
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SERGIO COCUCCI, RACHELE MAGGIO, ALBERTO
MONROY, ERASMO MARRÈ

Variazioni a carico dell'RNA totale e ribosomiale nell'endosperma di semi germinanti di Ricino

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.4, p. 545–552.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_4_545_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/>

Fisiologia vegetale. — *Variazioni a carico dell'RNA totale e ribosomiale nell'endosperma di semi germinanti di Ricino.* Nota di SERGIO COCUCCI (*), RACHELE MAGGIO (**), ALBERTO MONROY (***) ed ERASMO MARRÈ (*), presentata (***) dal Socio S. TONZIG.

L'endosperma dei semi germinanti di ricino è un materiale molto favorevole per studi sui meccanismi della transizione dallo stato di inerzia a quello di piena attività metabolica. Esso è infatti costituito da un unico tipo di cellule singolarmente simili tra loro e che, dal bassissimo metabolismo proprio del seme quiescente, passano tutte insieme ad una condizione di notevole attività metabolica, con un massimo al 3^o-5^o giorno di germinazione e, successivamente tutte insieme degenerano rapidamente.

Lavori precedenti dimostrano come, sia nell'endosperma che nell'embrione del seme di ricino, l'attività di un gran numero di enzimi mitocondriali solubili (dosabili in estratti) aumenti nei primi giorni di germinazione [1, 2, 3]. Tale aumento è ostacolato da inibitori della sintesi proteica quali l'attinomicina e la puromicina [2, 3].

Questi fatti uniti alle conoscenze attuali sul meccanismo di sintesi di proteine, fanno pensare che l'aumento generale di attività enzimatica che caratterizza la germinazione del seme sia dovuto, almeno in larga misura, a sintesi *ex novo* di proteine enzimatiche, e che questa sintesi sia mediata da profonde e precoci modificazioni del sistema degli acidi nucleici. È stata pertanto intrapresa una serie di ricerche sul comportamento dei vari tipi di RNA presenti, del DNA e degli enzimi interessati al ricambio degli acidi nucleici e alla sintesi proteica nell'endosperma dei semi germinanti di ricino. La presente comunicazione tratta i cambiamenti nei livelli dell'RNA e del DNA totale, dell'RNA ribosomiale e dell'RNA estraibile con fenolo.

METODI.

Semi di Ricino (*Ricinus communis*, var. *sanguineus*) dopo rimozione dei tegumenti sono stati posti a imbibire al buio su larghe capsule Petri, su tre strati di carta da filtro mantenuta satura d'acqua a 27° C o, quando indicato, a 0° C. Ai tempi voluti di germinazione, l'endosperma di gruppi di 10-20 semi veniva separato dagli altri tessuti del seme e omogeneizzato nei mezzi indicati.

(*) Laboratorio di Fisiologia vegetale dell'Istituto di Scienze Botaniche dell'Università di Milano - Centro di Studio per le Ossido-riduzioni nei Vegetali del C.N.R.

(**) Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Palermo.

(***) Nella seduta del 13 marzo 1965.

a) *Dosaggio del DNA e dell'RNA totali.*

L'RNA e il DNA sono stati estratti secondo il metodo descritto da Nieman [4]; l'RNA è stato dosato mediante l'analisi del P secondo Taussky e Shorr [5]; il DNA mediante la colorazione con difenilamina secondo Burton [6].

b) *Frazionamento dei ribosomi su gradiente di densità.*

Gruppi di 10 endospermi aventi peso da 3 a 5 gr circa a seconda dello stadio di germinazione, venivano portati a peso uguale (5 gr) aggiungendo acqua distillata, quindi rapidamente triturati in mortaio in presenza di 5 ml di Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, Mg acet. 0,004 M, KCl 0,025 M, mercaptoetanolo 0,005 M, saccarosio 0,3 M e 216 mg di bentonite. L'estratto ottenuto in mortaio veniva ulteriormente omogenato in Potter con pestello di teflon.

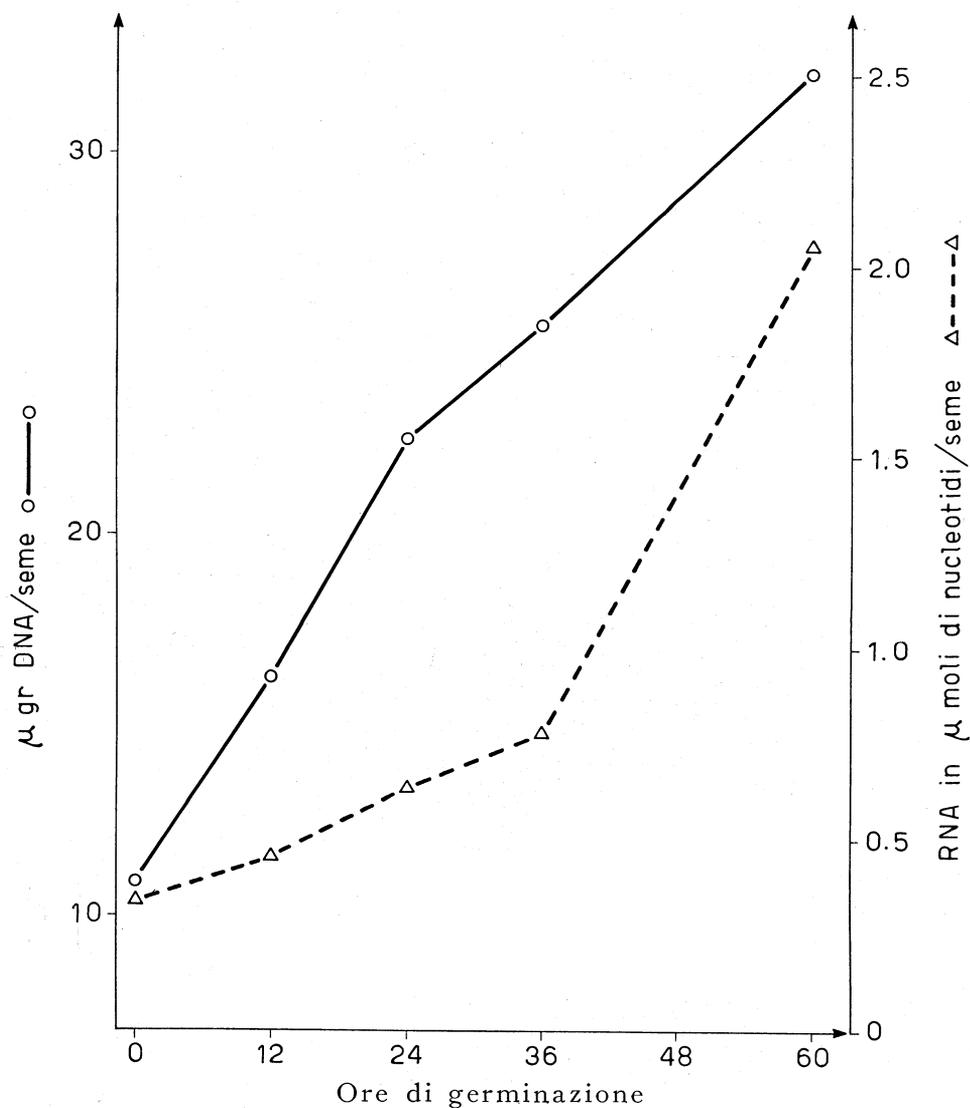


Fig. 1. - Variazioni dell'RNA e del DNA totale nell'endosperma di semi di ricino in germinazione.

L'omogenato veniva trasferito in tubi di centrifuga, aggiungendo altri 2 ml di mezzo tamponato per lavare pestello e omogenizzatore. Dopo centrifugazione per 20 minuti primi a $13000 \times g$, una aliquota di un terzo del sopranatante veniva prelevata delicatamente, evitando che venisse contaminata dal sovrastante strato di grasso, e diluita con un volume di tampone privo di saccarosio e contenente o meno desossicolato (D.O.C.) 1%.

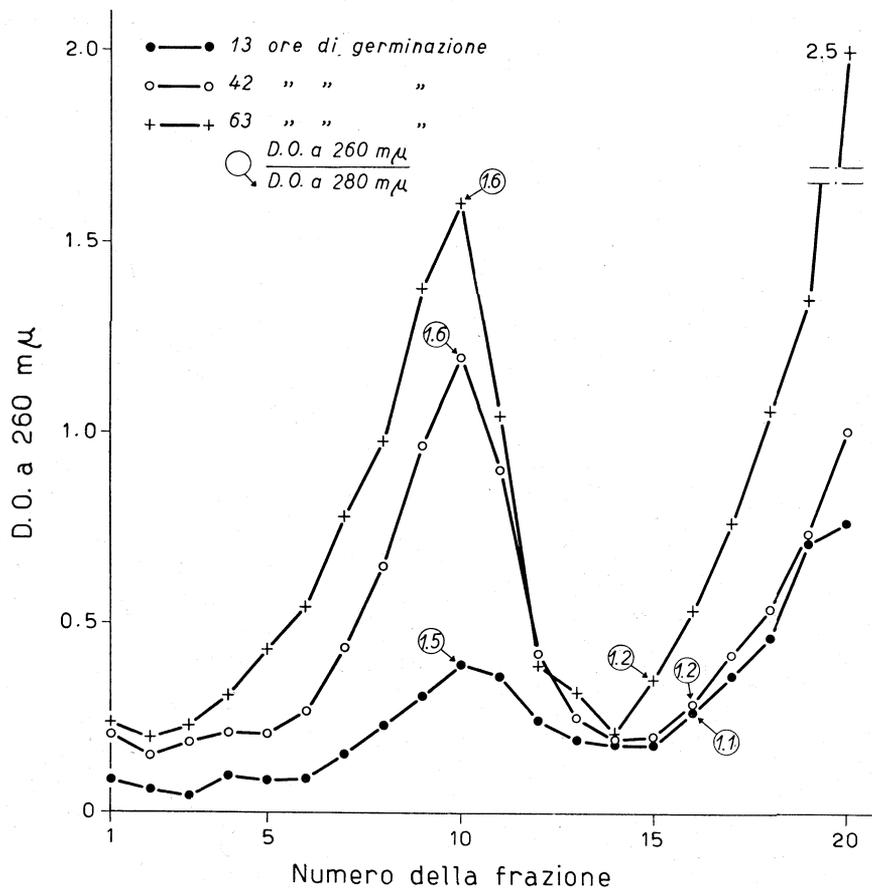


Fig. 2. - Frazionamento su gradiente di saccarosio di sopranatanti di $13000 \times g$ ottenuti da estratti di semi di ricino a diversi stadi di germinazione.

Dopo incubazione per 30 minuti a $0^{\circ}C$, 2 ml del sopranatante così diluito (*equivalenti agli endospermi di 0,8 semi*) venivano stratificati su gradiente 5-20% p/v di saccarosio, centrifugati in centrifuga Spinco (rotore SW 25) a $24000 \times g$ per due o quattro ore come indicato nelle figure. Tutte le operazioni sopradette venivano eseguite quanto rapidamente possibile e a temperatura vicina a $0^{\circ}C$. Successivamente venivano raccolte 20-23 frazioni la cui densità ottica a 260 e a $280 m\mu$ veniva determinata allo spettrofotometro Beckman D U.

c) *Frazionamento dell'RNA estratto con fenolo.*

Gli endospermi di gruppi di 10 semi, portati a peso uguale con acqua, venivano omogenati per 1 minuto in presenza di 1 volume di tampone di fosfato di K $5 \times 10^{-4}M$, pH 7, contenente dodecilsolfato sodico 0,5 %. Alla sospensione veniva aggiunto 1 volume di fenolo. Le successive operazioni, compreso il trattamento con DNAsi venivano compiute seguendo strettamente la procedura descritta da Hiatt [7]. Dopo l'ultimo lavaggio con alcool, il preci-

pitato veniva sciolto in 2 ml di K acetato 0,2 M e dializzato per 4 ore contro K acetato 0,005 M. Successivamente, aliquote corrispondenti (su base numero di semi) di RNA, sciolte in Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2 venivano stratificate su gradiente 5-20% p/v di saccarosio e centrifugate in Spinco (rotore SW 25) a $25000 \times g$ per 16 ore. La densità ottica a 260 $m\mu$ delle frazioni successivamente raccolte era determinata allo spettrofotometro Beckman D.U.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

A) La fig. 1 mostra come il DNA e l'RNA totale aumentino nelle prime 60 ore di germinazione.

B) Le fig. 2, 3 mostrano le curve dei valori di densità ottica a 260 $m\mu$ delle frazioni raccolte dopo centrifugazione su gradiente 5-20% p/v di

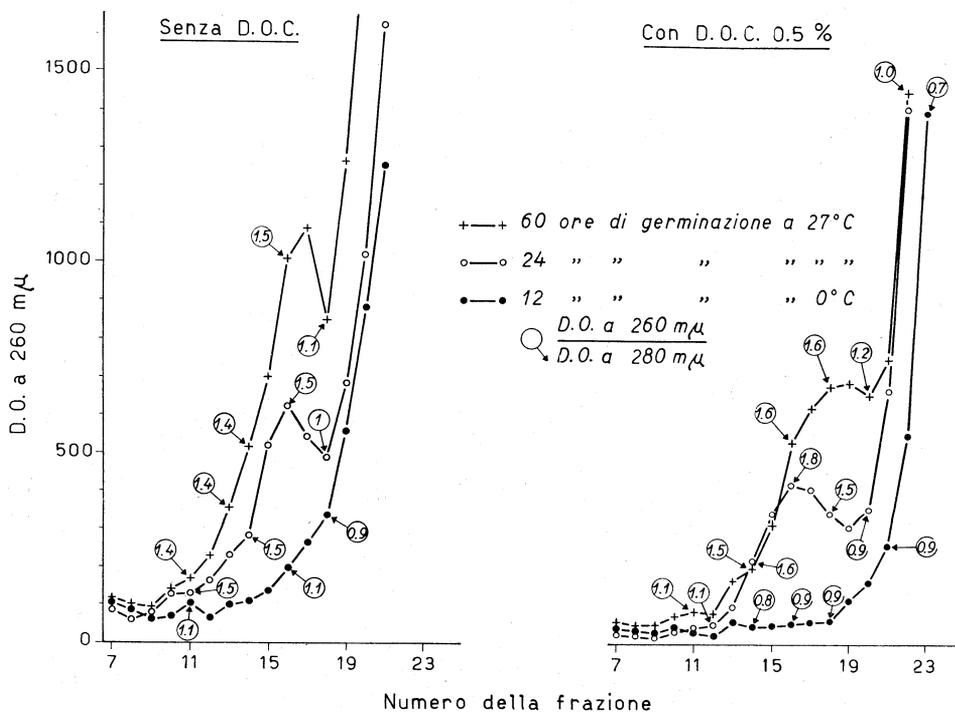


Fig. 3. - Effetto del DOC sul frazionamento in gradiente di saccarosio di sopranatanti $13000 \times g$ ottenuti da endospermi di seme di ricino a diversi stadi di germinazione.

saccarosio di aliquote del sovranatante di centrifugazione a $13000 \times g$ di endospermi di semi a vari tempi di germinazione. Le curve della fig. 2 presentano un netto picco; il rapporto tra le densità ottiche a 260 e a 280 $m\mu$ nella zona di questo picco corrisponde a quello usualmente ritenuto proprio dei ribosomi. È evidente il progressivo aumento del picco «ribosomiale» con l'allungarsi del periodo di germinazione. Il materiale ribosomiale aumenta di circa tre volte nel periodo compreso tra 13 e 40 ore di germinazione e, anche se in misura minore, aumenta ancora dalle 42 alle 63 ore. Nell'esperienza cui si riferisce la fig. 3, la separazione dei ribosomi è stata meno netta

che nella precedente, presumibilmente a causa del minor tempo di centrifugazione; ciò nonostante, i picchi dovuti a materiale ribosomiale sono ben riconoscibili. La fig. 3 include, in più di quella precedente, i dati relativi al comportamento in gradiente del sopranatante di endospermi di semi che possono considerarsi molto simili a quelli secchi, in quanto imbibiti per 13 ore a 0°C anziché a 27°C (il comportamento dell'endosperma del seme secco non si è potuto studiare perché in mancanza di un certo grado di imbibizione la rimozione rapida dei cotiledoni è molto difficile). È interessante osservare come

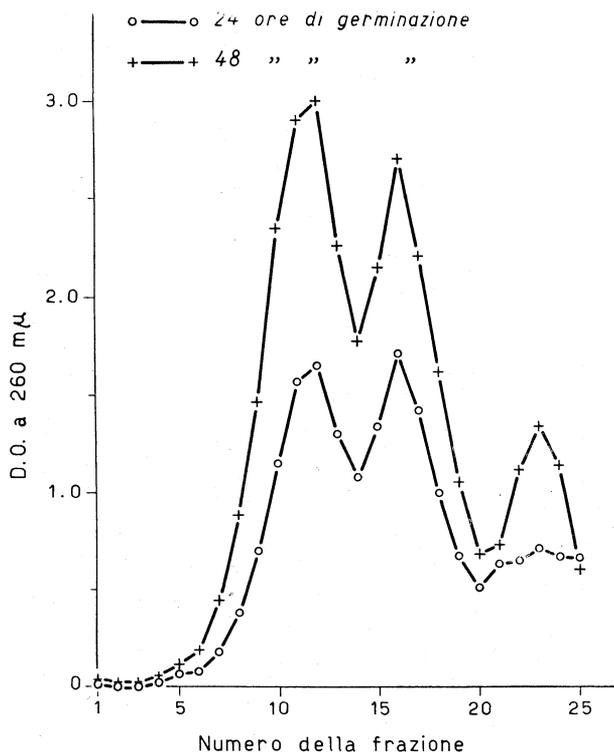


Fig. 4. - Frazionamento su gradiente di saccarosio dell'RNA totale, estratto con il metodo del fenolo, di endospermi a diverso stadio di germinazione.

negli endospermi dei semi imbibiti a 0°C il « picco ribosomiale » risulti praticamente assente. Il trattamento con D.O.C. non modifica sostanzialmente l'andamento delle diverse curve, ma sembra rendere anche più evidente l'assenza di materiale ribosomiale negli endospermi dei semi imbibiti a 0°C per 13 ore.

C) Le curve di distribuzione delle frazioni ottenute ponendo su gradiente 5-20% p/v di saccarosio RNA estratto con fenolo da endospermi di semi germinati rispettivamente da 24 a 48 ore (fig. 4) mostrano ben chiari due picchi localizzati in corrispondenza alle concentrazioni 13% e 11% di saccarosio: picchi che sembrano doversi interpretare come ribosomiali [7]. Un terzo picco con massimo alla concentrazione 7% di saccarosio appare attribuibile all'RNA solubile. Le due curve mettono in evidenza che nel

preparato ottenuto da endospermi di 48 ore di germinazione i tre picchi raggiungono altezze circa doppie di quelle osservate per i semi di 24 ore di germinazione.

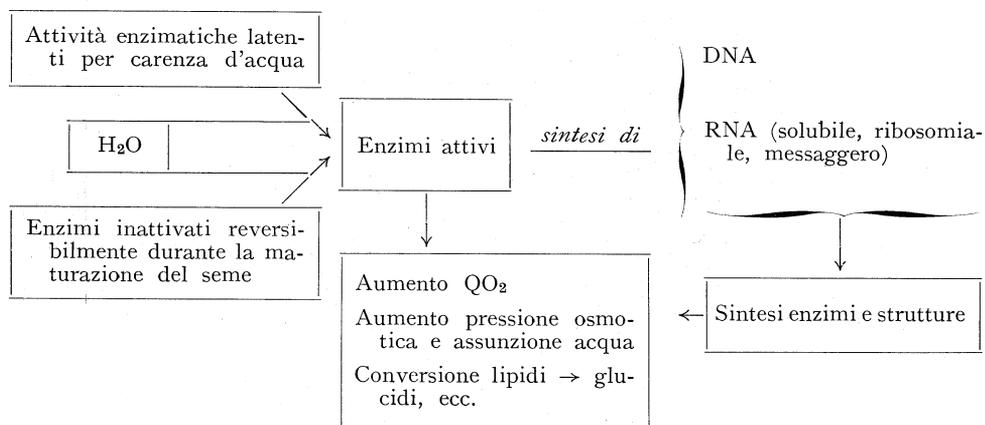
DISCUSSIONE.

La letteratura sul rapporto tra sintesi dell'RNA e sintesi proteica nelle piante superiori, benché relativamente scarsa, è generalmente favorevole a una stretta correlazione tra i due fenomeni (Oota Y., 1964) [8]. Durante la germinazione, sono state osservate variazioni in sensi opposti per i diversi organi del seme: ciò che non stupisce date le differenze strutturali e funzionali tra le diverse parti che compongono il seme.

I risultati delle nostre ricerche mettono in evidenza una rapida attivazione del metabolismo di sintesi degli acidi nucleici nell'endosperma di semi di ricino in germinazione. Tale attivazione è già evidente dopo 13 ore di imbibizione del seme e riguarda sia il DNA che almeno due frazioni (quella ribosomiale e quella solubile) del sistema dell'RNA. Le odierne conoscenze sulle funzioni degli acidi nucleici suggeriscono ovviamente un rapporto di causa e effetto tra i processi di sintesi di acidi nucleici e quelli, precedentemente studiati nello stesso materiale, di attivazione della sintesi di enzimi e di strutture.

L'attivazione del meccanismo di sintesi degli acidi nucleici appare d'altronde in chiaro rapporto con l'idratazione del seme; rapporto in parte diretto in quanto l'aumento del tenore in acqua nel plasma condiziona l'attività dei sistemi enzimatici tuttora attivi nel seme maturo, e in parte indiretto in quanto, come risulta da ricerche parallelamente eseguite in questo laboratorio, l'idratazione determina il passaggio di almeno alcuni enzimi dalla forma inattiva a quella attiva [9].

Appare pertanto possibile collegare secondo il seguente schema i dati sinora ottenuti sul risveglio generale dell'attività fisiologica nell'endosperma del seme di ricino in via di germinazione:



Mentre i nostri reperti mettono in evidenza l'aumento, durante la germinazione, dell'RNA totale e degli RNA ribosomiale e solubile, lasciando impregiudicato il comportamento dell'RNA messaggero, Marcus e Feeley [10] concludono un recentissimo studio sulle caratteristiche del sistema dell'RNA nei cotiledoni di semi d'arachidi affermando che non esistono differenze tra seme secco e seme germinante per quanto riguarda i ribosomi, l'RNA e gli enzimi attivanti gli aminoacidi, e che l'incapacità di incorporare aminoacidi marcati nelle proteine, da parte di preparati ottenuti dal seme secco è essenzialmente imputabile a difetto di RNA messaggero. I reperti di questi Autori non sono facilmente confrontabili con i nostri sia per la differenza del materiale usato, sia perché le attività delle loro preparazioni ribosomiali non sono riferite per seme, ma piuttosto come attività specifiche (cioè per mg di RNA). Questa divergenza di comportamento fa pensare che, nei tessuti dei semi maturi, una inattivazione del sistema degli acidi nucleici possa essere dovuta a situazioni molto diverse per semi di diversa specie e probabilmente anche per le diverse parti di uno stesso seme.

I diversi semi e gli organi di uno stesso seme affrontano la fase finale della maturazione in condizioni fisiologiche molto diverse, tali quindi da incidere in modo diverso sull'entità dei processi di inattivazione del sistema degli acidi nucleici. Si potrebbe pensare che in materiali quali i cotiledoni di arachide, l'arresto totale di attività metaboliche conseguente all'essiccamento del seme venga a interrompere il processo di degradazione dei ribosomi in una fase molto più precoce di quanto non avvenga nell'endosperma di seme di ricino. Il controllo della validità di questa ipotesi richiede che le ricerche vengano estese al comportamento delle diverse frazioni dell'RNA durante la maturazione di semi di diversa specie; e ciò costituisce l'obbiettivo delle indagini attualmente in corso in questo laboratorio.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] T. AKAZAWA, H. BEEVERS, «Biochem. J.», 67, 110 (1957).
- [2] F. ALBERGHINA, «Giorn. Bot. Ital.» (in corso di stampa) (1964).
- [3] F. ALBERGONI, P. LADO, G. MARZIANI, E. MARRÈ, «Giorn. Bot. Ital.» (in corso di stampa) (1964).
- [4] R. H. NIEMAN, L. L. POULSEN, «Plant Physiol.», 38, 31 (1963).
- [5] H. H. TAUSSKY, E. SHORR, «J. Biol. Chem.», 202, 475 (1953).
- [6] K. BURTON, «Biochem. J.», 62, 315 (1956).
- [7] H. H. HIATT, «J. Mol. Biol.», 5, 217 (1962).
- [8] Y. OOTA, «Ann. Rev. Plant. Physiol.», 15, 17 (1964).
- [9] M. P. CORNAGGIA, R. BIANCHETTI, «Giorn. Bot. Ital.», (in corso di stampa) (1965).
- [10] A. MARCUS, J. FEELEY, «Proc. Nat. Ac. Sc.», 51, 1075 (1964).

ABSTRACT. — *Changes of total and of ribosomal nucleic acids in the endosperm of germinating castor bean seeds.* The changes of total RNA and DNA, ribosome RNA and phenol extractable RNA in the endosperm of castor bean seeds during the first 60 hours of germination have been investigated.

Total RNA and DNA increase by more than 200% during the germination period investigated. Sucrose gradient fractionation of phenol-extracted and purified RNA showed two distinct peaks corresponding to those commonly found for ribosomal RNA, and a third, minor peak apparently corresponding to soluble RNA. All of these peaks strongly increase with increase of the germination period from 24 to 48 h.

Sucrose gradient fractionation of the supernatant of centrifugation at $13,000\times g$ from homogenates from the endosperm shows that the ribosome peak is practically absent at 0 hours of germination, while it rapidly and steadily increases during the following 60 h.

These data are put in relation with previous findings on the decrease of total RNA and ribosomal RNA during the latest phases of castor bean seed maturation, as well as with the rapid increase of a number of enzyme systems and structures in the endosperm during the early phase of germination. They are interpreted as showing that a rapid activation of synthesis of the various components of the nucleic acid system plays an important role in determining the metabolic activation of the germinating endosperm.