
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

NEVIO FIUSSELLO, MARIO BELLANDO

**I precursori non fosforilati degli acidi nucleici
presenti allo stato libero negli embrioni quiescenti di
*Phaseolus vulgaris***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.6, p. 850–855.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_6_850_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. — *I precursori non fosforilati degli acidi nucleici presenti allo stato libero negli embrioni quiescenti di Phaseolus vulgaris* (*). Nota di NEVIO FIUSSELLO e MARIO BELLANDO, presentata (**) dal Socio C. CAPPELLETTI.

SUMMARY. — Purine and pyrimidine bases and related nucleosides in seeds and seedlings of *Phaseolus vulgaris*.

The common purine and pyrimidine bases and related nucleosides occurring in 1200 quiescent embryos of *Phaseolus vulgaris* have been isolated and identified using a ion-exchange column (Dowex 2X) with ammonium formate solutions, paper chromatography and absorption spectra at various pH.

The results have been compared with those obtained in previous studies [1] [2] [3].

All the naturally occurring bases in the nucleic acids except Thymine were found in seedlings.

No evidence for the presence of Thymine and Cytosine in quiescent cotyledons and Thymine, Cytosine and Guanine in quiescent embryos has been obtained.

All the common ribonucleosides are present both in quiescent and in germinating seeds.

Deoxy-ribonucleosides were not found in quiescent seeds but they were always present in germinating ones.

INTRODUZIONE.

In questo lavoro, che conclude una serie di Note precedenti sulle nucleobasi ed i nucleosidi presenti allo stato libero sia nei cotiledoni di *Phaseolus vulgaris* allo stato di quiescenza e di avanzata germinazione che negli embrioni germinati [1] [2] [3], ci siamo occupati dell'isolamento e dell'identificazione degli stessi componenti negli embrioni quiescenti e dell'esame comparativo dei dati quali - e quantitativi fin qui raccolti allo scopo di elucidare, sia pure parzialmente, alcuni aspetti del metabolismo di questi precursori nel passaggio del seme dallo stato di quiescenza a quello di germinazione.

MATERIALE E METODO.

1200 embrioni quiescenti di *Phaseolus vulgaris* sono stati macinati finemente ed estratti ad esaurimento in Soxhlet con etere di petrolio, p. eb. 30-60°; il residuo, libero da lipidi, caroteni, ecc. (gr 5 circa) è stato mescolato con il doppio del suo peso di polvere di cellulosa previamente lavata a fondo con

(*) Lavoro seguito nell'Istituto Botanico di Torino. (Dir. prof. A. Ceruti).

(**) Nella seduta dell'8 giugno 1968.

alcool metilico al 50 % ed estratto con lo stesso solvente in colonna fino ad un valore trascurabile della densità ottica dell'eluato, misurata a 260 m μ ; l'estratto idrometanolico è stato tirato a secco sotto vuoto in evaporatore rotante a 30°C, ripreso con 10 ml. di acqua, alcalinizzato a pH 11 con ammoniaca conc. ed immesso in una colonna riempita di resina scambiatrice di ioni per il frazionamento: (Dowex 2 X, forma H—COO⁻, diametro di 2 cm, altezza utile 35 cm, velocità di efflusso 1 ml/min) i vari componenti sono stati eluiti con soluzioni di formiato ammonico a pH e molarità crescenti [4] [5] (vedi Tabella I).

L'operazione è stata eseguita a temperatura ambiente e seguita automaticamente con un densitometro Uvicord associato ad un registratore ($\lambda = 254$ m μ).

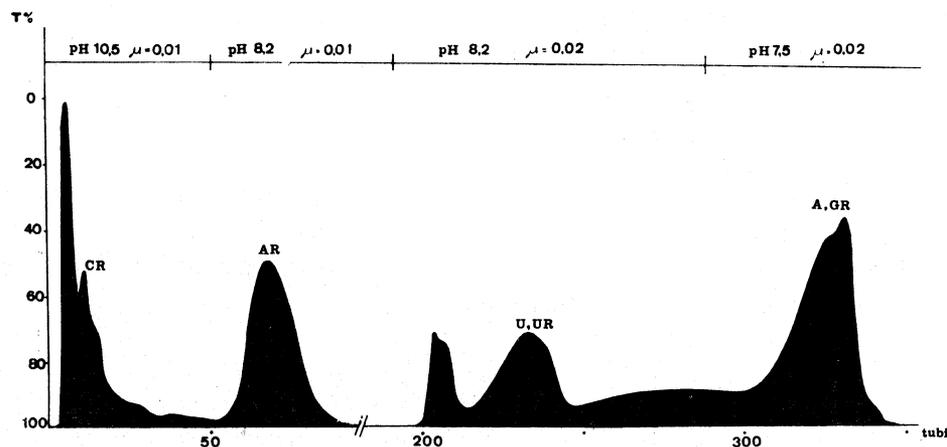


Fig. 1. - Diagramma di eluzione dell'estratto (1 tubo = 10 ml.).

Le diverse frazioni sono state tirate a secco in evaporatore rotante a 30°C ed il formiato ammonico presente sublimato a 0,2 Torr, temp. 37°C. I componenti interessanti la nostra ricerca sono stati isolati e purificati nell'ambito delle singole frazioni mediante cromatografia su carta con diversi sistemi eluenti e confrontandone il comportamento con sostanze pure [6].

Nell'eliminazione delle numerose ed abbondanti sostanze fluorescenti presenti come impurezze si è rivelata efficiente, nella maggior parte dei casi, la tecnica bidimensionale impiegante come primo eluente butonolo-acqua (86/14 v/v) ed acqua alcalinizzata con NH₃ a pH 10 nella seconda direzione.

Le sostanze isolate sono state riconfermate per via spettro-fotometrica operando a diversi valori di pH.

La Tabella I riporta le caratteristiche degli eluenti impiegati, le nucleobasi ed i nucleosidi eluiti nelle condizioni di esperienza.

TABELLA I.

pH	μ	Sostanze eluite	Frazioni raccolte
10,5	0,01	CyR	10-20
8,2	0,01	AR	50-90
8,2	0,02	U + UR	210-240
7,5	0,02	A + GuR	340-400

Come risulta dalla Tabella sono presenti come basi libere soltanto uracile e adenina, mentre sono stati messi in evidenza tutti i ribonucleosidi comuni. Particolarmente rimarchevole è l'assenza di desossi-ribonucleosidi.

ESAME DEI DATI RICAVATI IN QUESTO E NEI PRECEDENTI LAVORI.

Tutte le basi comuni che entrano nella composizione degli A.N. ad eccezione della timina, sono state trovate nei cotiledoni e negli embrioni allo stato germinante, mentre nei semi quiescenti non sono state rinvenute, almeno in quantità apprezzabile, la citosina e la timina sia negli embrioni che nei cotiledoni e la guanina negli embrioni.

TABELLA II.

Quadro riassuntivo della presenza dei principali precursori non fosforilati degli A.N. nei cotiledoni e negli embrioni di Phaseolus vulgaris quiescenti e germinanti. I dati relativi al materiale germinante si riferiscono a plantule eziolate di circa 25 cm di altezza.

Stadio vegetativo	Embrioni quiescenti	Embrioni germinanti	Cotiledoni quiescenti	Cotiledoni germinanti
Cy	—	+	—	+
CyR	+	+	+	+
CyDR	—	+	—	+
AR	+	+	+	+
ADR	—	+	—	+
Ty	—	—	—	—
TyDR	—	+	—	+
U	+	+	+	+
UR	+	+	+	+
A	+	+	+	+
Gu	—	+	+	+
GuR	+	+	+	+
GuDR	—	+	—	+
Ipox	—	+	+	+

Tutti i comuni ribonucleosidi sono stati rinvenuti sia negli embrioni che nei cotiledoni tanto nella fase di quiescenza che di germinazione.

I desossi-ribonucleosidi sono assenti nel seme quiescente e presenti nella fase di germinazione tanto nell'embrione che nel cotiledone; la quantità è però notevolmente inferiore a quella dei ribonucleosidi, si aggira infatti dal 2 % al 6 %.

TABELLA III a.

Variazioni percentuali (in moli) di ciascun componente nell'ambito dei vari gruppi secondo l'ordine di eluzione. I dati sono riferiti ad un «fagiolo medio».

	1° gruppo				2° gruppo		
	Cy	CyR	CyDR	Σ	AR	ADR	Σ
Embrioni quiescenti	—	1,7	—	1,7	1	—	1
Cotiledoni quiescenti	—	8,5	—	8,5	28,5	—	28,5
Embrioni germinanti	1,2	60	1,2	62,4	46,—	3,5	49,5
Cotiledoni germinanti	2,1	24,5	0,8	27,4	19,—	2,0	21
	3,3	94,7	2,0	100,0	94,5	5,5	100,0

TABELLA III b.

	3° gruppo				4° gruppo				
	U	UR	TyDR	Σ	A	Gu	GuR	GuDR	Σ
Embrioni quiescenti	0,1	0,7	—	0,8					2,4
Cotiledoni quiescenti	1,3	19,0	—	20,3					23,3
Embrioni germinanti	2,4	47,0	2,5	51,9					50,0
Cotiledoni germinanti	2,2	23,4	1,4	27,0					24,3
	6,0	90,1	3,9	100,0					100,0

Per lo studio delle variazioni quantitative relative che avvengono a carico dei componenti esaminati durante la germinazione ci siamo riferiti a gruppi di sostanze facenti capo alla stessa nucleobase ponendo uguale a

100 la somma delle moli di basi riscontrate in ciascuna delle frazioni esaminate nella fase di quiescenza e di germinazione.

Per comodità i derivati della timina sono stati inseriti nel gruppo dell'uracile. I dati relativi al gruppo della guanina, scarsamente ripetibili, non sono stati riportati e così quelli riferentisi all'adenina libera che viene raccolta nella stessa frazione.

Dall'esame delle Tabelle III appare evidente, anche concedendo il margine di incertezza proprio delle determinazioni quantitative in campo cromatografico, che le moli di qualsiasi base o nucleoside presente allo stato libero nella fase di germinazione (embr. + cotil.) sono notevolmente superiori a quelle presenti nel seme quiescente. Le maggiori differenze si notano a carico dell'embrione ove si hanno, per i rapporti germinante/quiescente, i seguenti valori:

$$\text{CyR}_{\text{germ.}}/\text{CyR}_{\text{q.}} = 35 \text{ circa}$$

$$\text{AR}_{\text{germ.}}/\text{AR}_{\text{q.}} = 46 \text{ circa}$$

$$\text{UR}_{\text{germ.}}/\text{UR}_{\text{q.}} = 67 \text{ circa.}$$

CONCLUSIONI.

Dalle considerazioni ora esposte ci pare possibile dedurre le conclusioni seguenti:

a) Non esiste, nei semi quiescenti, un « pool » di basi pirimidiniche libere da cui possano prendere origine, almeno nei primi stadi della germinazione, i nucleotidi secondo lo schema:



Anche l'uracile, riscontrato tanto nell'embrione che nel cotiledone quiescente è ivi presente, a nostro avviso, in quantità troppo scarsa per dare avvio all'iter metabolico accennato, mentre tale ipotesi non sarebbe da scartarsi a priori nel campo delle purine, per l'adenina, presente in quantità apprezzabile.

b) Sussiste invece la possibilità di un « pool » di ribonucleosidi nei semi quiescenti, da cui potrebbe iniziare la sintesi dei nucleotidi secondo lo schema:



però se questo « pool » esiste e può dare inizio alla sintesi dei primi nucleotidi è evidente che in seguito deve essere continuamente alimentato, durante la germinazione, dall'apporto di altri nucleosidi provenienti dalla demolizione di acidi nucleici esistenti nel cotiledone o dalla sintesi « de novo » partendo da zuccheri e aminoacidi e probabilmente da entrambe le fonti.

Questo spiegherebbe la maggior quantità di nucleosidi trovati nella fase di germinazione malgrado la utilizzazione continua per la sintesi di nucleotidi.

Naturalmente non è escluso che parte dei nucleosidi trovati possa derivare da reazioni di ritorno.

c) La presenza di basi libere durante la germinazione potrebbe essere ascritta o a processi catabolici o ad una sintesi « de novo » delle basi stesse.

d) L'assenza di desossi-ribonucleosidi nei semi allo stato di quiescenza esclude l'esistenza di un « pool » da cui possa iniziare la sintesi dei corrispondenti nucleotidi.

I limiti di impostazione ed il significato stesso dei dati qui raccolti non permettono evidentemente di stabilire attraverso quali vie esso possa formarsi durante la germinazione. (Riduzione di ribonucleosidi o ribonucleotidi [7], sintesi « de novo », demolizione di DNA, etc.).

BIBLIOGRAFIA.

- [1] M. BELLANDO, *I precursori non fosforilati degli A. N. nei cotiledoni di Phaseolus vulgaris allo stato quiescente*, « Acc. Naz. dei Lincei Rend. Sc. Fis. mat. nat. », Ser. VIII, vol. XXXIV, 5 (1963).
- [2] M. BELLANDO e N. FIUSSELLO, *I precursori non fosforilati degli A. N. negli embrioni germi- nanti di Phaseolus vulgaris*, « Acc. Naz. dei Lincei Rend. Sc. Fis. Mat. Nat. », Ser. VIII, vol. XL, 1 (1966).
- [3] M. BELLANDO e N. FIUSSELLO, *I precursori non fosforilati degli A. N. nei cotiledoni germi- nanti di Phaseolus vulgaris*, « Acc. Naz. dei Lincei Rend. Sc. Fis. Mat. Nat. », Ser. VIII, vol. XLI, 5 (1966).
- [4] W. E. COHN, « J. Am. Chem. Soc. », 72-1471 (1950).
- [5] E. CHARGAFF e J. N. DAVIDSON, *The nucleic acids*, - N. Y. (1955).
- [6] G. DUPONT e A. KIRRMAN e ALTRI, « Chromatogr. en Chim. org. et biol. », Paris 1960.
- [7] A. LARSSON e P. REICHARD, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, « Academic Press - N. Y. », 7, 303 (1967).