

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

MARIO PIATTELLI, MARINA GIUDICI DE NICOLA,  
VENERA CASTROGIOVANNI

## Azione del cloramfenicolo e della puromicina nella biosintesi dell'amarantina in *Amaranthus Tricolor*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.2, p. 255–260.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1970\\_8\\_48\\_2\\_255\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_2_255_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/>

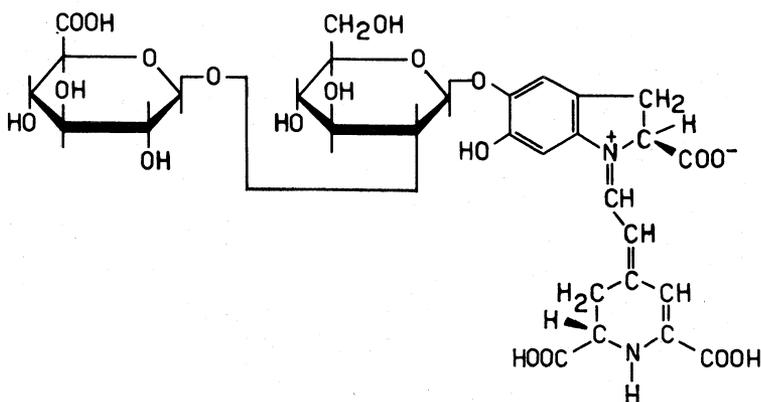


**Biochimica.** — *Azione del cloramfenicolo e della puromicina nella biosintesi dell'amarantina in Amaranthus Tricolor* (\*). Nota di MARIO PIATTELLI, MARINA GIUDICI DE NICOLA e VENERA CASTROGIOVANNI, presentata (\*\*\*) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — Light induced amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor* seedlings is inhibited by chloramphenicol. The inhibition is similar to that previously found using puromycin. The intensity of the inhibiting effect of both antibiotics depends on the seedling age.

#### I. — INTRODUZIONE.

È noto che la sintesi degli antociani nei tessuti vegetali è regolata dal sistema fitocromico. Secondo Mohr [1] l'attivazione del fitocromo ad opera di luce di opportuna lunghezza d'onda causa la conversione di geni potenzialmente attivi in geni attivi, con conseguente stimolazione della sintesi DNA dipendente dell'RNA messaggero. A sua volta l'RNA controlla la sintesi degli enzimi implicati nella produzione del pigmento.



(I)

Recentemente è stato dimostrato che anche la formazione della amarantina (I), il betaciano presente in *Amaranthus tricolor*, è controllata dal fitocromo [2]; i risultati di esperienze con un inibitore della RNA polimerasi (attinomicina) e un inibitore della sintesi proteica (puromicina) [3] sono in accordo con l'ipotesi di Mohr. Nella presente Nota si riferisce sui risultati ottenuti con l'impiego di un altro inibitore della sintesi proteica, il cloramfenicolo (CAF), che agisce legandosi preferenzialmente alle unità 50 S dei ribosomi 70 S [4].

I batteri, che contengono ribosomi di questo tipo, sono sensibili a dosi molte basse dell'antibiotico [5]. Nei vegetali superiori le sintesi proteiche

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica Organica dell'Università di Catania con contributo del C.N.R.

(\*\*) Nella seduta del 14 febbraio 1970.

nei plastidi, che contengono ribosomi di tipo 70 S, sono inibite anch'esse da basse dosi di cloramfenicolo, mentre quelle che hanno luogo nel citoplasma, che contiene ribosomi 80 S, sono influenzate solo da dosi maggiori [6].

Per quanto concerne la sintesi *in vivo* degli antociani, le ricerche di Margulies [7] su *Phaseolus vulgaris* mostrano che essa è scarsamente influenzata dal CAF; dalle esperienze di Wagner [8] su *Sinapis alba* si deduce invece che l'antibiotico ha azione inibente a dosi elevate e stimolante a dosi basse.

I risultati qui riportati dimostrano che nel caso della sintesi dell'amarantina in *A. tricolor* il CAF esercita sempre un'azione inibente, a tutte le concentrazioni sperimentate. È stato inoltre osservato che l'intensità dell'inibizione è dipendente, a parità di concentrazione del CAF, dalla età del germoglio. Tale fenomeno non è strettamente specifico per il CAF, poiché anche impiegando puromicina si osserva un'analoga variazione dell'intensità dell'inibizione in funzione dell'età dei germogli.

## 2. - DESCRIZIONE DEGLI ESPERIMENTI.

I semi di *Amaranthus tricolor* venivano posti a germogliare su carta da filtro imbibita con una quantità fissa di acqua di fonte (16 ml) in scatole di Petri ( $\varnothing$  18 cm) a 28° al buio.

Per i trattamenti con antibiotico, i germogli venivano trapiantati in scatole di Petri, ove all'acqua era sostituita la soluzione di antibiotico (CAF succinato, Carlo Erba o puromicina cloridrato, Calbiochem) preparata al momento dell'uso.

### *Analisi del pigmento.*

Cento fusticini venivano omogenizzati in 3 cc di H<sub>2</sub>O con Ultra Turrax e l'omogenato era centrifugato; il supernatante, portato a pH 4,5 con acido acetico e tenuto a 5° per 30' veniva successivamente centrifugato a 8000 r.p.m. per 20'. L'assorbanza del liquido limpido, portato a volume, veniva determinata a 537 nm. La quantità di amarantina era calcolata usando un  $\epsilon = 5,66 \times 10^4$ . Ogni analisi era eseguita contemporaneamente su quattro campioni. Ogni esperimento è stato ripetuto sei volte. Per ogni singola analisi erano condotti controlli con germogli al buio.

### *Illuminazione.*

Per l'irradiazione era usato un complesso di tubi fluorescenti che fornivano 5000 lux al livello dei germogli.

## 3. - RISULTATI E DISCUSSIONE.

È stato descritto che nei germogli di *S. alba* il CAF a conc.  $0,5 \times 10^{-4}$  M induce un'attivazione di circa il 25 % della sintesi degli antociani. Tale effetto è stato attribuito alla inibizione delle sintesi proteiche nei plastidi con conseguente accumulo di fenilalanina nei cotiledoni; poiché il CAF a basse concentrazioni non interferisce con le sintesi degli enzimi nel citoplasma, la forma-

zione degli antociani può procedere con aumentata velocità a causa della maggior disponibilità di un precursore dei flavanoidi [8].

Se tale interpretazione è corretta, l'azione stimolante del CAF a basse concentrazioni dev'essere limitata a quei composti che come i flavonoidi sono biogeneticamente correlati alla fenilalanina.

TABELLA I.  
*Azione del CAF a concentrazione  $0,5 \times 10^{-4}$  M  
sulla sintesi dell'amarantina.*

Trattamento	Amarantina/germoglio (moli $\times 10^{-9}$ )
Controllo al buio . . . . .	3,2
Controllo alla luce (24 ore luce) . .	41,8
24 ore luce + CAF $0,5 \times 10^{-4}$ M . .	32,7

L'antibiotico era applicato al momento dell'insemezzamento.

Poiché nel caso dei betaciani, la cui biogenesi non è ancora chiarita, appare evidente dai dati sperimentali disponibili che la diossifenilalanina (DOPA) e la tirosina (quest'ultima con minor efficienza) agiscono da precursori [9, 10] mentre la fenilalanina non sembra utilizzata [11], era prevedibile che il CAF non avesse alcun effetto stimolante sulla formazione dell'amarantina. In effetti, i risultati riportati in Tabella I dimostrano che

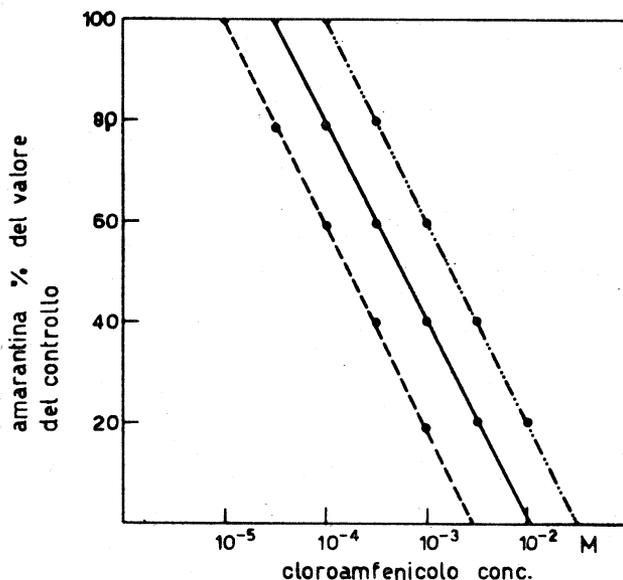


Fig. 1. - Variazione dell'effetto inibente del CAF in funzione della concentrazione. L'antibiotico a varie conc. veniva somministrato all'atto dell'insemezzamento (----), dopo 36 ore (—) o dopo 48 ore (-·-·-).

il CAF nella concentrazione alla quale stimola la sintesi degli antociani in *S. alba* e in analoghe condizioni di somministrazione, produce nei germogli di *A. tricolor* una lieve inibizione ( $\sim 20\%$ ). Esperienze effettuate variando la concentrazione del CAF, sempre mantenendo immutate le condizioni di somministrazione, dimostrano che in nessun caso si ottiene attivazione della sintesi dell'amarantina (fig. 1).

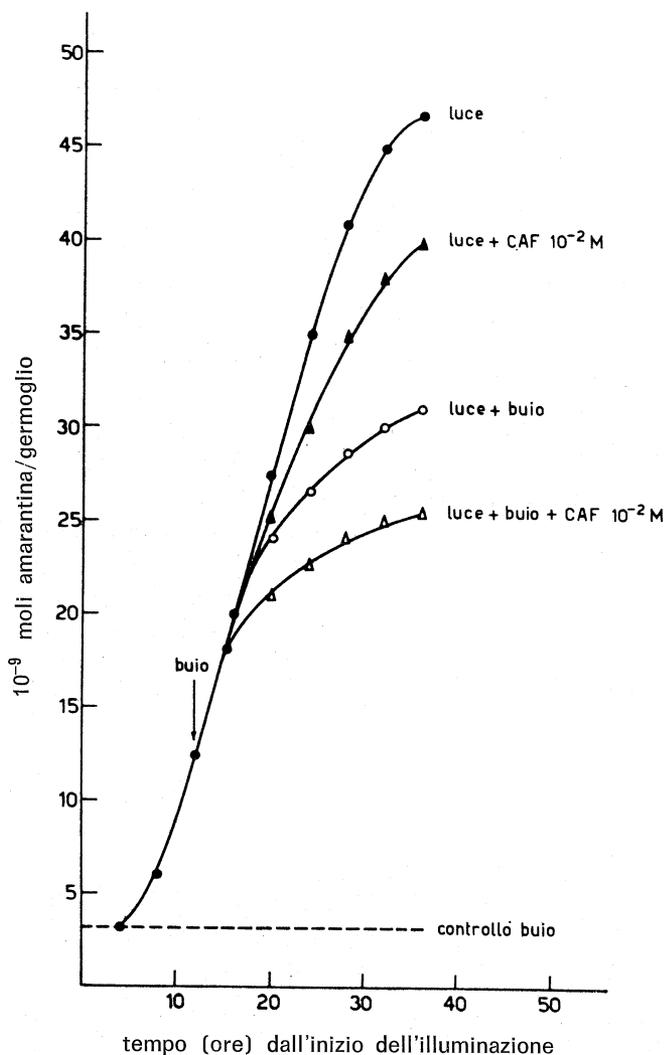


Fig. 2. - Azione del CAF sulla sintesi di amarantina in condizioni di irradiazione continua e di illuminazione (12 ore) seguita da buio.

Pur essendo le conc. di CAF necessarie a produrre una notevole inibizione piuttosto elevate, ma sempre contenute nei limiti in cui abitualmente lo si impiega come inibitore nei vegetali superiori [7, 12], possiamo ritenere che l'antibiotico non espliciti un effetto aspecifico ma agisca mediante un blocco delle sintesi di proteine specifiche per la biosintesi dell'amarantina. Tale

supposizione si basa sia sul fatto che i germogli non vengono apparentemente danneggiati nel loro sviluppo anche quando le dosi di antibiotico sono tali da inibire la sintesi del pigmento in misura dello 80 %, sia sull'osservazione che la velocità di accumulo della amarantina viene influenzata dal CAF (fig. 2) in modo non diverso da quello osservato con puromicina [3].

Ulteriori esperienze hanno messo in evidenza che l'effetto inibente del CAF è fortemente dipendente dalle condizioni di somministrazione. Se l'antibiotico è applicato al momento dell'inseminamento o dopo differenti intervalli di tempo (36 o 48 ore) dalla semina, si ottengono i risultati riportati in fig. 1, che dimostrano una progressiva diminuzione della sensibilità all'antibiotico con l'aumento dell'età dei germogli.

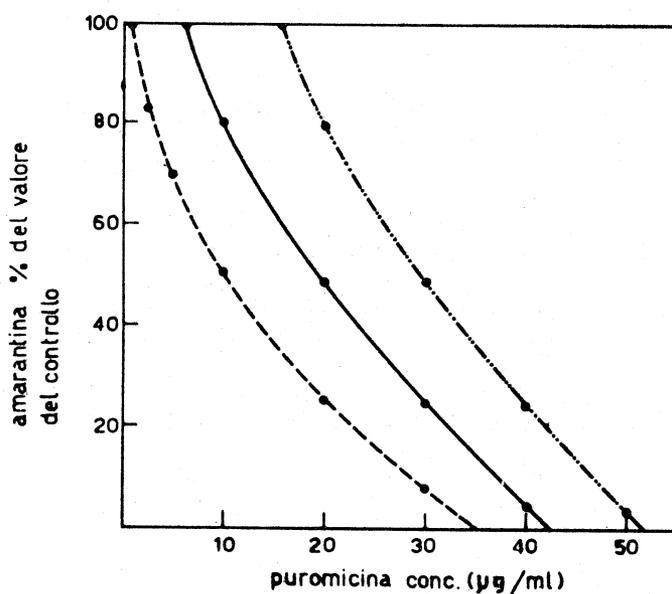


Fig. 3. - Variazione dell'effetto inibente della puromicina in funzione della concentrazione. L'antibiotico a varie conc. veniva somministrato all'atto dell'inseminamento (---), dopo 36 ore (—) o dopo 48 ore (-.-.-).

Allo scopo di accertare se il suddetto fenomeno fosse specifico del CAF abbiamo effettuato analoghe esperienze impiegando puromicina. Come risulta dalla fig. 3, i risultati ottenuti con questo antibiotico non differiscono sensibilmente, per quel che riguarda la variazione della sensibilità in funzione dell'età dei germogli, da quelli ottenuti con il CAF. Poiché i due antibiotici, sia pure in modo diverso, agiscono entrambi bloccando la sintesi proteica [4], a questa azione deve probabilmente riferirsi la variazione dell'effetto inibente al variare dell'età dei germogli. Allo stato attuale non è possibile stabilire quali siano le cause di tale fenomeno, che tuttavia non sembra potersi attribuire a una differente velocità di penetrazione degli antibiotici nei fusticini di diversa età, in quanto esperimenti condotti su germogli integri e su germogli privi della radichetta hanno dato eguali valori di inibizione.

Essendo noto che nelle prime fasi della germinazione i monoribosomi danno luogo alla formazione dei polisomi, dotati di elevate capacità di sintesi proteiche [13], si può supporre che i due antibiotici, somministrati all'atto dell'inseminamento, interferiscano a questo livello.

Ulteriori ricerche potranno chiarire la validità di questa ipotesi.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] H. MOHR, *Differential gene activation as a mode of action of phytochrome 730*, « Photochem. and Photobiol. », 5, 469-482 (1966).
- [2] M. PIATTELLI, M. GIUDICI DE NICOLA e V. CASTROGIOVANNI, *Photocontrol of Amaranthin synthesis in Amaranthus tricolor*, « Phytochem. », 8, 731-736 (1969).
- [3] M. PIATTELLI, M. GIUDICI DE NICOLA e V. CASTROGIOVANNI, *The inhibition by actinomycin D and puromycin of the light-stimulated amaranthin synthesis*, « Phytochem. » (in corso di stampa).
- [4] H. HARTMANN, W. BEHR, K. A. BEISSNER, K. HONIKEL e A. SIPPEL, *Antibiotics as Inhibitors of Nucleic Acid and Protein Synthesis*, « Angew. Chem. », 7, 693-701 (1968).
- [5] D. VASQUEZ, *Uptake and binding of chloramphenicol by sensitive and resistant organisms*, « Nature », 203, 257-258 (1964).
- [6] T. H. HAMILTON, R. J. MOORE, A. F. RUSMEY, A. R. MEANS e A. R. SCHRANK, *Stimulation of synthesis of ribonucleic acid in sub-apical sections of avena coleoptile by indolic-3-acetic acid*, « Nature », 208, 1180-1183 (1965).
- [7] M. M. MARGULIES, *Effects of Chloramphenicol on light Dependent Development of Seedlings of Phaseolus vulgaris var. Black Valentine, with Particular Reference to Development of Photosynthetic Activity*, « Plant Physiol. », 37, 473-480 (1962).
- [8] E. WAGNER, I. BIENGER e H. MOHR, *Die Steigerung der durch Phytochrom bewirkten Anthocyaninsynthese der Senfkeimlings (Sinapis alba L.) durch Chloramphenicol*, « Planta », 75, 1-9 (1967).
- [9] L. MINALE, M. PIATTELLI e R. NICOLAUS, *Pigments of Centrospermae-IV. On the biogenesis of indicaxanthin and betanin in Opuntia ficus-indica Mill*, « Phytochem. », 4, 593-597 (1965).
- [10] H. E. MILLER, H. RÖSLER, A. WOHLPART, H. WYLER, M. E. WILCOX, H. FROHOFER, T. J. MABRY e ANDRE S. DREIDING, *Biogenese der Betalaine Biotransformation von Dopa und Tyrosin in den Betalaminsäureteil des Betanins*, « Helv. Chim. Acta », 51, 1470-1474 (1968).
- [11] A. S. GARAY e G. H. N. TOWERS, *Biosynthesis of amaranthin*, « Canad. Jour. of Bot. », 44, 231-238 (1966).
- [12] L. D. NOODEN e K. V. THIMANN, *Inhibition of protein synthesis and auxin-induced growth by chloramphenicol*, « Plant. Physiol. », 40, 193-201 (1965).
- [13] JACHYMCZYK W. J. e J. H. CHERRY, *Studies on messenger RNA from peanut plants: in vitro polyribosome formation and protein synthesis*, « Biochim. Biophys. Acta », 157, 368-377 (1968).