
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO BELLANDO, NEVIO FIUSSELLO

I precursori non fosforilati degli acidi nucleici negli embrioni germinanti di *Phaseolus vulgaris*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.1, p. 108–112.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_1_108_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/>

Botanica. — *I precursori non fosforilati degli acidi nucleici negli embrioni germinanti di Phaseolus vulgaris.* Nota di MARIO BELLANDO e NEVIO FIUSSELLO (*), presentata (**) dal Socio C. CAPPELLETTI.

ZUSAMMENFASSUNG. — Die Verfasser haben die in den Keimlingen von im Dunkeln keimenden Gartenbohnen in freiem Zustand vorkommenden Nucleinbasen und Nucleoside durch chromatographische u. spektrophotometrische Methoden untersucht.

Die etwa 25 cm grossen Pflanzen wurden mit einer zweckmässigen Menge Wasser homogenisiert und die unsere Arbeit betreffenden Stoffe durch langdauernde Dialysis des Homogenätes in Kühlschrank als verdünnte Lösung gewonnen. Diese wurde bei Zimmertemperatur in einem Rotationschichtverdämpfer stark eingengt und in einer mit Dowex 2 × Austauscher (HCOO⁻ Form) gefüllten Säule analysiert. Die getrennten Fraktionen wurden noch papierchromatographisch gereinigt und die Nucleinkörper spektrofotometrisch identifiziert.

Questo lavoro si inserisce nell'ambito di una serie di ricerche svolgentesi in questo Istituto, aventi per scopo la determinazione ed il dosamento degli acidi nucleinici e dei loro costituenti più semplici durante il processo germinativo: nella Nota presente sono stati presi in considerazione le nucleobasi e i nucleosidi presenti allo stato libero negli embrioni di fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) in stadio di avanzata germinazione.

MATERIALE E METODO.

Una cinquantina di semi di fagiolo è stata fatta germinare al buio e in adatte condizioni di temperatura e di umidità. Le pianticelle così ottenute, di altezza compresa tra i 23 ed i 26 cm. sono state private dei cotiledoni, lavate e omogeneizzate a bassa temperatura in presenza di poco toluene: l'omogenato risultante è stato dializzato a lungo contro acqua cambiata frequentemente a 4° C. Le sostanze dializzate, che è lecito ammettere contengano le sostanze interessanti la nostra ricerca in proporzioni molto prossime a quelle presenti nel vegetale sono state ottenute evaporando la soluzione diluita sotto vuoto e a temperatura ambiente in evaporatore rotante. Il residuo gommoso, fortemente colorato ed incristallizzabile è stato frazionato in gruppi mediante cromatografia su colonna, impiegando uno scambiatore anionico

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto Botanico di Torino (Dir. A. Ceruti) con il contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 13 novembre 1965.

forte. Le condizioni operative sono le seguenti: [1] [2]

Scambiatore: Resina Dowex 2 X, forma HCOO^- , 250-400 mesh.

Colonna: superf. di base: 2 cm^2 , altezza del letto di resina: 40 cm.

Velocità di efflusso: 0,5 ml/min. (Un tubo = 10 cc).

Adsorbimento: pH 11 per NH_3

Eluzione: sono state impiegate soluzioni di formiato ammonico a forza ionica e ad acidità crescente (vedi Tabella I).

TABELLA I.

Eluente	pH	μ	Sostanze eluite	
Formiato di ammonio	a	10,5	10^{-2}	Cy, Cy - derivati, Adeninderiv.
	b	10,1	10^{-2}	
	c	8,6	$2 \cdot 10^{-2}$	TyDR, U, UR.
	d	7,5		Gu, Gu - derivati, A.
	e	7,2	0,1	Hyp. HypDR.

L'eluzione ha luogo a temperatura ambiente: l'andamento di essa viene seguito e registrato automaticamente da un densitometro UVICORD ($\lambda=353$). La fig. 1 ne illustra l'andamento:

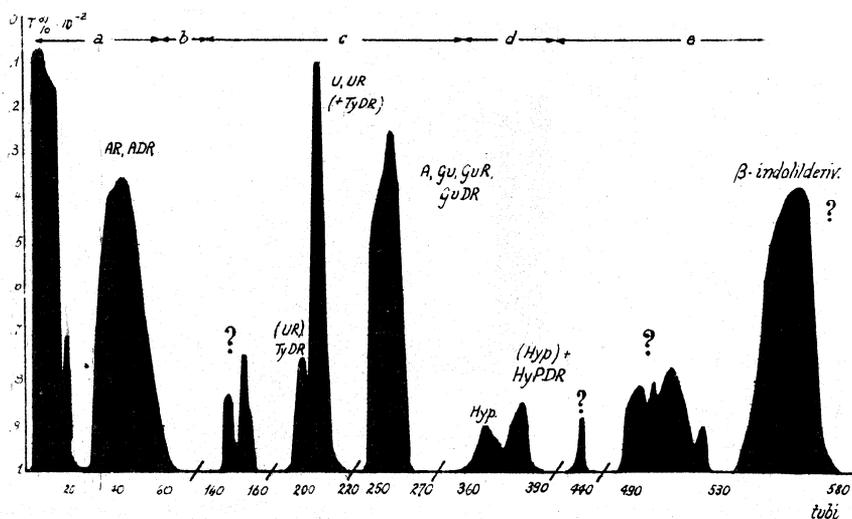


Fig. 1. - Diagramma di eluzione dell'estratto grezzo (le frazioni contrassegnate da ? non contengono derivati nucleici).

Tubi	Componenti identificati	Abbondanza relativa (in moli)
3 - 20 (*)	CyR, CyDR, Cy	CyR : CyDR : Cy = 100 : 2 : 2
25 - 70	AR, ADR	AR : ADR = 100 : 7
190 - 202	TyDR	
203 - 220	UR, U, TyDR	UR : U : TyDR = 100 : 5 : 5
248 - 273	A, GuDR, GuR, Gu	A : GuDR : GuR : Gu = 100 : 63 : 16 : 9
362 - 374	Hyp	
378 - 396	Hyp, HypDR	100 : 16

(*) Identificazione e dosamento effettuati sulle frazioni ricromatografate sec. la fig. 2.

Nelle condizioni di eluzione ora descritte non è possibile ottenere una separazione dei derivati citosinici da varie impurezze (zuccheri, ecc.) presenti in concentrazione tale da renderne impossibile la purificazione e l'identificazione cromatografiche. Ricromatografando questa frazione (tubi da 3 a 25) su colonna identica alla precedente ma di lunghezza maggiore (50 cm.) è possibile, per le migliori condizioni sperimentali, ottenere una sufficiente separazione dalle sostanze inquinanti. (ved. fig. 2).

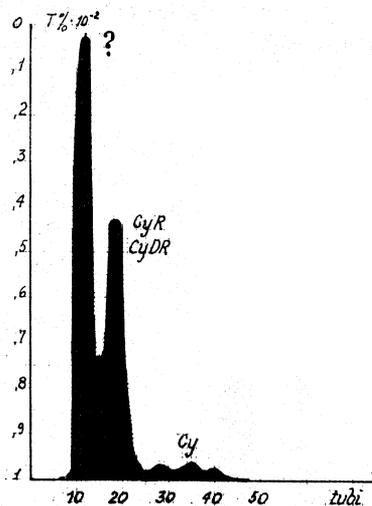


Fig. 2. - Purificazione dei Cy-derivati.

Le frazioni cromatografiche separate vengono tirate a secco a temperatura ambiente e il formiato ammonico sublimato sotto vuoto ($p = 50 \cdot 10^{-3}$ Torr, $t = 37^{\circ}$ C). I derivati nucleinici in esse presenti sono stati ulteriormente pu-

rificati e identificati per via cromatografica [4] [5] [6] e spettrofotometrica: [2] [3] si è assunto come criterio di identificazione la concordanza sperimentale dei valori di R_f in più di un solvente, in presenza di marker puri, la coincidenza dei dati spettrofotometrici con quelli citati nella letteratura nel campo di lunghezza d'onda da 2200 a 3100 Å e a vari valori di pH, la posizione dei punti isosbastici. Nella maggior parte dei casi è stato necessario, anche per frazioni contenenti un solo componente, ricorrere a cromatografie bidimensionali per liberare i derivati nucleici da numerose impurezze fluorescenti: ove questa tecnica non è stata possibile (deposizione della sostanza lungo una linea, presenza di marker, ecc.) si è ricorso a successive eluzioni e ricromatografando secondo la solita tecnica monodimensionale.

Sono state inoltre determinate, ove possibile, le abbondanze relative dei vari componenti nell'ambito di ciascuna frazione: esse hanno valore semi-quantitativo, specialmente nei casi in cui la stessa sostanza si ripartisce, a causa dell'incompleta separazione dei picchi, in due frazioni diverse.

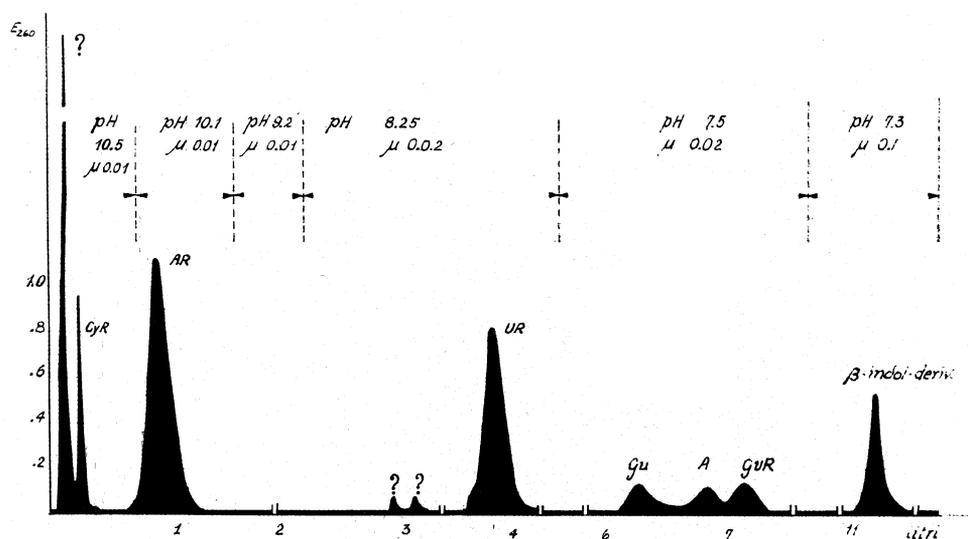


Fig. 3.

Un confronto con il diagramma di eluzione dei cotiledoni di *Phas. vulgaris* allo stato quiescente, (vedi fig. 3) ottenuto con procedimento analogo nel corso di un precedente lavoro [7] rivela differenze qualitative interessanti, quali la comparsa nel materiale germinante di quantità relativamente notevoli di desossiriboderivati (GuDR, ADR, TyDR, HypDR) e di ipoxantina libera.

Sul significato biologico di tali variazioni non è ovviamente possibile, in base ai dati da noi finora pubblicati, enunciare ipotesi o trarre conclusioni: ciò sarà, crediamo, possibile nell'ambito di un quadro più completo di tali dati, la cui elaborazione è tuttora in corso nei nostri laboratori.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] W. E. COHN, « J. Am. Chem. Soc. », 72, 1471 sgg.
- [2] E. CHARGAFF, J. N. DAVIDSON, *The nucleic acids*, N.Y. (1955).
- [3] H. M. MERSCHENSON, *U.V. and visible absorption spectra*, N.Y. (1956).
- [4] K. PAECH, M. W. TRACEY, *Mod. Meth. der Pflanzenanalyse*, Berlin (1956).
- [5] G. DUPONT, A. KIRRMAN et al. *Chromatographie*, vol. II, Paris (1960).
- [6] E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Berlin (1962).
- [7] M. BELLANDO, *I precursori non fosfor. degli A.N. nei cotil. di Ph vulgaris allo stato quiesc.*, « Acc. naz. Lincei », Rend. Sc. fis., mat. e nat., ser. VIII, vol. XXXIV, 5 (1963).