
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PIERA LADO, MARIA SCHWENDIMANN

Effetto di varie condizioni di disponibilità idrica sulla evoluzione del sistema mitocondriale in endospermi di semi di ricino in maturazione

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.6, p.
1103–1108.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_6_1103_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_6_1103_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. — *Effetto di varie condizioni di disponibilità idrica sulla evoluzione del sistema mitocondriale in endospermi di semi di ricino in maturazione* (*). Nota di PIERA LADO e MARIA SCHWENDIMANN, presentata (**) dal Socio S. TONZIG.

SUMMARY. — Castor bean seeds, removed from the developing fruit at the very beginning of the seed dehydration phase, easily germinate when decoated and put on water soaked filter paper at 27° C. The present experiments deal with the changes in RNA and in the activity of cytochrome oxidase, malate dehydrogenase and succinate-cytochrome *c*-reductase in the mitochondrial fraction from ripening seeds, removed at this stage, maintained 48 hours under various hydration conditions, and finally allowed to germinate under conditions of unlimited water availability.

During the first 24 hours from the removal of the seed from the fruit, a significant drop of the enzyme activities as well as of the nitrogen and of the RNA contents in the mitochondrial fraction was observed, under any condition of hydration (unlimited water availability, hydric equilibrium in a moist environment, or mild or strong dehydration). In the following 24 h period enzyme activities and RNA start to increase, in the presence of unlimited water, while they go on decreasing under the conditions of hydric equilibrium and of dehydration. When, after 48 h of the above treatments, all seeds were put in the presence of unlimited water, the rise of enzyme activities and of RNA continued in the seeds previously maintained in unlimited water, and progressively appeared in the seeds pretreated under the two other conditions. The Q_{O_2} of the intact seeds closely paralleled the behaviour of the mitochondrial enzyme activities. These findings suggest that a water insensitive phase of degradation of the mitochondrial system might be required to allow the transition of the mitochondrial system of the maturing seed to a situation in which water availability is the limiting factor for the further evolution, characteristic of germination.

INTRODUZIONE.

L'ultima fase della maturazione del seme di ricino è caratterizzata da una progressiva disidratazione del seme ancora soggetto a trasformazioni metaboliche, pur restando ormai costante il suo peso secco [2]. Ricerche precedenti avevano dimostrato in questa fase una brusca caduta della respirazione [1] e una diminuzione dell'azoto proteico e delle attività enzimatiche mitocondriali [5]: dato quest'ultimo interpretato come espressione di un processo, in parte di demolizione, in parte di inattivazione, dei mitocondri, associato alla disidratazione del seme.

D'altronde nella prima fase della germinazione, caratterizzata da una intensa assunzione di acqua, era stato dimostrato un incremento delle attività

(*) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Fisiologia vegetale dell'Istituto di Scienze Botaniche 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.

enzimatiche mitocondriali attribuito a fenomeni sia di attivazione che di sintesi [3].

Nel presente lavoro si è studiato lo sviluppo della respirazione e il parallelo comportamento del sistema mitocondriale quando il seme maturante, pressoché al termine della fase di aumento del suo peso secco, veniva rimosso dal frutto e posto in condizioni sperimentali di diversa disponibilità idrica.

MATERIALI E METODI.

1) Le esperienze sono state eseguite su semi di *Ricinus communis* (var. *sanguineus*, geneticamente omogenei e forniti in dono dalla Stazione sperimentale delle piante medicinali di Napoli), prelevati dal frutto a uno stadio di maturazione in cui l'endosperma ha raggiunto il massimo sviluppo e il tegumento esterno presenta una pellicola superficiale rosa, ancora molto idratata.

I semi, privati dei tegumenti, sono stati posti in diverse condizioni di disponibilità idrica: *a*) in piastra su carta da filtro imbibita con acqua distillata; *b*) in ambiente mantenuto in umidità vicina al 100%, tale da mantenere i semi in condizioni di equilibrio idrico, cioè senza variazioni del peso fresco; *c*) in essiccatore in presenza di NaCl 4M; *d*) in essiccatore in presenza di CaCl₂ secco.

Dopo un periodo di 48 ore in queste diverse condizioni i semi sono stati trasferiti in piastre su carta da filtro imbibita d'acqua. Tutti i trattamenti venivano eseguiti al buio e a 27°C. A diversi intervalli di tempo i semi sono stati prelevati per la misura del consumo di O₂ e per la preparazione dei mitocondri.

2) L'estrazione dei mitocondri e il dosaggio delle attività enzimatiche mitocondriali (citocromossidasi, malato deidrogenasi, succinato-cit *c*-reduttasi) e dell'azoto proteico mitocondriale sono stati eseguiti come già descritto [3]. L'acido ribonucleico della frazione mitocondriale è stato dosato secondo Cherry [4].

RISULTATI E CONCLUSIONI.

1) *Germinabilità dei semi immaturi.*

Quando vengono prelevati dal frutto allo stadio di massimo peso fresco, quasi tutti i semi, posti in disponibilità idrica illimitata, germinano, ma dopo intervalli di tempo variabili da 2 a oltre 8 giorni. Se invece i semi, prelevati al medesimo stadio, sono mantenuti in condizioni di equilibrio o di deficit idrico per circa 48 ore, essi, quando riportati in condizioni di disponibilità idrica illimitata, germinano tutti e dopo circa 2 giorni, pressoché simultaneamente.

Questa osservazione suggerisce che, durante l'ultima fase della maturazione, un processo fisiologico, presumibilmente accelerato dalla disidrata-

zione, costituisca il presupposto della capacità di germinazione. Nelle successive esperienze si è cercato di indagare come questa apparente variazione metabolica si riveli nel comportamento dell'apparato mitocondriale del seme.

2) *Variazione della respirazione, delle attività enzimatiche, e del tenore in proteine e RNA della frazione mitocondriale di endospermi di semi maturanti di ricino tenuti in diverse condizioni di disponibilità idrica per 24 e 48 ore* (Tabella I).

a) *Nelle prime 24 ore* il peso fresco dei semi posti in acqua aumenta, mentre rimane stazionario per i semi posti in umidità all'equilibrio, e diminuisce per quelli posti in condizioni disidratanti.

TABELLA I.

Variazioni % di peso fresco e del consumo di O₂ in semi di ricino maturanti, portati in condizioni di diversa disponibilità idrica; variazioni % della citocromossidasi, delle proteine e dell'RNA della frazione mitocondriale isolata dagli endospermi.

Condizioni di disponibilità idrica	0-24 ore					24-48 ore				
	Peso fr.	Q _{O₂}	cit c ossidasi	Proteine	RNA	Peso fr.	Q _{O₂}	cit c ossidasi	Proteine	RNA
	seme intero		frazione mitocondriale			seme intero		frazione mitocondriale		
Semi in acqua.....	+15	-38	-45	-56	-49	+16	+53	-10	+30	-13
Semi in equilibrio idrico	+ 2	-37	-35	-43	-38	invar.	- 8	-40	+10	-30
Semi in condizioni disidr. (NaCl 4 M)	-12	-44	-42	-40	-33	-12	-26	-38	-27	-30
Semi in condizioni disidr. (CaCl ₂)...	-22	-85	-85	-74	-80	invar.	—	—	—	—

(*) Le percentuali sono calcolate riferendo le variazioni, osservate nell'intervallo di tempo considerato, ai valori corrispondenti: misurati nel seme appena rimosso dal frutto. I valori osservati nel seme immaturo sono: peso fresco: 480 mg/seme; Q_{O₂}: 170 µl/h/seme; citocromossidasi: 24,6 µmoli cit c ossidato/h/seme; proteine 2,3 mg/seme; RNA: 14 µg/seme.

Le variazioni delle attività malato deidrogenasica e succinato-cit c-reduttasica sono molto simili a quelle della citocromossidasi; la risalita della malato deidrogenasi presenta un leggero anticipo sugli altri due enzimi.

Nella condizione di equilibrio idrico, come pure in quella di disponibilità idrica illimitata, si osserva una forte diminuzione del Q_{O₂}, associata a una caduta dello stesso ordine, sia delle attività enzimatiche (citocromossidasi, malato deidrogenasi, succinato-cit c-reduttasi), che delle proteine e

dell'RNA dosati nella frazione mitocondriale. In condizioni di forte disidratazione (cloruro di calcio) la discesa dei valori considerati è molto più intensa.

Questi risultati confermano la conclusione di un disfaccimento delle strutture mitocondriali durante l'ultima fase della maturazione [5]. La condizione di deficit idrico accelera il processo, ma non sembra possibile stabilire una relazione diretta tra la disidratazione e la distruzione delle particelle, in quanto nei semi con disponibilità d'acqua illimitata il fenomeno non risulta per nulla inibito, malgrado l'attiva assunzione di acqua in questa condizione. Ciò suggerisce che al momento del prelievo il seme sia orientato verso un metabolismo demolitivo delle strutture non immediatamente reversibile per semplice idratazione. Tale processo di distruzione dei mitocondri potrebbe aver avuto origine da una particolare situazione instauratasi precedentemente nel seme, per esempio per il mancato afflusso di acqua e soluti dovuto all'interruzione dei contatti con la pianta, ma potrebbe anche essere un semplice effetto del brusco cambiamento di condizioni in seguito alla rimozione del seme dalla pianta stessa.

Quest'ultima ipotesi non sembra tuttavia molto probabile in quanto si è visto che i semi, portati in condizioni totalmente differenti di disponibilità idrica, presentano tutti un'identica involuzione del sistema mitocondriale. Oltre a ciò altri dati sembrano escludere che il fenomeno osservato sia attribuibile alle condizioni indotte sperimentalmente: infatti si è dimostrato che qualora dei semi fisiologicamente maturi, posti a germinare in acqua per 40 ore, siano portati nelle condizioni già descritte di diversa disponibilità idrica, l'improvviso mutamento dell'ambiente di crescita del seme non provoca, almeno nelle prime 24 ore, una caduta delle attività enzimatiche mitocondriali, le quali continuano nel processo di attivazione iniziato in seguito all'assunzione di acqua.

b) *Nelle 24 ore successive*, mentre le variazioni di peso fresco ripetono in modo identico il comportamento delle prime 24 ore nei tre stati di diversa idratazione, lo sviluppo della respirazione e dei mitocondri si differenzia invece in modo significativo nelle tre condizioni considerate.

In ambiente disidratante blando (NaCl) sia il Q_{O_2} che le attività enzimatiche, l'RNA e le proteine della frazione mitocondriale continuano a diminuire, in modo che i valori delle diminuzioni totali tra zero e 48 ore sono vicini a quelli raggiunti in 24 ore con disidratazione più violenta ($CaCl_2$).

In condizioni di equilibrio idrico, mentre le attività enzimatiche e l'RNA diminuiscono ancora, la discesa delle proteine e del Q_{O_2} non prosegue ulteriormente. Infine quando l'acqua è disponibile in eccesso le attività enzimatiche e l'RNA restano ai livelli precedenti; il Q_{O_2} e le proteine invece iniziano già una risalita.

Questo comportamento sembra indicare che accanto al processo demolitivo precedentemente evidenziato in qualunque stato di idratazione, nei semi in cui l'acqua non è stata allontanata, si delinea già una fisionomia nuova nel metabolismo dei mitocondri molto simile a quella della fase germinativa. Tale considerazione trova piena conferma nel comportamento dei semi riportati in acqua, descritto più avanti.

3) *Variazioni nella respirazione e nella frazione mitocondriale di endospermi di semi maturanti di ricino posti in acqua, dopo un periodo di 48 ore in condizioni di disponibilità idrica controllata.*

Nella Tabella II sono riportati gli aumenti di peso fresco, Q_{O_2} , attività enzimatiche, proteine e RNA della frazione mitocondriale, quando i semi, dopo i trattamenti di disponibilità idrica ridotta, vengono posti in piastra con acqua in eccesso per 39 ore.

TABELLA II.

Semi di ricino maturanti, portati in H_2O illimitata per 39 ore, dopo un trattamento di 48 ore in condizioni di diversa disponibilità idrica: variazioni % di peso fresco e del Q_{O_2} dei semi interi, e variazioni % della citocromossidasi, delle proteine, dell'RNA della frazione mitocondriale degli endospermi.

Trattamenti precedenti di 48 ore	0-15 ore in acqua					15-24 ore in acqua				
	Peso fr.	Q_{O_2}	cit c ossi-dasi	Pro-teine	RNA	Peso fr.	Q_{O_2}	cit c ossi-dasi	Pro-teine	RNA
	seme intero		frazione mitocondriale			seme intero		frazione mitocondriale		
Semi in acqua.....	+66	+460	+120	+48	+600	—	—	—	—	—
Semi in equilibrio idrico	+16	+ 23	+ 28	+24	+ 3	+40	+ 82	+37	+ 9	+190
Semi in condizioni disidr. (NaCl 4 M)	+26	+ 52	+ 57	+35	0	+46	+120	+40	+43	+210
Semi in condizioni disidr. (CaCl ₂)...	+41	+ 46	+ 57	+26	+ 23	+37	+153	+39	+26	+167

(*) Vedi didascalia Tabella I.

a) *Nelle prime 15 ore*, l'andamento dei valori è diverso in relazione al trattamento precedente: i semi che sono sempre stati in acqua presentano un fortissimo incremento sia del Q_{O_2} (+ 460%) che dell'RNA della frazione mitocondriale (+ 600%), associato a un aumento più moderato degli altri valori (enzimi e proteine); tale imponente variazione si accompagna alla comparsa della radichetta. Se i semi non germinano, tutti i valori considerati mantengono pressochè costanti i livelli raggiunti nelle prime 48 ore.

Nei semi precedentemente tenuti in condizioni di equilibrio idrico o in condizioni disidratanti si nota pure un aumento del Q_{O_2} , e del tenore in proteine e in attività enzimatiche mitocondriali, aumento più significativo

per i semi che hanno subito un'azione disidratante; mentre il contenuto in RNA resta praticamente invariato.

b) *Nelle 24 ore successive* i semi tenuti in acqua fin dall'inizio dell'esperienza, presentano ormai tutti i caratteri di un metabolismo di attiva crescita.

Nei semi tenuti in condizioni di disponibilità idrica ridotta compare un forte aumento dell'RNA (200% circa) e del Q_{O_2} (150% circa), più modesto delle attività enzimatiche e delle proteine; tutti i valori restano però inferiori a quelli raggiunti dai semi posti in acqua sin dall'inizio.

L'incremento del Q_{O_2} , degli enzimi e delle proteine, di diversa intensità nelle tre condizioni sperimentate (equilibrio idrico, NaCl 4M, CaCl₂) è più elevato nei semi sottoposti a disidratazione.

È evidente dai dati descritti che in tutti i semi, in qualunque condizione idrica siano stati tenuti, si è instaurata una nuova situazione interna per cui i mitocondri del seme sono ora in grado di attivarsi e di moltiplicarsi. I risultati ottenuti indicano che la preparazione di questo nuovo orientamento metabolico dei mitocondri richiede, nel seme rimosso dal frutto, un certo intervallo di tempo (più o meno lungo a seconda del grado di maturazione e delle condizioni idriche) durante il quale l'apparato mitocondriale subisce un processo demolitivo tale da portare ad una situazione interna assai vicina a quella del seme secco, per i semi posti in condizioni disidratanti, e meno facilmente definibile, ma pur sempre di entità notevole, per quelli in acqua fin dall'inizio. In questi ultimi, infatti, la presenza dell'acqua induce una precoce risalita del Q_{O_2} e delle attività enzimatiche non appena si sono realizzate le condizioni metaboliche necessarie alla fase germinativa, e non è possibile riconoscere se il nuovo orientamento ponga termine alla fase di demolizione o si sovrapponga ad essa.

In altre parole i risultati ottenuti non permettono di stabilire fino a che punto il processo distruttivo dei mitocondri sia necessario per l'avvio di quello biosintetico. Sembra peraltro probabile che un certo grado di demolizione di strutture preesistenti sia un prerequisito per la transizione del seme ad una fisionomia metabolica nuova: fisionomia che, una volta delineata, richiede per svilupparsi nei fenomeni di crescita e differenziazione, caratteristici della germinazione, semplicemente la disponibilità d'acqua nel mezzo.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] ALBERGHINA F., «Giorn. Bot. It.», 71, 392-398 (1964).
- [2] ALBERGHINA F. et al., «Giorn. Bot. Ital.», 71, 445-458 (1964).
- [3] ALBERGONI F. et al., «Giorn. Bot. Ital.», 71, 469-488 (1964).
- [4] CHERRY J. H., «Plant. Physiol.», 37, 670-678 (1962).
- [5] LADO P., «Giorn. Bot. Ital.», 72, 359-369 (1965).