
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIA TERESA MARRÈ, MAURIZIO COCUCCI, ANTONIO
BALLARIN-DENTI

**Azione dell'ortovanadato su crescita e trasporto di
ioni K^+ e H^+ in semi germinati di Ravanello
(*Raphanus sativus* L.)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 65 (1978), n.6, p. 367–372.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_6_367_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. — *Azione dell'ortovanadato su crescita e trasporto di ioni K^+ e H^+ in semi germinati di Ravanello (Raphanus sativus L.)* (*). Nota di MARIA TERESA MARRÈ, MAURIZIO COCUCCI e ANTONIO BALLARIN-DENTI, presentata (**) dal Socio S. TONZIG.

SUMMARY. — Orthovanadate at concentrations of 20 to 500 μ M markedly inhibits growth (as increase in fresh weight), net K^+ uptake and acidification of the medium for the incubation of germinating radish seeds. These data can be related to the previous finding that in membrane preparations from germinating radish seeds orthovanadate inhibits a non mitochondrial, K^+ , Mg^{++} -stimulated ATPase activity, tentatively identified with a plasmalemma ATPase involved in electrogenic proton extrusion.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è stata convincentemente dimostrata l'esistenza nei batteri [1, 2] e nei funghi [3] di ATPasi localizzate nel plasmalemma e funzionalmente adibite all'estrusione elettrogenica di protoni. Questi enzimi presentano diverse analogie sia di comportamento biochimico che di funzione con le ATPasi presenti nelle membrane interne dei mitocondri e dei cloroplasti. Tutti questi enzimi, infatti, hanno in comune la capacità di catalizzare l'interconversione di energie di potenziale di trasporto di fosfato con energia di potenziale elettrochimico di protoni utilizzabile per processi di trasporto attivo attraverso le membrane in cui essi sono localizzati.

Per quanto riguarda le piante superiori, la presenza nel plasmalemma di ATPasi con funzione di pompa protonica elettrogenica è tuttora aperta alla discussione [1], anche se dati recenti sembrano fortemente favorevoli ad una tale ipotesi. Tra questi dati possono essere citati, in quanto aderenti al tema di questa ricerca, quelli che dimostrano come tutti gli inibitori noti dell'ATPasi K^+ , Mg^{++} -dipendente del plasmalemma inibiscano pure, « in vivo », l'estrusione elettrogenica di protoni e l'assorbimento attivo, ad esso collegato, di K^+ [4, 5].

Purtroppo, un aspetto negativo di queste esperienze è che i migliori inibitori dell'ATPasi di plasmalemma (come il DCCD ed il DES) inibiscono pure in qualche misura attività enzimatiche mitocondriali.

(*) Laboratorio di Fisiologia Vegetale, Istituto di Scienze Botaniche, Università di Milano, Centro di Studio del CNR per la Biologia Cellulare e Molecolare delle Piante, Milano (Italy).

(**) Nella seduta del 16 dicembre 1978.

Abbreviazioni: DCCD, dicicloesilcarbodiimide; DES, dietilstilbestrolo; Pi, fosfato inorganico.

In una ricerca precedente abbiamo rilevato che l'ortovanadato inibisce anche nelle piante superiori (in particolare, nei semi germinanti di ravanello) l'attività ATPasica, K^+ , Mg^{++} -dipendente tentativamente localizzata nel plasmalemma, mentre non influenza l'attività dell'ATPasi mitocondriale [6, 7]. Ciò prospetta la possibilità di inibire l'utilizzazione di ATP a livello del plasmalemma indipendentemente da alterazioni della funzione mitocondriale e sembra aprire una nuova via di attacco al problema del meccanismo biochimico della pompa protonica nelle piante.

Nella presente ricerca abbiamo studiato l'azione « in vivo » dell'ortovanadato su alcuni parametri fisiologici che precedenti lavori indicavano come più o meno direttamente collegati al funzionamento della pompa protonica: a) la crescita per distensione, almeno in parte dipendente dall'efficienza del meccanismo di estrusione di protoni; b) l'assorbimento di K^+ , interpretabile come legato alla formazione, ad opera della pompa protonica, di un potenziale elettrico transmembrana negativo all'interno; c) la capacità del tessuto di acidificare il mezzo di incubazione, anche esso interpretabile (almeno nella maggior parte dei casi) come diretta conseguenza dell'estrusione dei protoni. Tutti questi parametri (come pure il comportamento della ATPasi di plasmalemma) erano stati presi in esame sul materiale qui usato, in precedenti ricerche eseguite in questo laboratorio [8, 9].

ESPERIENZE E RISULTATI

a) *Azione dell'ortovanadato sulla crescita.* - I dati della Tabella I mostrano l'azione inibente dell'ortovanadato, a concentrazione tra 20 e 500 μM , sull'aumento di peso fresco di semi germinanti di ravanello. L'effetto inibente è già significativo alla concentrazione più bassa, e raggiunge l'80 % a quella più alta.

La crescita in peso fresco dei semi germinanti nella prima fase (1-2 giorni) di germinazione è soprattutto dovuta a distensione, mentre il processo di crescita per divisione cellulare diventa importante solo nel periodo successivo. La forte inibizione da vanadato dell'aumento di peso fresco sembra quindi imputabile ad un effetto sulla distensione, fenomeno almeno in parte controllato dalla capacità di estrusione attiva di idrogenioni [5, 10].

b) *Azione dell'ortovanadato sull'assorbimento di K^+ .* - Risultati ottenuti in questo laboratorio dimostrano che nella germinazione del seme di ravanello (come di altre specie) una prima fase di fuoriuscita passiva di K^+ (ed altri cationi) è seguita da una fase di veloce riassorbimento del K^+ dal mezzo. Questa seconda fase nelle nostre condizioni sperimentali è ben visibile nel periodo tra la 12^a e 36^a ora di germinazione, e risulta imputabile all'aumento della capacità di trasporto attivo della membrana cellulare, conseguente a fenomeni sia di riattivazione che di sintesi « de novo » delle strutture cellulari in genere, e del plasmalemma in particolare [9].

I dati riferiti nella Tabella II mostrano che l'ortovanadato inibisce fortemente l'assunzione netta di K^+ da parte dei semi nel periodo tra la 15^a e

la 22^a ora di germinazione. Anche in questo caso, l'effetto inibente è già chiaro per la concentrazione di ortovanadato 20 μM e diventa imponente (con inversione del flusso netto da assorbimento ad efflusso) per le concentrazioni più elevate.

TABELLA I

Effetto del vanadato sull'incremento del peso fresco durante le prime 24 ore di germinazione di semi di ravanella.

Vanadato (μM)	% peso fresco iniziale	% inibizione da vanadio
0	41	—
20	31,5	24
60	28	32
180	21	49
500	8	81

I semi, detegumentati dopo 90 min. di imbibizione in acqua distillata a 0°C, erano posti a germinare in acqua con l'aggiunta di ortovanadato di sodio alle concentrazioni indicate in tabella. 80 semi, corrispondenti a ca. 1 grammo di tessuto erano fatti germinare in 10 ml di soluzione (H_2O) a 26°C in bagno termostatico agitato (80 colpi/min.). I pesi erano determinati dopo aver allontanato l'eccesso di acqua mediante blanda centrifugazione (500×g per 1 min.).

c) *Effetto dell'ortovanadato sulla capacità dei tessuti di acidificare il mezzo.* — Un rapporto tra attività di germinazione e capacità del seme di acidificare il mezzo, riconducibile ad estrusione attiva di protoni, era già stata messa in evidenza nel ravanella ed in altre specie in precedenti ricerche eseguite in questo laboratorio [8]. I dati della Tabella III mostrano che il vanadato inibisce significativamente la capacità di secrezione di acido di semi di ravanella, misurata tra la 18^a e la 21^a ora di germinazione. L'effetto inibente è già significativo alla concentrazione di vanadato più bassa, e diventa molto evidente per quelle più elevate.

Nell'interpretazione di questo risultato è da tener presente che la misura di variazioni di pH rappresenta spesso un indice solo qualitativo ed approssimato dell'estrusione di H^+ intesa in senso stretto, in quanto non tiene conto da un lato di eventuali variazioni nella fuoriuscita di sostanze dotate di potere tampone (fatto peraltro di solito poco rilevante), e, dall'altro, della possibilità che una frazione talora importante dei protoni estrusi rientri nelle cellule attraversando il plasmalemma per diffusione passiva o per fenomeni di cotrasporto od antiporto con alti soluti [1, 5]. L'effetto inibente del vanadato

sulla capacità dei semi germinanti di abbassare il pH del mezzo deve quindi interpretarsi semplicemente come un'indicazione qualitativa della capacità dell'inibitore di influenzare direttamente il processo di estrusione attiva, elettrogenica di idrogenioni.

TABELLA II

Effetto del vanadato sulla riassunzione del K^+ durante le prime fasi della germinazione.

Vanadato (μM)	K^+ riassorbito (*) ($\mu\text{eq} \times \text{gr. PF}^{-1}$ in 7 h)	% inibizione
0	10,0	—
20	5,31	— 46
60	3,23	— 67
180	— 4,5	— 145
500	— 7,0	— 170

(*) K^+ riassorbito tra la 15^a e la 22^a ora dall'inizio della germinazione.

I semi venivano posti a germinare come descritto in Tabella I. I livelli di K^+ erano determinati mediante spettrofotometro ad assorbimento atomico (Varian 1100).

TABELLA III

Effetto sulla capacità di semi germinanti (alla 18^a h di germinazione) di acidificare il mezzo di incubazione.

Vanadato (μM)	pH dopo 3 h	Δ pH
0	5,60	— 0,75
20	5,80	— 0,55
60	5,70	— 0,65
180	5,90	— 0,45
500	6,20	— 0,15

I semi venivano fatti germinare come descritto in Tabella I. Dopo 18 h di germinazione i semi erano trasferiti in un mezzo di incubazione come indicato in tabella e incubati per 3 h. Il pH iniziale era 6,35.

CONCLUSIONI

I risultati di questa ricerca possono riassumersi dicendo che in semi germinanti di ravanello il vanadato inibisce fortemente crescita per distensione, assorbimento netto di K^+ e capacità di acidificazione del mezzo; tre processi tutti largamente (anche se non totalmente) dipendenti dall'efficienza del meccanismo di estrusione attiva di protoni.

Questo risultato può esser posto in rapporto con i dati di un precedente lavoro che dimostra l'azione inibente del vanadato su una attività ATPasica K^+ , Mg^{++} -stimolabile, DCCD sensibile e oligomicina insensibile presumibilmente localizzata nel plasmalemma, e per la quale esistono indicazioni di una funzione quale componente attiva del meccanismo di estrusione di protoni. Gli effetti « in vivo » ed « in vitro » del vanadato sembrano infatti convenientemente spiegati dallo schema della fig. 1.

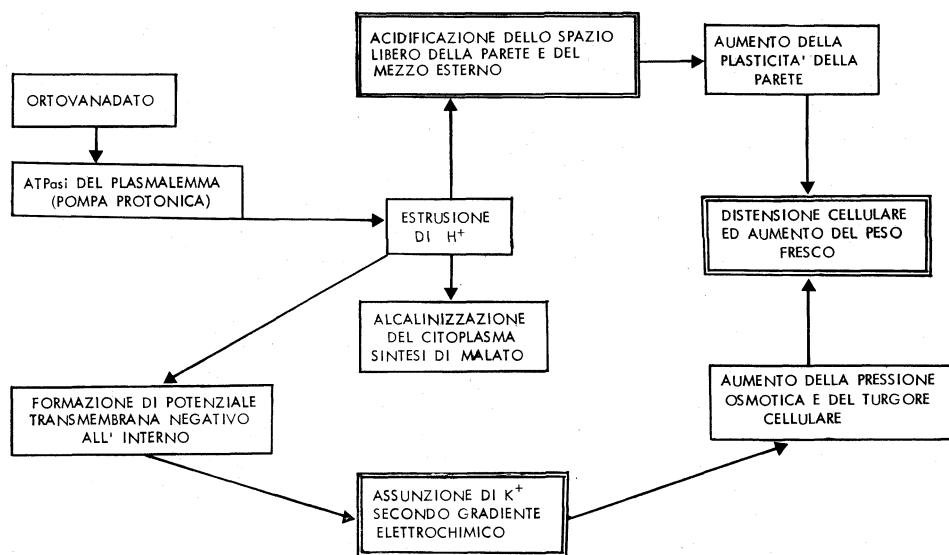


Fig. 1. - Interpretazione degli effetti « in vivo » del vanadato come conseguenza della sua azione inibente su di un singolo sistema enzimatico, l'ATPasi del plasmalemma.

Lo schema della fig. 1 ripete sostanzialmente il modello proposto e più esaurientemente documentato per l'interpretazione dell'effetto stimolante della fusicoccina (effetto opposto a quello inibente del vanadato) su crescita, assunzione di K^+ ed estrusione di protoni nei semi germinanti ed in altri materiali [5].

Il fatto che lo stesso schema risulti adatto per l'interpretazione degli effetti di due sostanze ad azione opposta aumenta la fiducia nella sua validità. In particolare, esce rinforzata dalle presenti esperienze l'ipotesi dell'identificazione dell'ATPasi del plasmalemma come componente fondamentale della pompa protonica elettrogenica.

D'altra parte l'evidenza qui presentata è da intendersi come essenzialmente preliminare e permane un ampio margine d'incertezza nella sua interpretazione. È sperabile che ulteriori più dettagliate ricerche circa la specificità d'azione del vanadato « in vitro » e le caratteristiche della sua azione « in vivo », su questo ed altri materiali, portino nuovi elementi atti a chiarire questo importante aspetto della biochimica e fisiologia del plasmalemma delle piante superiori.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. J. POOLE (1978) - « Ann. Rev. Plant Physiol. », 29, 437-460.
- [2] F. M. HAROLD and D. PAPINEAU (1972) - « J. Membr. Biol. », 8, 45-62.
- [3] B. J. BOWMAN and C. W. SLAYMAN (1977) - « J. Biol. Chem. », 252 (10), 3357-3363.
- [4] N. E. BALKE and T. K. HODGES (1977) - « Plant Sci. Lett. », 10 (4), 319-325.
- [5] E. MARRÈ (1979) - « Ann. Rev. Plant Physiol. » (in press).
- [6] M. COCUCCI, A. BALLARIN-DENTI and M. T. MARRÈ (1978) - « Rend. Accad. Naz. Lincei » (presentato per la pubblicazione).
- [7] B. J. BOWMAN, S. E. MAINES, K. E. ALLEN and C. W. SLAYMAN (1978) - « Biochem. Biophys. Acta », 512, 13-28.
- [8] P. LADO, F. RASI-CALDOGNO and R. COLOMBO (1975) - « Physiol. Plant », 34, 359-364.
- [9] S. COCUCCI and M. COCUCCI (1977) - « Plant Sci. Lett. », 10, 85-95.
- [10] D. L. RAYLE and R. CLELAND (1977) - « Curr. Top. Dev. Biol. », 11, 187-211.