
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ERASMO MARRÈ, MARIA SCHWENDIMANN, PIERA LADO

**Ricerche sull'invecchiamento in foglie recise. - I.
Effetto protettivo degli zuccheri e della luce sui
sistemi fotosintetico e respiratorio di foglie recise di
*Solarium tuberosum***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.6, p.
1089–1094.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_6_1089_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. — *Ricerche sull'invecchiamento in foglie recise.* —

I. *Effetto protettivo degli zuccheri e della luce sui sistemi fotosintetico e respiratorio di foglie recise di Solanum tuberosum* (*). Nota di ERASMO MARRÈ, MARIA SCHWENDIMANN e PIERA LADO, presentata (**) dal Socio S. TONZIG.

SUMMARY. — In potato leaf discs incubation in the dark for 40–48 h induced a marked drop of chlorophyll, a decrease of proteins and a strong increase of free aminoacids, a decrease of the capacity of isolated chloroplasts to carry on the Hill reaction, a fall of the activity of cytochrome oxidase, malate dehydrogenase, glucose-6-P dehydrogenase, NADH₂ oxidase. All of these manifestations of senescence appeared strongly counteracted by the presence of sucrose, glucose, fructose, galactose, and glycerol (which was efficiently converted into sugar within the tissue). A protective effect fairly similar to that of the sugars was obtained by illuminating the leaf discs during incubation. This effect of light was almost completely suppressed by the presence of the photosynthetic CO₂ fixation inhibitor DCMU, thus suggesting that protection by light is largely due to the production of photosynthates.

These results are interpreted as indicating a regulatory function of the level of sugars on the enzyme and protein pattern of the leaf cell.

INTRODUZIONE.

Foglie recise, o frammenti delle stesse, costituiscono da tempo un materiale di elezione per lo studio nelle piante del fenomeno dell'invecchiamento definito, nel modo più essenziale, come prevalenza del metabolismo demolitivo su quello sintetico. I dati della letteratura dimostrano come durante l'incubazione (in genere al buio) in acqua o soluzioni tampone diluite, di foglie o frammenti fogliari, si assista col progredire del tempo ad una caduta del tenore in clorofilla, in proteine solubili e in acidi ribonucleici [10, 11], e ad un aumento dell'attività di enzimi idrolitici quali RNasi e peptidasi [3, 4, 12]

Questo quadro, relativamente anche in specie molto diverse, si instaura entro un intervallo relativamente breve (da meno di 24 ore a pochi giorni dalla rimozione delle foglie dalla pianta madre), e risulta efficacemente inibito dalla cinetina [3, 10, 11], sostanza ad azione di tipo ormonale, la cui presenza però come ormone naturale delle piante superiori non è stata ancora dimostrata.

L'inibizione da cinetina delle manifestazioni dell'invecchiamento nelle foglie recise sembra indicare che esse non sono direttamente attribuibili a

(*) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Fisiologia vegetale dell'Istituto di Scienze Botniche dell'Università di Milano. Centro di Studio del C.N.R. per le ossido-riduzioni nei vegetali. Gruppo di ricerca del C.N.R. sulla sintesi proteica nei vegetali.

(**) Nella seduta del 22 giugno 1966.

un difetto di substrati respiratori in quanto materiali energetici o plastici ma, se mai, a una incapacità di utilizzare a questi fini le riserve presenti nelle foglie al momento del prelievo, dovuta a disturbi dei sistemi cellulari di regolazione. Questa considerazione rende interessante un'altra serie di osservazioni, che indicano come l'azione protettiva della cinetina possa essere efficacemente sostituita da alcuni dei composti più comuni, presenti in misura quantitativamente notevole nelle cellule della foglia proprio in virtù della loro capacità fotosintetica, e cioè gli zuccheri: quali il saccarosio, il glucosio e il fruttosio. In foglie recise di patata questi glucidi risultano infatti attivissimi nell'inibire la rapida caduta, già ben visibile entro le 24 ore di incubazione al buio, sia della clorofilla, che di un enzima a localizzazione presumibilmente cloroplastidiale, la fosforilasi [7, 9]. In altri materiali (*Nicotiana rustica*) gli effetti della cinetina e del saccarosio nella produzione della clorofilla, dell'RNA e delle proteine risultano potenziarsi [11].

Numerosi dati suggeriscono che nella cellula vegetale i vari glucidi esplicano azioni regolatrici ben definite su diversi aspetti del metabolismo, quali gli effetti del glucosio e del fruttosio nella induzione della sintesi della fruttochinasi e dell'esochinasi [8], quello degli zuccheri in genere nella repressione dell'isocitritasi (dati non pubblicati) e quello dell'inibizione pressoché totale del catabolismo lipidico in seguito a somministrazione di glucidi a semi a riserve grasse in via di germinazione [1].

Queste considerazioni ci hanno indotto a una serie di ricerche sul meccanismo dell'azione protettiva dei glucidi nei riguardi di diversi aspetti del cosiddetto « invecchiamento » che si osserva nelle foglie recise e incubate al buio.

MATERIALI E METODI.

Sono state utilizzate le foglie più giovani, tra quelle aventi raggiunto le dimensioni definitive, di piante di *Solanum tuberosum* var. Tonda di Berlino coltivate all'aperto. I tuberi (esenti da virus) erano stati forniti dal « Centro miglioramento sementi della Federconsorzi di Brunico ». Dalle foglie lavate venivano prelevati dischi di circa 16 mm di diametro, che, dopo essere stati portati in acqua, venivano distribuiti in lotti di 15-20 in capsule Petri di 12 cm di diametro, contenenti sul fondo due strati di carta da filtro imbibiti con acqua con le appropriate soluzioni. Le capsule venivano mantenute alla luce (circa 4000 lux) o all'oscurità, e a 27°C.

Al termine dell'esperienza la clorofilla è stata determinata sull'estratto acetoneo del tessuto. La reazione di Hill sui cloroplasti isolati è stata eseguita sec. Vishniac [13]. Su un estratto di alcool 80% sono stati dosati gli zuccheri sec. Marrè e gli amminoacidi sec. Moore e Stein; sul residuo dell'estratto alcoolico le proteine sono state determinate sec. Lowry. Gli enzimi solubili sono stati dosati secondo le tecniche descritte da Cornaggia [5], e quelli mitocondriali come già descritto in [2].

ESPERIENZE E RISULTATI.

a) *Rapidità dell'invecchiamento (come caduta della clorofilla) in specie diverse.*

Una prima serie di esperienze ha avuto per scopo di individuare i materiali più adatti per questo tipo di ricerche, prendendo come test della rapidità del fenomeno dell'invecchiamento, la decadenza della clorofilla nei dischi fogliari incubati al buio, in acqua come descritto nei metodi. Elenchiamo qui in ordine di rapidità di decadimento della clorofilla (espresso tra parentesi come caduta % della clorofilla in 48 ore a 27° C) le varie specie prese in considerazione: *Ailanthus glandulosa* (0,4%); *Acanthus mollis* (2,6%); *Aralia Sieboldi* (5,3%); *Strelitzia reginae* (6,3%); *Dalia single* (9%); *Rosa gallica* (10%); *Choleus ruber* (12%); *Canna Warseviczi* (14%); *Populus canadensis* (18%); *Datura Metel* (19%); *Saxifraga rotundifolia* (19%); *Tradescantia crassifolia* (21%); *Calycanthus floridus* (21%); *Ipomea coccinea* (26%); *Solanum parviflorum* (28%); *Solanum lycopersicum* (37%); *Iris florentina* (53%); *Tetrargonia expansa* (53%); *Avena sativa* (53%); *Tropeolum* (58%); *Solanum tuberosum* (79%).

Due specie appaiono quindi particolarmente adatte per il nostro studio: la patata e l'avena. Le successive esperienze riferite in questo lavoro si sono svolte tutte su dischi ottenuti da foglie di patata.

b) *Effetto protettivo degli zuccheri e della luce sulla caduta della clorofilla, sulla proteolisi, sulla respirazione e sulla fotosintesi.*

Tutta una serie di determinazioni, che verranno più dettagliatamente riferite in altra sede, dimostra che in patata, come in avena e in altre specie, la caduta della clorofilla durante l'incubazione al buio, in acqua, si accompagna a una caduta delle proteine sia solubili che insolubili, a un netto aumento del tenore in amminoacidi liberi e ad un vero e proprio crollo dell'attività fotosintetica; mentre molto più ridotti sono gli effetti sul consumo di ossigeno. La presenza di saccarosio (2%), di glucosio o di fruttosio (1%) impedisce o ritarda molto significativamente tutti questi effetti.

Una protezione dello stesso ordine per tutti i fenomeni sopra menzionati si ottiene, in assenza di zuccheri, quando le capsule contenenti i dischi fogliari vengono esposte durante l'incubazione a luce bianca di intensità di circa 4000 lux. Il fatto che la protezione da luce sia fortemente diminuita dalla presenza di DCMU, cioè di un veleno specifico della fissazione fotosintetica di CO₂, suggerisce che almeno gran parte dell'effetto della luce dipenda dal fatto che essa determina, con la fotosintesi, un accumulo di fotosintati, prevalentemente glucidi.

c) *Azione protettiva degli zuccheri su enzimi mitocondriali e citoplasmatici.*

I dati della Tabella I illustrano gli effetti dell'incubazione al buio, oltre che sulla clorofilla, proteine e amminoacidi, anche sull'attività di due enzimi

mitocondriali e di due enzimi della frazione solubile. Dalla Tabella risulta la netta azione protettiva del glucosio, azione protettiva che da altre esperienze appare comune anche al saccarosio, al fruttosio e alla luce. Esperienze preliminari dimostrano pure che in preparati mitocondriali ottenuti da dischi incubati al buio, in acqua, per 40 ore, la capacità di fosforilazione ossidativa cade praticamente a zero, mentre valori pressochè normali si riscontrano per i mitocondri preparati al tempo zero e dopo incubazione in saccarosio al 2 %.

TABELLA I.

Effetto protettivo del glucosio sulla caduta della clorofilla, sulla proteolisi, su enzimi mitocondriali e citoplasmatici in dischi di foglie di patata incubati al buio a 27°C. Tutti i valori sono espressi per gr. di peso fresco.

	Clorofilla (mg)	Proteine (mg)	Ammino acidi (μ moli)	Cit c ossidasi (μ moli cit ox/h)	Malato DH (μ moli DPNH/h)	Gl6PDH (μ moli TPNH/h)	DPNH ossidasi (μ moli DPNH/h)
t_0	0,9	36,9	19	42	52,5	(33)	(19)
H ₂ O	0,44	20,6	57,7	21,7	24,1	15,3	7,8
Glucosio 0,1 M .	0,77	38	38	32	36	28,7	15,7

TABELLA II.

Effetto protettivo del fruttosio e della luce sulla caduta della clorofilla e sulla reazione di Hill in dischetti di foglie di patata incubate a 27°C per 44 ore.

CONDIZIONI	Clorofilla mg/gr p. fr.	REAZIONE DI HILL	
		μ moli TPNH/h/gr p. fr.	μ moli TPNH/h/mg clorof.
Tempo 0	1,37	15,1	11
H ₂ O, buio	0,46	3,9	7,47
Fruttosio 0,2 M, buio ..	0,9	9,2	10,2
H ₂ O, luce	1,32	12,1	9,2

d) *Effetto sulla reazione di Hill.*

I dati della Tabella II dimostrano come la caduta del tenore in clorofilla si accompagni a quella della capacità di cloroplasti isolati di catalizzare la reazione di Hill, con TPN come accettore. È degno di nota come il feno-

meno sia ben evidente anche se espresso per unità di clorofilla; il danno dell'apparato fotosintetico risulta quindi maggiore di quanto espresso dalla demolizione della clorofilla. Si osserva pure come la presenza di uno zucchero (in questo caso il fruttosio, ma analogo effetto risulta anche per glucosio e saccarosio) e della luce proteggano efficacemente non solo la clorofilla, ma anche la capacità di reazione di Hill per unità di clorofilla.

TABELLA III.

Confronto tra l'azione protettiva di diversi glucidi e del glicerolo sulla caduta della clorofilla e sulla proteolisi in dischi di foglie di patata incubati al buio a 27° C.

	Zuccheri riduttori $\mu\text{moli/gr}$ p. fr.	Sac- carosio $\mu\text{moli/gr}$ p. fr.	Clorofilla mg/gr p. fr.	Proteine mg/gr p. fr.	Ammino- acidi $\mu\text{moli/gr}$ p. fr.
t_0	14,2	1,9	1,1	65,8	24,2
acqua	2,85	2,3	0,45 (-50)	36,4 (-45)	104 (+330)
Glucosio 10^{-1} M.....	35	—	1,03 (-5)	56 (-14)	61 (+150)
» $5 \cdot 10^{-2}$ M ...	20,3	2,7	1,01 (-7)	53 (-19)	76 (+210)
» $1,7 \cdot 10^{-2}$ M..	8,7	2,9	0,99 (-10)	56,2 (-14)	87,5 (+260)
» $5 \cdot 10^{-3}$ M ...	4,9	—	0,66 (-40)	42,2 (-36)	91 (+280)
Galattosio $5 \cdot 10^{-2}$ M ..	23,1	25,2	0,9 (-18)	43,8 (-33)	83,3 (+250)
» $1,7 \cdot 10^{-2}$ M.	10	6,1	0,75 (-32)	46,8 (-29)	99,5 (+310)
» $5 \cdot 10^{-3}$ M ..	1,73	2,9	0,66 (-40)	37,4 (-43)	103 (+330)
Saccarosio 10^{-1} M ...	123	—	1,03 (-5)	53 (-19)	57 (+135)
» $1,5 \cdot 10^{-2}$ M	12,9	—	0,96 (-13)	41 (-38)	75 (+210)
Glicerolo 1%	8	—	0,98 (-11)	54 (-18)	76 (+210)

(I numeri tra parentesi rappresentano le variazioni % rispetto ai valori al t_0).

e) *Confronto tra l'azione protettiva di diversi glucidi e altri substrati.*

Dai dati della Tabella III risulta che il glucosio protegge efficacemente la clorofilla e inibisce la proteolisi solo per concentrazioni nel mezzo relativamente elevate (superiori a 10^{-2} M). Il fatto che il galattosio, pur ben assor-

bito, risulti a tutti gli effetti relativamente meno efficace, a parità di concentrazioni, sembra escludere che l'azione protettiva sia dovuta in modo particolare a uno stimolo della sintesi o a una protezione dei galattolipidi caratteristici del cloroplasto. Un ottimo agente protettivo risulta il glicerolo. Questo metabolita è facilmente trasformato, nella pianta, in glucidi, e ciò risulta chiaro anche dalla Tabella.

Tra gli altri substrati di cui si è saggiata l'attività protettiva, l'alcool, l'acetato e l'idrossibutirrato sono risultati altamente tossici, o, alle concentrazioni più basse, del tutto inattivi.

CONCLUSIONI.

I risultati di queste esperienze dimostrano che gli zuccheri solubili, fattori naturali abbondanti nella foglia in quanto prodotti della fotosintesi, risultano particolarmente efficaci nel ritardare i processi degradativi a carico di sistemi enzimatici del cloroplasto, del mitocondrio e del citoplasma. Sembra naturale dedurre che nella foglia integra gli zuccheri rappresentino un importante fattore di mantenimento, e anche di regolazione, dei vari aspetti della funzionalità di quest'organo.

Il problema se l'azione protettiva sia riconducibile semplicemente all'ovvio significato energetico e anabolico dei prodotti del metabolismo glucidico oppure anche - e forse soprattutto - ad effetti di regolazione espliciti dagli zuccheri, o da loro derivati, su meccanismi che controllano il bilancio tra sintesi e degradazione dei vari sistemi cellulari rimane aperto. Molti dati, tra cui quello dell'alto livello endocellulare di glucidi richiesto per l'effetto protettivo, nonché altri indiretti, quali quelli citati nell'introduzione, suggeriscono come più probabile piuttosto la seconda ipotesi che la prima.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] ALBERGHINA F. e MARRÉ E., « Acc. Naz. Lincei », 38, 237 (1965).
- [2] ALBERGONI F. et al., « Giorn. Bot. It. », 71, 469 (1964).
- [3] ANDERSON J. W. e ROWAN K. S., « Biochem. J. » 98, 401 (1966).
- [4] BAGI G. e FARKAS G. L., in corso di stampa.
- [5] CORNAGGIA M. P., « Giorn. Bot. It. », 71, 503 (1964).
- [6] MARRÉ E., « Nuovo giorn. Bot. It. », 60, 914 (1963).
- [7] MARRÉ E., « Atti Acc. Ligure Scienze e Lettere », 6, 1 (1949).
- [8] MARRÉ E. et al., « Biochem. J. », 97, 20 (1965).
- [9] MARRÉ E. e FELICI L., « Rendic. Acc. Naz. Lincei », 9, 188 (1950).
- [10] OSBORNE D., « Plant. Physiol. », 37, 595 (1962).
- [11] SUJURA M. et al., « Physiol. Plant. », 15, 457 (1962).
- [12] UDVARDY J. et al., in corso di stampa.
- [13] VISHNIAC W., *Methods in Enzymology*, vol. IV, p. 352.