

AZIONE DELLA STREPTOMICINA
SULLA SINTESI DELLA CLOROFILLA
NELL'*HORDEUM VULGARE* (*)

FRANCESCO CEDRANGOLO,
ENZO LEONE e DOMENICO ZIMMARINO

SYMMARIUM. — Confirmant Auctores ea quae EULERIUS significavit de inhibitione streptomycinae vi in chlorophyllae synthesisim.

Animadvertunt autem chlorophyllae deminutionem, quae a streptomycina efficitur, eandem permanere etsi prolina vel amyloacida inferantur, quae cum streptomycina biologice connectantur. Ex quo nonnulla coniciuntur de ratione quo prolinae polycyclum ovenit.

È merito di EULER [1] l'aver segnalato un'azione caratteristica della streptomicina sulla sintesi della clorofilla: tale azione consiste nella inibizione, cospicua e irreversibile, che la streptomicina provoca sulla sintesi della clorofilla, per cui pianticine cresciute da semi germogliati in presenza dell'antibiotico presentano foglie con clorofilla in quantità notevolmente inferiore a quelle di piante normali controllo. Il « difetto di clorofilla » prodotto dalla streptomicina sarebbe specifico: questo antibiotico infatti sarebbe l'unico a causarlo, mentre gli altri fenomeni di inibizione, per esempio sulla crescita delle radici, sono provocati anche da altre sostanze quali la colchicina, la penicillina, i sulfamidici, l'istidina ecc.

EULER e coll. [2-3] hanno, d'altra parte, dimostrato che gli acidi nucleinici (sia ribo- che deossiribo-nucleinici), in analogia con quanto avviene nel regno animale (EULER e PENJE [2]), posseggono la proprietà di promuovere anche lo sviluppo delle piante e che se si aggiungono tali acidi a semi di cui si è inibito lo sviluppo con colchicina

(*) Nota presentata da S. E. l'Accademico Pontificio G. Quagliarello nella riunione 5 dicembre 1950.

si vede che l'inibizione è del tutto rimossa per effetto di tale aggiunta. Si riporta in proposito una tabella di v. EULER (*loc. cit.* [1]).

Soluzione	Grado di sviluppo relativo
Acqua senza aggiunta	10
Colchicina 0,05%	3
Ac. ribonucleinico 0,05%	12
Colchicina 0,05% + ac. ribonucleinico 0,05%	10

In base a questi risultati sembrerebbe doversi ammettere la possibilità che « la colchicina inibisca delle sintesi, che si possono ripristinare per mezzo di sostanze promotrici dello sviluppo (Wuchsstoffe) (EULER [4]).

Di tipo diverso appare invece l'azione della streptomicina: 1) perchè si osservano, nelle piante sviluppate da semi, ai quali si è aggiunto l'antibiotico, ispessimento del coleottilo e formazione di foglioline contenenti clorofilla *solo nel quarto superiore*; 2) perchè questo « difetto di clorofilla », poi non è rimosso per aggiunta di sostanze promotrici dello sviluppo, come ad esempio ac. nucleinici. Da tali risultati all'autore svedese sembra possibile la conclusione che la streptomicina inattiva un sistema enzimatico interessato nella sintesi della clorofilla » (*loc. cit.* [1]).

Ci è parso perciò interessante sviluppare le indagini nella direzione dell'identificazione del sistema enzimatico interessato e in primo luogo abbiamo eseguito la ricerca, che qui si riporta, che ha avuto lo scopo di *studiare l'effetto dell'aggiunta di aminoacidi contenenti l'anello pirrolico o, comunque in relazione biologica con il detto anello, a sistemi costituiti da semi in via di sviluppo in presenza ed in assenza di streptomicina.*

Le modalità delle esperienze e i risultati sono appresso descritti.

TECNICA SPERIMENTALE. — Semi di *Hordeum vulgare*, tenuti in acqua corrente per 18-24 ore, erano successivamente secondo la tecnica di EULER e PERJE [3] e di EULER [5] portati su carta da filtro in capsule di vetro (abbiamo usato capsule di Petri dal diametro di cm. 15 circa), in numero di 50 per ogni capsula. Le capsule erano tenute a temperatura ambiente e, per le prime 48 ore, al riparo della luce. Sulla carta da filtro sottostante ai semi si poneva H₂O contenente le varie sostanze nelle proporzioni appresso indicate, misurando accuratamente la rea-

zione del liquido. Ogni 12 ore si aggiungeva acqua alle capsule in modo che il livello dell'acqua fosse mantenuto costantemente a circa 3 mm. dal fondo.

La composizione delle singole prove era la seguente:

TAB. II. - *Aggiunte in mg a semi in via di sviluppo* (n. 50 semi per capsula di Petri + 15 cc. H₂O).

Capsula n.		Acido			
		Streptomycina	glutammico	Ornitina	Prolina
1	A	—	—	—	—
»	1 B	20	—	—	—
»	2 A	—	—	—	—
»	2 B	20	—	—	—
»	3 A	—	20	—	—
»	3 B	20	20	—	—
»	4 A	—	—	20	—
»	4 B	20	—	20	—
»	5 A	—	—	—	20
»	5 B	20	—	—	20

Tutti i composti erano sciolti in piccolo volume di H₂O e accuratamente neutralizzati con NaOH o HCl secondo i casi. Onde assicurare una pressione osmotica il più possibile uniforme furono, inoltre, poste nelle varie capsule quantità variabili di soluzioni NaCl e CaCl₂, opportunamente calcolate per raggiungere tale scopo.

Dall'inizio delle esperienze, le prove furono seguite fino al germoglio dei semi ed allo sviluppo della pianticina. Le esperienze furono poi interrotte ad epoche varie dall'inizio, mai però prima del 7° o dopo il 12° giorno. Durante le esperienze si effettuavano frequenti determinazioni del pH dei liquidi delle capsule, eventualmente si correggevano lievi differenze. Al termine di ogni esperienza si procedeva nel modo seguente. Prelevate le singole pianticine dalle capsule si dividevano nelle seguenti parti: radici, coleottila, fogliolina. Le radici erano pesate così come pure le foglioline. La fogliolina era misurata nella lunghezza, indi divisa in due parti, separando quella bianca dalla verde, e di questa ultima si misurava la lunghezza.

I risultati sono qui appresso riassunti: per semplicità ci riferiamo ai dati quantitativi medi relativi ad una singola esperienza della Serie, i cui risultati sono peraltro perfettamente sovrapponibili a quelli delle altre esperienze (8 in tutto).

Dividiamo il complesso delle nostre osservazioni in 2 gruppi: quelle riguardanti le prove senza streptomycina, per ricavare l'effetto provocato dall'aggiunta dei vari aminoacidi sullo sviluppo dei semi, e quelle riguardanti le prove con streptomycina, per ricavare l'eventuale azione modificatrice degli aminoacidi sui fenomeni di inibizione provocati dalla streptomycina.

Da un'analisi dei risultati appare:

A) Riguardo all'azione delle varie aggiunte, comparativamente, in assenza di streptomycina:

1) che la prolina e, in grado minore, anche l'ornitina e l'ac. glutammico provocano in genere un aumento del peso della fogliolina (colla prolina l'aumento è di circa il 30 %; cfr. colonna *a* con colonna *d*);

2) che le aggiunte producono, sempre, un aumento nel rapporto parte verde-parte bianca della fogliolina. Più attivi al riguardo appaiono ornitina e ac. glutammico (cfr. colonna *a* con colonne *b* e *c*);

3) che la prolina provoca un costante aumento della lunghezza totale delle foglioline (cfr. colonna *a* con colonna *d*).

B) Riguardo all'interazione tra streptomycina e gli aminoacidi aggiunti:

1. *peso delle foglioline.* - L'aggiunta della streptomycina fa diminuire notevolmente il peso delle foglioline (cfr. colonna *a* con colonna *e*). Tale diminuzione di peso provocata dalla streptomycina persiste se si confrontano le piantine, alle quali si è aggiunto ac. glutammico o prolina, colle piantine, alle quali, oltre le dette aggiunte, si è aggiunto anche la streptomycina (cfr. colonne *b* e *d* con colonne *f* ed *h*). Le piantine, cresciute in presenza di ornitina, mostrano invece un peso pressochè identico a quello delle piantine cresciute in presenza di ornitina e di streptomycina (cfr. colonna *c* colla colonna *g*);

2. *peso e lunghezza delle radici.* - Tali grandezze figurano notevolmente abbassate per azione della streptomycina (cfr. colonna *a* con colonna *e*). L'aggiunta di ac. glutammico, ornitina o prolina non modifica sostanzialmente il quadro provocato dall'antibiotico (cfr. colonne *a-d* con colonne *e-h*);

3. *rapporto parte verde/parte bianca.* - Tale rapporto ci dà un indice, sia pure grossolano, della quantità di clorofilla delle piantine. Risulta, anzitutto, perfettamente confermata l'osservazione di EULER

(*loc. cit.* [1]) a proposito dell'azione inibitrice, esercitata dalla streptomina sulla sintesi della clorofilla. *Grosso modo* si può dire che nelle prove con streptomina la parte verde della fogliolina era considerevolmente ridotta, limitandosi per lo più, al suo quarto superiore (cfr. colonna *a* con colonna *e*). Risulta, inoltre, il fatto molto importante che l'aggiunta di streptomina ha per effetto una diminuzione della quantità di clorofilla, che è praticamente sempre la stessa se si paragonano le piantine cresciute in sola acqua con quelle cresciute in acqua + streptomina, le piantine cresciute in acqua + ac. glutammico con quelle cresciute in acqua + ac. glutammico + streptomina ecc. (cfr. colonne *a-d* con colonne *e-h*).

4. *lunghezza totale foglioline.* - Riguardo infine alla lunghezza totale delle foglioline, si nota che la streptomina determina sempre una diminuzione di tale grandezza, senza notevoli variazioni tra prove con e senza aggiunta di aminoacidi (cfr. colonna *a-d* con colonne *e-h*).

I risultati ottenuti si prestano ad un breve commento.

La cosa più importante da noi osservata è certamente il fatto che la diminuita formazione della clorofilla per azione della streptomina non risente alcun beneficio dall'aggiunta della prolina come degli aminoacidi con essa biologicamente correlati (ac. glutammico e ornitina: vedi CEDRANGOLO e coll. [6]). Questo potrebbe significare che il sistema enzimatico, cointeressato nella formazione della clorofilla, che risente dell'azione della streptomina, deve operare una qualche reazione, che è oltre la formazione dell'anello pirrolico, vale a dire, in altre parole, che il blocco determinato dall'antibiotico deve cadere su un punto della via per la quale dall'anello pirrolico si arriva alla porfina della clorofilla (se infatti il blocco cadesse nella fase della sintesi dell'anello pirrolico, l'aggiunta di prolina dovrebbe essere efficace nel rimuovere l'inibizione esercitata dalla streptomina). In altre parole, anche, possiamo dire che le nostre ricerche, conformemente al modo di ragionare di EULER (*loc. cit.* [1]), darebbero la dimostrazione che gli enzimi vegetali interessati nella sintesi del nucleo pirrolico certamente sono streptomina-insensibili e che se un qualche enzima, connesso colla sintesi della clorofilla, rappresenta il punto sensibile che risente dell'azione dell'antibiotico, questo enzima deve essere operante ad uno stadio superiore alla detta sintesi, vale a dire in una di quelle fasi, in cui i 4 anelli pirrolici si organizzano nella costruzione del policiclo della porfina.

D'altra parte è da tener presente che il policiclo della porfina si potrebbe organizzare *d'emblée* da composti molto semplici (per es. glicina, ac. acetico ecc. vedi SHEMIN e RITTENBERG [7]; WITTENBERG e SHEMIN [8]; MUIR e NEUBERGER [9] senza che si passi per lo stadio di prolina (e forse anche per quello di un qualsiasi composto pirrolico monociclico). È evidente allora che se le cose stanno così, quale che sia l'enzima sensibile alla streptomycina, nè l'aggiunta di prolina nè quella di aminoacidi biologicamente correlati ad essa, potrebbe essere efficace nel rimuovere l'inibizione esercitata dall'antibiotico.

Infine un'ultima considerazione. EULER e BRACCO [10] hanno dimostrato *in vitro* che la streptomycina precipita i cloroplasti per formazione di prodotti insolubili cogli ac. nucleinici di questi ultimi. A tale osservazione per il momento non si può dare ancora alcun valore fisiologico. Tuttavia dobbiamo rilevare che ove con essa si riuscisse a spiegare anche « il difetto di clorofilla » che l'antibiotico provoca *in vivo*, risulterebbe pure facilmente comprensibile il risultato da noi ottenuto, relativo all'inefficacia della prolina e degli aminoacidi ad essa correlati a neutralizzare tale difetto.

Sviluppo di semi di Hordeum vulgare in presenza e in assenza di streptomycina e di aminoacidi (1).

	Senza streptomycina				Con streptomycina			
	H ₂ O a	acido glutammico b	ornitina c	prolina d	H ₂ O e	acido glutammico f	ornitina g	prolina h i
Peso foglioline (*)	1,122	1,475	1,343	1,580	0,873	1,150	1,332	1,397
Lunghezza totale foglioline	9,94	10,86	10,76	11,25	8,42	8,64	9,36	8,79
Lunghezza coleottili	4,8	3,94	3,89	3,80	3,68	3,6	3,41	3,72
Peso radici	1,29	1,38	1,24	1,37	0,83	0,93	0,97	0,98
Lunghezza radici	4,3	5,1	4,8	4,6	3,1	2,8	3,1	2,9
Clorofilla (verde %)	56	68	74	67	42	53	50	52
% semi non germogliati	3	2,5	3,1	3,8	6,1	5,8	4,3	7,3

(1) I dati si riferiscono a pianticine dell'età di 7 giorni. I pesi sono espressi in g e riferiti a gruppi di n. 50 pianticine, le lunghezze in cm. per ogni pianticina. Prolina racemica; ornitina ed ac. glutammico naturali.

(2) Pianticine senza radici e coleottili.

BIBLIOGRAFIA

- [1] EULER, « Ark. Kemi, Min. o. Geol. », 1948, 25 A, n. 8.
- [2] EULER e RÖNNSTAM, cit. in n. 1.
- [3] EULER e PERJE, Ibidem 1945, 20 A, n. 2.
- [4] EULER, « Sv. Kem. Tidskr. », 1946, 58, 180.
- [5] EULER, « Ark. f. Kemi », 1946, 22 A, n. 14.
- [6] F. CEDRANGOLO, E. LEONE e D. GUERRITORE, « Arch. Soc. Biol. », 1949, 33, 503.
- [7] SHERMIN e RITTENBERG, « J. Biol. Chem. », 1946, 166, 621.
- [8] WITTENBERG e SHERMIN, Ibidem, 1950, 185, 103.
- [9] MUIR e NEUBERGER, « Bioch. Journ. », 1950, 47, 97.
- [10] EULER e BRACCO, « Kemiska Arbeten », 1948, Marsch 10.