono autotrofi per l'auxina. Successivamente i tessuti tumorali sono stati trapiantati ogni due mesi sullo stesso substrato. Al momento delle esperienze qui riportate, sia il ceppo normale che quello tumorale avevano subito sei trapianti.

Estrazione e dosaggio degli acidi nucleici: gli acidi nucleici sono stati estratti col metodo di HOLDGATE & GOODWIN (1965). Il contenuto in DNA e RNA è stato valutato rispettivamente col metodo della difenilamina e dell'orcinolo (MARKHAM, 1955).

Isolamento e determinazione della composizione in basi del DNA: il DNA è stato estratto secondo MARMUR (1961). La tecnica comprende le seguenti operazioni: rottura delle cellule in presenza di solfato di laurile, deproteinizzazione con cloroformio-alcol isoamilico, eliminazione dell'RNA con RNasi ed infine precipitazione con isopropanolo. Lo spettro di assorbimento nell'U.V. del DNA estratto dai due tessuti era caratterizzato dai seguenti rapporti: 260/230 = 2,0; 260/280 = 1,85.

L'idrolisi del DNA con acido formico, la separazione per cromatografia su carta e la determinazione delle basi sono state eseguite secondo MARKHAM (1955).

RISULTATI

Nella fig. 1 sono riportate le variazioni nel peso fresco e nel peso secco dei tessuti in funzione del tempo. Risulta evidente che gli incrementi nel peso fresco dei tessuti tumorali

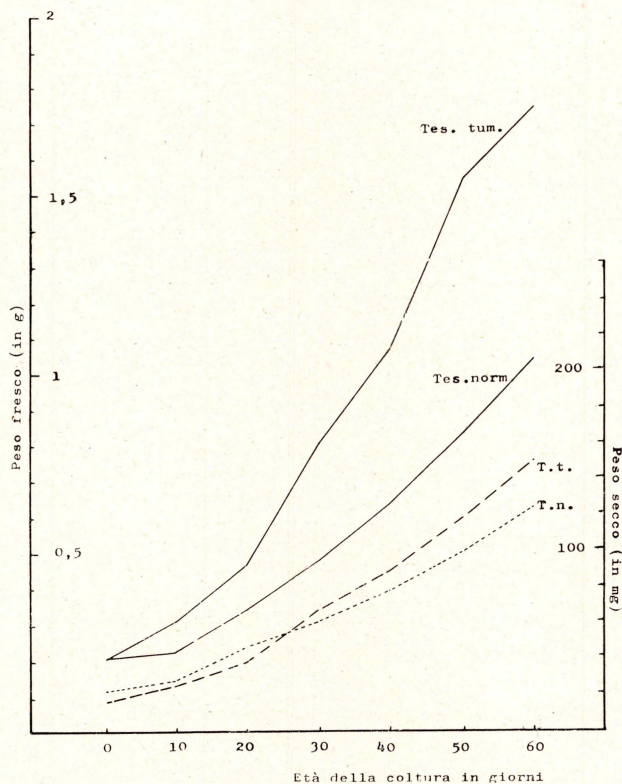


Fig. 1 - Crescita in peso fresco ed in peso secco dei tessuti normali e tumorali di Scorzonera coltivati *in vitro*.

sono più alti di quelli dei tessuti normali, mentre abbastanza vicini sono gli incrementi nel peso secco.

Il contenuto in acidi nucleici dei due tessuti, riferito al peso secco, è riportato nelle figg. 2 e 3. Il tenore in DNA e RNA è risultato sempre più alto nei tessuti tumorali.



Fig. 2 - Variazioni del contenuto in DNA dei tessuti normali e tumorali di Scorzonera coltivati *in vitro*.

Come è riportato nella tab. 1, il rapporto tra le quantità di DNA dei due tessuti oscilla intorno ad 1,1; quello relativo al

Tab. 1 - Rapporto tra le quantità di DNA e RNA dei tessuti tumorali e normali di Scorzonera coltivati *in vitro*.

Giorni	DNA tes. tum.	RNA tes. tum.
	DNA tes. nor.	RNA tes. nor.
10	1,08	1,61
20	1,10	1,66
30	1,12	1,78
40	1,13	1,76
50	1,13	1,74
60	1,11	1,64

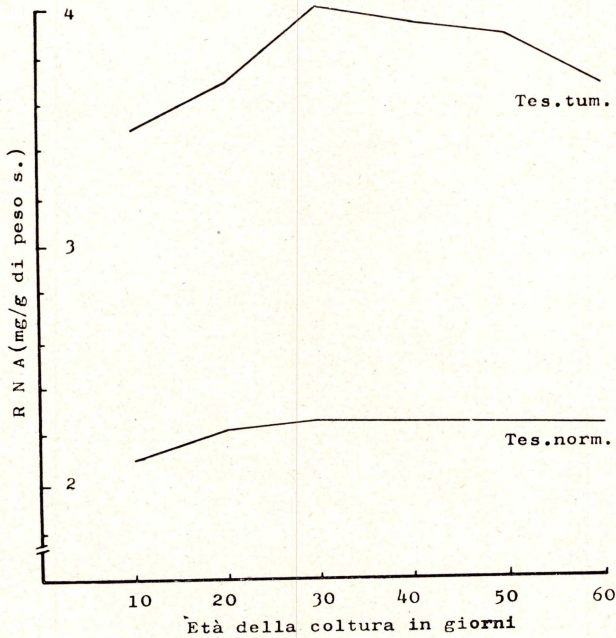


Fig. 3 - Variazioni del contenuto in RNA dei tessuti normali e tumolari di Scorzonera coltivati *in vitro*.

contenuto in RNA varia da un minimo di 1,61 ad un massimo di 1,78, registrati rispettivamente dopo 10 e 30 giorni di coltura.

L'esame della tab. 2 rivela che la composizione in basi del DNA è identica nei due tessuti.

Tab. 2 - Composizione in basi del DNA isolato dai tessuti normali e tumorali di Scorzonera coltivati *in vitro* (in mole %)

Tessuto	Guanina	Citosina	5 metil Cit.	Adenina	Timina
Tumorale	19,2	13,7	5,5	31,0	30,6
Normale	19,2	13,7	5,5	31,0	30,6

DISCUSSIONE

Nessuna differenza è stata osservata nella composizione in basi del DNA dei tessuti normali e tumorali di *Scorzonera* coltivati *in vitro*. Ciò è in accordo con quanto è stato trovato per i tessuti animali (BUSCH, 1962) e per i tessuti di Carota (THOMAS, 1959).

Il contenuto in DNA dei tessuti tumorali di *Scorzonera* è risultato più elevato di quello dei tessuti normali; ciò potrebbe suggerire che nelle cellule tumorali esista un grado di ploidia superiore a quello delle cellule normali. Fenomeni di aneuploidia sono stati frequentemente osservati nei tessuti tumorali coltivati *in vitro* (DE TOROK & WHITE, 1960; PARTANEN & Coll., 1961; DE TOROK, 1965) e stanno ad indicare l'elevata instabilità cariologica di questi tessuti.

Molto accentuate sono le differenze riscontrate nel tenore in RNA. In considerazione del ruolo svolto dai vari tipi di RNA nella sintesi proteica, l'elevato tenore di questo acido nucleico nei tessuti tumorali potrebbe essere messo in relazione con la capacità che hanno questi tessuti di sintetizzare numerosi composti essenziali per la crescita e la divisione cellulare. Infatti, l'attivazione dei sistemi di biosintesi di tali sostanze, che ha luogo nel corso della trasformazione tumorale (BRAUN, 1962) deve comportare un incremento nella sintesi di RNA necessario per l'induzione di nuovi enzimi e per una maggiore produzione di quelli già presenti nella cellula normale.

RIASSUNTO

Sono stati confrontati il contenuto in acidi nucleici e la composizione in basi del DNA dei tessuti normali e tumorali di *Scorzonera hispanica* coltivati *in vitro*. Il contenuto in DNA ed RNA è risultato più alto nei tessuti tumorali. Nessuna differenza è stata, invece, osservata nella composizione in basi del DNA.

SUMMARY

The nucleic acid content and the base composition of DNA in normal Crown-gall tumor tissue cultures of *Scorzonera hispanica* have been compared. Tumor tissue cultures were found to contain an higher DNA and RNA amount. No difference was observed in base composition of DNA.

BIBLIOGRAFIA

- BRAUN, A. C., 1962. *Tumor inception and development in the Crown-gall disease.* Ann. Rev. Plant Physiol., **13**: 533-558.
- BUSCH, H., 1962. *An introduction to the biochemistry of the cancer cells.* Academic Press.
- DE TOROK, D., 1965. *The cytologic and growth Characteristic of tumor and normal clones of Picea glauca.* Cancer Research, **28**: 608-614.
- —, & P. R. WHITE, 1960. *Cytological instability in tumors of Picea glauca.* Science, **131**: 730-32.
- GAUTHERET, R. J., 1959. *La culture des tissus végétaux.* Masson e Cie.
- —, 1964. *La culture des tissus végétaux: son histoire, ses tendances.* Rev. Cyt. Biol. Veg., **27**: 99-220.
- HOLDGATE, D. P. & T. W. GOODWIN, 1965. *Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids.* Phytochemistry, **4**: 831-843.
- KLEIN, R. M., 1965. *The physiology of bacterial tumors in plants and of habituation.* In: Encyclopedia of Plant Physiology (W. Ruhland, ed.), **15**: 209-235.
- MARKHAM, R., 1955. *Nucleic acids, their components and related compounds.* In: Modern methods of plant analysis (Paech e Tracey, ed.), **4**: 246-304.
- MARMUR, J., 1961. *A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms.* J. Mol. Biol., **3**: 208-218.
- PARTANEN, C. R., I. M. SUSSEX & T. A. STEEVES, 1955. *Nuclear behavior in relation to abnormal growth in fern prothalli.* Amer. J. Bot., **42**: 245-256.
- THOMAS, A. J., 1959. *Isolation and base composition of DNA from normal and tumorous carrot tissues.* Arch. Bioch. Biophys., **79**: 162-164.