

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

SERGIO COCUCCI, ERASMO MARRÈ

**Ricerche sull'invecchiamento in foglie recise. - II.  
Sull'effetto di protezione degli zuccheri della luce e  
della cinetina sugli acidi ribonucleici e sulla capacità  
fotosintetica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.6, p.  
1095–1102.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1966\\_8\\_40\\_6\\_1095\\_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_6_1095_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.* —

II. *Sull'effetto di protezione degli zuccheri della luce e della cinetina sugli acidi ribonucleici e sulla capacità fotosintetica* (\*). Nota di SERGIO COCUCCI ed ERASMO MARRÈ, presentata (\*\*) dal Socio S. TONZIG.

SUMMARY. — The presence in the incubation medium of sucrose, at a 2% concentration was found to almost completely inhibit the rapid decrease of RNA occurring in excised Potato leaf discs and in Avena leaf fragments. Also the drop of chlorophyll and of photosynthetic activity was efficiently prevented by the sugar.

The effect of sucrose in preventing the RNA and chlorophyll decrease during incubation in the dark appeared to be the same order as that of  $10^{-5}$ M kinetin.

The rate of  $^{32}$ P phosphate incorporation into RNA was very significantly increased by sucrose.

In the leaf fragments incubated in the light (ca. 4,000 lux) the protection of RNA and of chlorophyll and of the photosynthetic capacity after 24 and 48 hours appeared of the same order as the one performed by sucrose. This effect of light was almost completely suppressed by the presence of  $10^{-4}$ M DCMU, a specific inhibitor of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation.

These findings are interpreted as indicating that the level of sugars is an important factor in regulating the balance between RNA (and thus protein) synthesis and degradation in the excised leaves as well as, quite probably, in the leaf under physiological conditions.

## INTRODUZIONE.

Precedenti lavori [1, 2, 3] dimostrano come gli zuccheri, al buio, e la luce, esplichino, nei riguardi del cosiddetto « invecchiamento » (inteso come un'attivazione degli apparati fotosintetico e respiratorio e dello scatenamento di fenomeni di proteolisi) una efficace azione protettiva, paragonabile a quella della cinetina [4, 5], sostanza di tipo ormonale mai identificata, per altro, come prodotto naturale nelle piante superiori.

Il fatto che la cinetina inibisca pure efficacemente la demolizione degli acidi ribonucleici osservata durante l'incubazione delle foglie recise [6] ci ha indotti a studiare in che misura e per quale meccanismo gli zuccheri, e la luce tramite i prodotti della fotosintesi, o eventualmente per altre vie, potessero sostituire la cinetina anche per quanto riguarda questo fondamentale aspetto dell'invecchiamento.

(\*) 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.

## MATERIALI E METODI.

Il materiale è stato fornito da porzioni mediane (cm 4) isolate dalla parte mediana di foglie di piantine di avena sativa var. Alaska divise a metà lungo la nervatura centrale. L'avena veniva coltivata per 13 giorni in cella termostata a 25°C con 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Il materiale veniva posto in piastre su due fogli di carta da filtro imbevuti con acqua, o soluzioni di cinetina  $10^{-5}$ M o di saccarosio 2% o di DCMU  $10^{-4}$ M e incubato per 24 o 48 ore, alla luce o al buio, a 25°C.

Le misure della clorofilla e degli zuccheri venivano eseguite secondo Marrè et al. [3]. La preparazione e l'analisi su gradiente di saccarosio del materiale ribosomiale veniva effettuata secondo Marrè et al. [7]. L'analisi quantitativa dell'RNA era effettuata come descritto in un precedente lavoro [8]. Per la determinazione della radioattività ad una frazione dell'RNA estratto venivano aggiunti 0,24 mg di albumina e 0,1 volume di acido perclorico 50%. Il precipitato era raccolto su dischi di Millipore HA lavato con 12 ml di acido perclorico 5% contenente  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $10^{-3}$  M e quindi la radioattività determinata sui filtri. Le misure di fotosintesi venivano effettuate determinando la quantità di  $^{14}\text{CO}_2$  fissata in 30' a 25°C con intensità luminosa di circa 4.000 lux in presenza di una concentrazione di  $\text{CO}_2$  nella fase gassosa pari al 2%. La radioattività incorporata veniva determinata dopo incenerimento del materiale secondo Katz et al. [9].

## ESPERIENZE E RISULTATI.

A) *Inibizione da saccarosio della demolizione dell'RNA in dischi di foglie di Patata.*

L'azione del saccarosio sull'RNA è stata studiata in una serie di esperienze preliminari condotte su dischi di 8 mm di diametro ottenuti da foglie di patata (*Solanum tuberosum*) materiale che, come l'Avena, risulta particolarmente adatto per questo tipo di ricerca, per la rapidità con cui in esso si manifestano altri aspetti dell'invecchiamento, quali la caduta della clorofilla e di diverse attività enzimatiche, la proteolisi e l'inattivazione della fotosintesi [3].

In queste esperienze l'RNA totale, e lo stato del sistema ribosomiale, quale rilevato dai profili di sedimentazione in gradiente di saccarosio, sono stati determinati al tempo 0 e dopo 40 ore di incubazione rispettivamente in acqua o in saccarosio 2%. I risultati possono riassumersi dicendo che la forte caduta (circa il 50%) dell'RNA totale e quella, dello stesso ordine, dell'RNA ribosomiale sono pressoché totalmente impediti dalla presenza di saccarosio.

Tutte le esperienze sotto riferite sono state invece condotte su parti di foglie di Avena, materiale facile da coltivarsi in laboratorio e più agevolmente standardizzabile che non la patata.

B) *Confronto tra effetti della cinetina, del saccarosio e della luce sull'RNA e la clorofilla in foglie recise di Avena.*

I risultati della Tabella I mostrano come sia il saccarosio, al buio, che la luce proteggano molto efficacemente tanto l'RNA che la clorofilla. Questo effetto appare dello stesso ordine di quello della cinetina; anche se potrebbero essere significative alcune divergenze, come la maggior efficacia della cinetina, nel proteggere la clorofilla, e dello zucchero, nel proteggere l'RNA.

Gli effetti di protezione della cinetina e del saccarosio appaiono additivi. Poiché entrambi i composti sono stati somministrati a concentrazioni per lo meno molto vicine a quella ottimale, ciò suggerisce che essi agiscano tramite meccanismi almeno inizialmente distinti; il che non esclude che, attraverso sequenze distinte di reazioni intermedie, essi possano investire i medesimi meccanismi regolatori del bilancio dell'RNA e della clorofilla. Il fatto che il contenuto in glucidi non venga sostanzialmente alterato dalla cinetina sembra escludere che essa possa agire semplicemente accelerando l'utilizzazione delle riserve glucidiche; d'altra parte la singolare equivalenza tra protezione da cinetina e protezione da zuccheri sembra sfavorevole all'interpretazione che l'effetto di questi ultimi possa semplicemente imputarsi alla loro natura di substrati respiratori. Di fatto i risultati delle esperienze con cinetina sembrano escludere che un difetto di substrati respiratori giochi una funzione essenziale nel quadro degradativo caratteristico dell'invecchiamento in questo materiale.

Ancora dalla Tabella I si nota come l'azione protettiva della luce sembri riconducibile essenzialmente alla produzione di fotosintati. Infatti la presenza di DCMU, inibitore specifico della fissazione fotosintetica della CO<sub>2</sub>, ma non della fosforilazione fotosintetica ciclica [10], mentre non influenza sensibilmente il comportamento dell'RNA e della clorofilla al buio, per contro sopprime quasi del tutto l'azione protettiva della luce.

C) *Azione del saccarosio su RNA, clorofilla, assunzione e incorporazione nell'RNA di fosfato <sup>32</sup>P.*

Dalle esperienze della Tabella II risulta che nelle foglie incubate al buio, in acqua, l'RNA cade rapidamente nelle prime 24 ore, e rimane pressoché costante nelle 24 ore successive, mentre invece la caduta della clorofilla segue un andamento continuo. La determinazione dell'assunzione nella frazione alcol solubile e dell'incorporazione (in 2 ore, al buio) di fosfato <sup>32</sup>P somministrato rispettivamente ai tempi 0, 24, e 48 ore dall'inizio dell'incubazione in acqua o in saccarosio dimostrano che: a) nelle foglie in acqua al buio, la capacità di assunzione nella frazione alcol solubile rimane pressoché inalterata, mentre l'incorporazione nell'RNA risulta alquanto diminuita col passare del tempo; b) il saccarosio aumenta di molto la quantità di <sup>32</sup>P nella frazione alcol solubile, ma soprattutto aumenta la velocità di incorporazione del fosfato nell'RNA. La precocità dell'azione protettiva del saccarosio sull'RNA sembra ancora una volta, favorevole all'idea di un'azione regolatrice,

TABELLA I.

Confronto fra l'azione protettiva della cinetina  $10^{-5}$ M, del saccarosio 2% e della luce (con e senza DCMU  $10^{-4}$ M) sulla caduta della clorofilla e dell'RNA in foglie recise di *Avena incubata* 48 ore a 25°C.

Tempo o		Clorofilla $\gamma/100$ mg p. fr.	Variaz. in % rispetto t. o	RNA $\gamma/100$ mg p. fr.	Variaz. in % rispetto t. o	Zuccheri riduttori $\mu\text{moli}/100$ mg p. fr.	Saccarosio $\mu\text{moli}/100$ mg p. fr.
		97	—	100	—	0,937	0,27
	H <sub>2</sub> O, buio .....	46	—53	62	—38	0,06	0,28
	Cinetina $10^{-5}$ M, buio.....	86	—11	74	—26	0,05	0,09
	Saccarosio 2%, buio .....	73	—25	96	—4	3,9	12
48 ore in	Cinetina $10^{-5}$ M, Saccarosio 2%, buio.....	101	+3	91	—9	2,5	11,9
	H <sub>2</sub> O, luce .....	82	—16	93	—7	3,6	5,4
	DCMU $10^{-4}$ M, luce.....	58	—40	68	—32	0,72	1,6
	DCMU $10^{-4}$ M, buio .....	50	—49	60	—40	0,55	—

TABELLA II.

*Effetto del saccarosio e della luce sulla clorofilla, sull'RNA e sull'incorporazione di  $^{32}\text{P}$  nell'RNA in foglie d'*Avena* incubate 24 e 48 ore a 25°C.*

	Clorofilla $\gamma/100$ mg p. fr.	Variaz. in % rispetto t. o	RNA $\gamma/100$ mg p. fr.	Variaz. in % rispetto t. o	$^{32}\text{P}$ alcol solubile	$^{32}\text{P}$ incorp. in RNA
Tempo o	137	—	99	—	137.000	412
24 ore in	H <sub>2</sub> O, buio .....	—34	61	—39	124.000	265
	Saccarosio 2%, buio .....	—22	84	—16	191.000	794
	H <sub>2</sub> O, luce .....	—11	80	—20	205.000	424
48 ore in	H <sub>2</sub> O, buio .....	—54	63	—37	110.000	740
	Saccarosio 2%, buio .....	—48	93	—7	167.000	1340
	H <sub>2</sub> O, luce .....	—30	94	—6	233.000	950

TABELLA III.

*Effetto della preincubazione al buio in acqua più o meno saccarosio e della luce sulla capacità fotosintetica di foglie recise di Avena, misurata per 30' dopo 24 e rispettivamente 48 ore di trattamento.*

	Clorofilla 100 mg p. fr.	Fotosintesi			Variaz. in % rispetto t. o
		$\mu\text{moli CO}_2/\text{gr p. fr.}$	Variaz. in % rispetto t. o	$\mu\text{moli CO}_2/\text{mg}$ clorof.	
Tempo 0	135	252	—	186	—
24 ore in	H <sub>2</sub> O, buio .....	141	—44	151	—18
	Saccarosio 2%, buio .....	217	—14	250	+34
	H <sub>2</sub> O, luce (4000 lux) .....	240	—5	195	+5
48 ore in	H <sub>2</sub> O, buio .....	46	—81	106	—43
	Saccarosio 2%, buio .....	255	—	304	+63
	H <sub>2</sub> O, luce (4000 lux) .....	191	—24	181	—3



piuttosto che trofica, degli zuccheri o di loro derivati. Il forte stimolo dell'incorporazione del fosfato nell'RNA suggerisce un'azione sulla sintesi dell'RNA, senza tuttavia escluderne una, complementare, di inibizione di meccanismi degradativi.

L'effetto della luce, in queste esperienze, appare sostanzialmente simile a quello del saccarosio al buio, il che conferma l'idea che essa possa almeno in larga misura ricondursi alla produzione di fotosintati.

D) *Effetto della preincubazione in saccarosio, al buio, e della luce sulla capacità fotosintetica di foglie recise.*

Precedenti ricerche esplorative su dischi di foglie di patata [3] dimostravano come la forte caduta della fotosintesi nei dischi di foglie di patata incubate al buio e l'inattivazione della capacità dei cloroplasti isolati dalle stesse di effettuare la reazione di Hill venissero efficacemente inibite dalla presenza di zuccheri nel mezzo. Nelle esperienze della Tabella III abbiamo studiato, questa volta su Avena, l'effetto della preincubazione al buio, con e senza saccarosio, e della luce, parallelamente sul comportamento della clorofilla e della capacità fotosintetica, determinata *in vivo* in condizioni standard al tempo 0 e dopo 24 e 48 ore di trattamento.

Appare evidente che: a) nelle foglie al buio la caduta della clorofilla è associata ad una caduta molto più marcata della capacità di fotosintesi; b) sia il saccarosio che la luce proteggono, durante l'incubazione, l'apparato fotosintetico in misura anche maggiore che non la clorofilla, tanto che i valori di fotosintesi per clorofilla, nelle foglie incubate con saccarosio e alla luce, per 24 e per 48 ore, diventano addirittura più elevate di quelli osservati nelle foglie appena recise.

#### CONCLUSIONI.

I dati sopra riferiti dimostrano come prodotti naturali della fotosintesi quali i glucidi possano efficacemente sostituire la cinetina nel prevenire, oltre ad altre manifestazioni degradative, anche la caduta del tenore in RNA nelle foglie recise. Il fatto che una forte diminuzione dell'RNA risulti come uno dei fenomeni più precoci tra quelli che caratterizzano « l'invecchiamento » delle foglie recise (inattivazione fotosintetica e respiratoria, proteolisi) suggerisce la possibilità di un rapporto causa-effetto tra degradazione del sistema degli acidi nucleici e manifestazioni degenerative a carico del metabolismo proteico.

La netta azione di stimolo del saccarosio e della luce (il cui effetto sull'RNA, in quanto inibito dal DCMU, appare riconducibile soprattutto alla produzione fotosintetica di glucidi) nello stimolare l'incorporazione di fosfato nell'RNA suggerisce che una componente dell'azione degli zuccheri consista nello stimolo della sintesi di RNA. Resta aperta la possibilità di un'eventuale parallela azione inibente dei glucidi, o di loro derivati, sullo scatenamento

di attività litiche dell' RNA. Pure insoluti restano il problema di quali siano i derivati del metabolismo glucidico direttamente attivi nel controllare il metabolismo dell' RNA e quello del rapporto tra l'azione dei glucidi e quella di fattori ormonali del tipo della cinetina: problemi affrontati in altre ricerche attualmente in corso in questo laboratorio.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] E. MARRÈ, « Atti Acc. Ligure Scienze e Lettere », VI, 1 (1949).
- [2] E. MARRÈ e L. FELICI, « Rendic. Acc. Naz. Lincei », IX, 188 (1950).
- [3] E. MARRÈ, P. LADO e M. SCHWENDIMMAN, « Rendic. Acc. Naz. Lincei », in questo fascicolo.
- [4] J. W. ANDERSON e K. S. ROWAN, « Biochem. J. », 98, 401 (1966).
- [5] M. SAGIURA, K. UNEMURA e Y. OOTA, « Phys. Plant », 15, 457 (1962).
- [6] D. OSBORNE, « Plant Physiol. », 37, 595 (1962).
- [7] E. MARRÈ, S. COCUCCI e E. P. STURANI, « Plant Physiol. », 40, 1162 (1965).
- [8] E. P. STURANI e S. COCUCCI, « Life Sciences », 4, 1937 (1965).
- [9] J. KATZ, S. ABRAHAM e N. BAKER, « Anal. Chem. », 26, 1503 (1954).
- [10] G. FORTI e B. PARISI, « Biochem. Biophys. Acta », 71, 1 (1963).