

A T T I
DELLA
SOCIETÀ TOSCANA
DI
SCIENZE NATURALI
RESIDENTE IN PISA

MEMORIE - SERIE B

VOL. LXXXIII - ANNO 1976

INDICE

GANDOLFI G., TONGIORGI P. - La presenza di <i>Knipowitschia panizzai</i> (Verga) in acque lagunari ed estuariali tirreniche (Osteichthyes, Gobiidae) .	Pag. 1
LUCCHETTI G. - Effetto dei trigliceridi di acidi grassi saturi sulla fibrinolisi: studio in vitro	» 10
SOLDATINI G.F., NAVARI-IZZO F., LOTTI G., WAGGAN M.R. - Ricerche sui cationi associati alle proteine solubili delle foglie di mais	» 19
MALLEGNI F. - Un caso di assottigliamento biparietale simmetrico in un calvario della necropoli eneolitica del Gaudio	» 31
TOMEI P.E., CAVALLI S. - L'areale dell'Istrice (<i>Hystrix cristata</i> L.) a nord dell'Arno	» 42
LOMBARDI PARDINI E.C. - Le ossa lunghe etrusche del Museo Nazionale di Antropologia di Firenze (Studio metrico e morfologico)	» 49
DEL PRETE C. - Contributi alla conoscenza delle Orchidaceae d'Italia. I. Reperti nuovi o rari per le Alpi Apuane	» 75
BONIFAZI R., D'AMORE C. - I diametri trasversali di un capello al tricocicloforo: limiti di una metodologia	» 87
TOMEI P.E. - Un prezioso documento sulla avifauna della « bassa Versilia ». La collezione Gagnani-Rontani	» 93
SORDI M. - Catture occasionali e reperti di specie animali finora non segnalate nell'Alto Tirreno	» 138
MONTI G. - Materiale per una flora micologica della provincia di Pisa. I: macromiceti della selva costiera	» 146
MARI M. - Osservazioni sulla malacofauna delle lagune di Orbetello . .	» 190
<i>Elenco dei Soci per l'anno 1976</i>	» 207

G. F. SOLDATINI, F. NAVARI-IZZO, G. LOTTI, M. R. WAGGAN (*)

RICERCHE SUI CATIONI ASSOCIATI ALLE PROTEINE SOLUBILI DELLE FOGLIE DI MAIS (**)

Riassunto — E' stata condotta una serie di prove sulla distribuzione dei cationi nella frazione proteica solubile delle foglie di mais estratta con TRIS. Operando una gel-filtrazione su colonna di Bio-Gel P6, è stato messo in evidenza che le proteine solubili possono essere separate in sei frazioni.

La determinazione dei cationi nelle diverse frazioni ha mostrato che mentre la frazione II non contiene cationi, alla frazione I appare associato soltanto lo zinco, alla frazione III il sodio e il potassio, alla IV il magnesio ed alla V e VI il calcio.

Summary — A study on cations associated to soluble proteins extracted from maize leaves with TRIS-buffer pH 7.4 is reported. The supernatant liquid obtained by centrifuging the extract at 18,400 g was passed through a column of Bio-Gel P6 and separated in 6 fractions.

While the fraction II was found to contain no cations, the fraction I was associated with Zn; the fraction III with Na and K; the fraction IV with Mg and the fractions V and VI with Ca.

INTRODUZIONE

I metodi di frazionamento delle sostanze proteiche delle foglie verdi sono ormai impiegati da molto tempo e fondamentalmente possono essere suddivisi in metodi che utilizzano estrazioni successive con solventi diversi (C. DIEZ-ALTARES e E. BORNEMISZA [1967]; L. SODEK e C. WILSON [1971]; R. JAMBUNATHAN e E. T. MERTZ [1973]) e metodi che operano le separazioni per centrifugazione frazionata (J. E. VARNER e G. SCHIDLOVSKY [1963]) e per

(*) Istituto di Chimica agraria dell'Università di Pisa.

(**) Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R.

centrifugazione zonale (N. G. ANDERSON [1962]; C. A. PRICE e D. H. BROWN [1965]) previa estrazione con tamponi differenti (A. BETSCHART e J. E. KINSELLA [1973]; K. OKUBO e K. SHIBASAKI [1967]).

Con queste varie metodiche si ottengono frazioni proteiche talvolta assai diverse tra loro, generalmente commiste ad altri componenti cellulari, che possono successivamente essere purificate o ulteriormente risolte, con l'impiego della cromatografia su colonna, su strato sottile e delle tecniche elettroforetiche.

Poiché le frazioni delle foglie sono in gran parte costituite da complessi enzimatici o da proteine legate alle strutture subcellulari, assume particolare interesse la conoscenza dei cationi associati alle frazioni stesse, che possono essere parte integrante o attivatori degli enzimi o costituenti stabili o adsorbiti dei complessi gluco-proteici o lipoproteici.

Le ricerche in questo senso sono tuttavia particolarmente scarse. Si ricordano le indagini di F. R. WHATLEY et AL. [1951] relative alla distribuzione degli elementi micronutritivi nei cloroplasti isolati per centrifugazione e quelle di A. C. NEISH [1939] e di J. BOSQUET [1957] sulla diffusione del potassio nei cloroplasti e nelle altre parti delle foglie. C. R. STOCKING e A. ONGUN [1962] studiarono la distribuzione intracellulare di potassio, sodio, magnesio e calcio in cloroplasti isolati con solventi non acquosi, onde evitare perdite per dilavamento, nelle foglie di tabacco e di fagiolo, trovando che i cloroplasti nelle cellule funzionano da zone di accumulo di ioni. V. S. RATHORE et AL. [1972] e F. NAVARI-IZZO et AL. [1975] hanno poi esaminato la localizzazione dello zinco e del calcio nelle frazioni subcellulari delle foglie di fagiolo e di medica trovando la maggior parte dello zinco nella frazione citoplasmatica, mentre il calcio rimaneva localizzato soprattutto nelle pareti cellulari.

In letteratura non abbiamo invece riscontrato indagini relative alla distribuzione degli ioni nelle diverse frazioni proteiche solubili che compongono la frazione citoplasmatica che rimane dopo allontanamento per centrifugazione dei nuclei, cloroplasti e mitocondri.

Dato l'interesse di una tale indagine, abbiamo voluto studiare la distribuzione dei cationi nella frazione proteica citoplasmatica delle foglie di mais, pianta spesso utilizzata in esperienze di questo tipo (A. C. L. VASCONCELOS e L. BOGORAD [1971]).

MATERIALI E METODI

Le foglie di mais sono state prelevate in un ampio appezzamento di terreno, situato nella tenuta di Tombolo (Pisa) e coltivato con la varietà *Asgrow-ATC 39* allo stadio di prefioritura. Il terreno si presentava sabbioso, con pH 7,5 e sufficientemente dotato di azoto, anidride fosforica e potassio assimilabile. All'impianto il terreno aveva subito una fertilizzazione con 120 unità di azoto, 150 di fosforo e 100 di potassio per ettaro.

I prelievi di foglie, che si presentavano perfettamente integre ed esenti da sintomi visivi di carenze nutrizionali, vennero eseguiti in modo randomizzato, per garantire una certa uniformità statistica. I campioni prelevati vennero poi riuniti in un unico coacervo che venne liofilizzato e mantenuto a -25°C per garantire la perfetta conservazione del materiale per tutta la durata delle prove. Le foglie liofilizzate presentavano una umidità residua del 4%.

L'estrazione delle proteine solubili delle foglie venne eseguita con tampone TRIS 0,1 M contenente acido ascorbico 0,075 M a pH 7,4, come descritto in un nostro precedente lavoro (F. NAVARIZZO et Al. [1975]) secondo una tecnica messa a punto da numerosi Autori (J. E. VARNER e G. SCHIDLOVSKY [1963]; A. BETSCHART e J. E. KINSELLA [1973]). Nel tampone non abbiamo aggiunto il β -mercaptoetanolo per evitare interferenze con i cationi, da noi riscontrate in prove preliminari.

Il procedimento è stato condotto con diversi rapporti campione-estraente, che saranno meglio specificati nella discussione dei risultati.

Il materiale vegetale liofilizzato veniva posto a contatto con la soluzione estraente per 2 ore a 4°C , indi omogeneizzato in Waring blender refrigerato per 1'30" con brevi pause ogni 15". L'omogeneizzato veniva poi filtrato su tre strati di garza e quindi centrifugato con centrifuga refrigerata «*Lourdes, Beta-fuge A-2*» a 12.000 r.p.m. (18.400 g) per 30' a 4°C . Il surnatante, contenente le proteine solubili veniva sottoposto a gel filtrazione, impiegando le seguenti colonne:

colonna di Sephadex G 25 fine di cm 2,5 x 58, alla quale veniva applicato un flusso di 26,4 ml/ora;

colonna di Bio Gel P6, 400 mesh, di cm 2,5 x 58 con flusso di 22,3 ml/ora;

colonna di Sephadex G 200 di cm 2,5 x 56 con flusso di 12,6 ml/ora;

colonna di Bio Gel A 1,5 di 2,1 x 50 cm con flusso di 30 ml/ora.

Tutte le colonne usate sono state equilibrate con TRIS 0,1 M a pH 7,4. Le frazioni cromatografiche sono state raccolte impiegando un collettore di frazioni refrigerato della LKB e separate in funzione della trasmittanza a 280 nm. Immediatamente dopo la separazione, le diverse frazioni venivano liofilizzate per prevenire qualsiasi alterazione.

La composizione amminoacidica delle diverse frazioni è stata determinata idrolizzando le proteine con HCl 6 N in fiala chiusa sottovuoto, mantenuta a 105°C per 24 ore. L'idrolizzato veniva poi portato a secco in evaporatore rotativo sotto vuoto a -20°C ripreso con acqua ed evaporato nuovamente fino a scomparsa dell'acido. Il residuo veniva quindi disciolto in tampone citrato a pH 2,2.

Gli amminoacidi sono stati identificati e determinati utilizzando un analizzatore automatico Mod. 121 della «Beckman». La colonna per gli amminoacidi basici era riempita con resina PA 35 e quella per gli amminoacidi acidi e neutri con resina AA 15. I cromatogrammi standard venivano effettuati con una miscela di amminoacidi della Beckman in quantità di 0,125 μ M per ogni amminoacido.

I cationi associati alle diverse frazioni (zinco, sodio, potassio, magnesio e calcio) sono stati determinati mediante spettrofotometria in assorbimento atomico con apparecchiatura «Optica» mod. 6000.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Una prima prova è stata eseguita estraendo le foglie con TRIS nel rapporto campione-estraente 1:15. L'estratto, dopo filtrazione e centrifugazione a 12.000 r.p.m. (18.400 g), è stato cromatografato sulla colonna di Sephadex G 25 fine (2,5 x 58 cm), misurando la trasmittanza a 280 nm. La separazione ottenuta viene riportata nella Fig. 1, nella quale si mettono in evidenza tre picchi. Il picco I che usciva con il volume vuoto della colonna, costituito cioè da sostanze a peso molecolare superiore a 5000, è risultato come vedremo formato totalmente da sostanze proteiche, mentre il picco

III, in forma di larga banda, appariva presumibilmente costituito da una associazione di picchi non ben separati tra di loro.

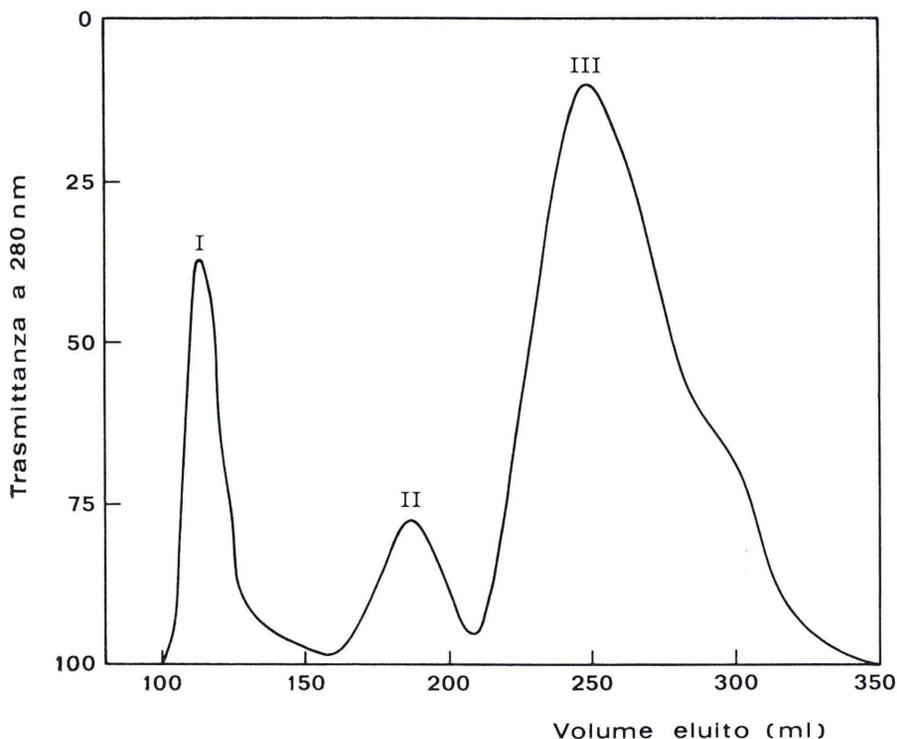


Fig. 1 - Gel-filtrazione su Sephadex G25 fine dell'estratto con TRIS delle foglie di mais (rapporto campione-estraente 1:15).

Effettuando la determinazione in assorbimento atomico dei cationi associati alle frazioni costituenti i tre picchi, si metteva in evidenza che al picco I risultava associato in quantità determinabile soltanto lo zinco, al picco II non risultava associato alcun catione, mentre al picco III apparivano associati in forti quantità, distribuite tuttavia in modo non uniforme nell'ambito del picco, calcio, magnesio, sodio e potassio.

In nessuno dei tre picchi è stato possibile mettere in evidenza, con il metodo impiegato — anche tenendo conto della forte diluizione dell'estratto nel corso della filtrazione — quantità misurabili di altri elementi ed in particolare di ferro, rame e manganese.

Allo scopo di meglio caratterizzare la natura delle sostanze presenti nelle frazioni costituenti i tre picchi, abbiamo eseguito sulle frazioni alcuni saggi di natura chimica e precisamente: saggio con acido fosfotungstico al 10% e con acido tricloroacetico al 10% per la presenza di proteine; test di Molisch con soluzione alcoolica di α -naftolo e acido solforico conc. e reazione dell'antrone allo 0,2% per la presenza di glucidi.

Con acido fosfotungstico ed acido tricloroacetico si è ottenuto un precipitato soltanto nella frazione I, mentre il test di Molisch e la reazione dell'antrone sono risultate positive per le frazioni II e III e negative per la frazione I. Ciò in prima approssimazione indica che, mentre la frazione I risulta praticamente formata da sole sostanze proteiche, nelle frazioni II e III sono presenti anche componenti glucidici (forse glucoproteine).

Ulteriori prove, condotte con colonne di Sephadex G 200 (cm 2,5 x 56) e di Bio Gel A 1,5 (cm 2,1 x 50) e dirette a saggiare la possibilità di risolvere ulteriormente il picco I hanno dato esito negativo.

Sulle tre frazioni è stata anche determinata la composizione in amminoacidi totali. Per evitare l'eventuale disturbo legato alla presenza del TRIS in quantità eccessiva, le frazioni venivano previamente fatte passare da una colonna di Bio-Gel- P 2 equilibrata con acqua. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab. 1, dall'esame della quale si deduce che la frazione I mostra una composizione quantitativa in amminoacidi notevolmente equilibrata, con prevalenza di acido glutammico seguito da glicina, alanina e acido aspartico. La sua composizione amminoacidica rispecchia solo qualitativamente quella delle proteine della «Frazione I» riportata in letteratura (H. KAWASHIMA e S. G. WILDMAN [1970]; R. W. DORNER et Al. [1958]; S. M. RIDLEY et Al. [1967]) e riconosciuta praticamente identica alla ribulosio-difosfato carbossilasi (J. P. THORNER et Al. [1966]; N. G. PON [1967]) e corrisponde praticamente ad una frazione di albumine e globuline (L. SODEK e C. M. WILSON [1971]).

In particolare manca del tutto la glucosammina e la galattosammina. La frazione II presenta composizione amminoacidica non molto diversa dalla frazione I per quanto riguarda i rapporti tra i diversi amminoacidi. Ne differisce per non contenere cisteina e per contenere invece sensibili quantità di glucosammina e galattosammina, ciò che può far pensare alla presenza di glucoproteidi a peso molecolare relativamente basso.

TABELLA 1 - *Composizione amminoacidica delle frazioni ottenute per Gel-filtrazione dell'estratto con TRIS delle foglie di mais (valori espressi in moli per cento moli di amminoacidi).*

Amminoacidi	Frazione I	Frazione II	Frazione III
Acido aspartico	9,3	10,3	6,5
Acido glutammico	11,8	10,7	4,9
Alanina	9,5	9,5	45,3
Arginina	6,3	3,6	tr.
Cisteina	2,2	—	0,7
Fenilalanina	4,7	3,4	0,5
Glicina	10,2	9,5	8,8
Isoleucina	4,3	3,6	1,0
Istidina	2,8	1,2	1,4
Leucina	8,9	7,3	1,7
Lisina	5,5	6,0	8,5
Metionina	1,8	1,2	0,6
Prolina	6,3	1,6	0,3
Serina	4,0	7,0	10,8
Tirosina	4,2	1,0	0,3
Treonina	6,1	7,5	3,3
Valina	6,7	6,1	1,4
Galattosammina	—	1,9	2,9
Glucosammina	—	8,6	1,2

La frazione III invece presenta una composizione assai diversa dalle precedenti, con una forte preponderanza di alanina che da sola rappresenta oltre il 45% degli amminoacidi presenti ed una corrispondente diminuzione di tutti gli altri amminoacidi, tranne glicina, lisina e serina che si mantengono dello stesso ordine di grandezza o superiori alle altre frazioni.

Ricordiamo che nelle frazioni idrolizzate con HCl il triptofano e la cistina scompaiono durante l'idrolisi, la glutammina e l'asparagina eventualmente presenti si trasformano rispettivamente in acido glutammico e aspartico, con liberazione di ammoniaca (non riportata nella tabella). Altri amminoacidi subiscono distruzioni più o meno evidenti che nella tabella sono state considerate mediante l'uso di fattori di correzione empirici da noi in precedenza determinati (G. ANELLI et Al. [1973]).

In conclusione questa prima separazione aveva indicato che, mentre i primi due picchi (frazione I e II) potevano considerarsi sufficientemente omogenei e rispettivamente costituiti da proteine

e da proteidi e glucidi, con il catione zinco associato alla frazione I, il terzo picco (frazione III) poteva essere ulteriormente risolvibile. Ciò appariva assai interessante, anche tenendo conto che i cationi costituenti i macroelementi, erano concentrati in questa frazione, mentre mancavano totalmente nelle altre due.

Abbiamo quindi proceduto ad una serie di prove dirette ad effettuare una risoluzione migliore della frazione III, operando l'estrazione delle foglie con TRIS a differenti rapporti campione-estraente, ed eseguendo poi sempre la separazione cromatografica con colonna di Sephadex G 25 fine. Le prove hanno messo in evidenza che con un rapporto campione-estraente 1:5 si otteneva una separazione molto migliore dei picchi, in quanto era possibile aggiungere alla colonna una quantità minore di soluzione, essendo questa più concentrata. Nella Fig. 2 viene riportata la separazione ottenuta con questa metodica, dalla quale risulta chiaro che la frazione III si è separata in tre picchi, il III, IV e V.

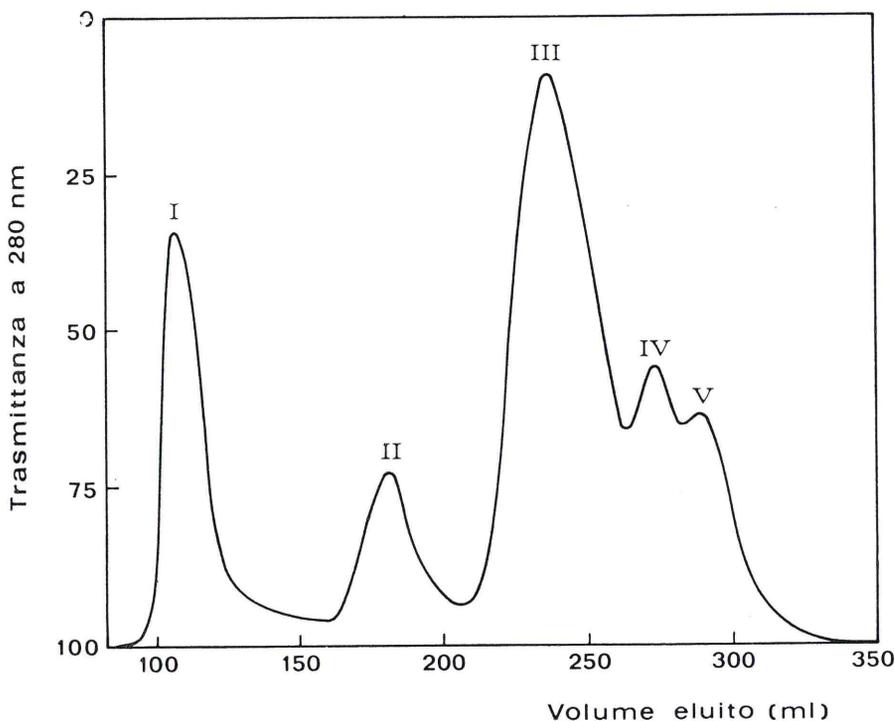


Fig. 2 - Gel-filtrazione su Sephadex G25 fine dell'estratto con TRIS delle foglie di mais (rapporto campione-estraente 1:5).

Successivamente, considerando ottimale il rapporto campione-estraente 1:5, abbiamo cercato di migliorare ulteriormente la separazione della frazione III utilizzando, per il riempimento della colonna cromatografica (2,5 x 58 cm) un gel avente caratteristiche analoghe al Sephadex G 25 ma una maggiore finezza e precisamente il Bio Gel P 6, 400 mesh.

La separazione ottenuta con questa colonna è riportata nella Fig. 3, nella quale si nota che l'estratto delle foglie risulta separato in 6 frazioni assai nette, in quanto la frazione III della Fig. 1 si è ulteriormente suddivisa in quattro picchi.

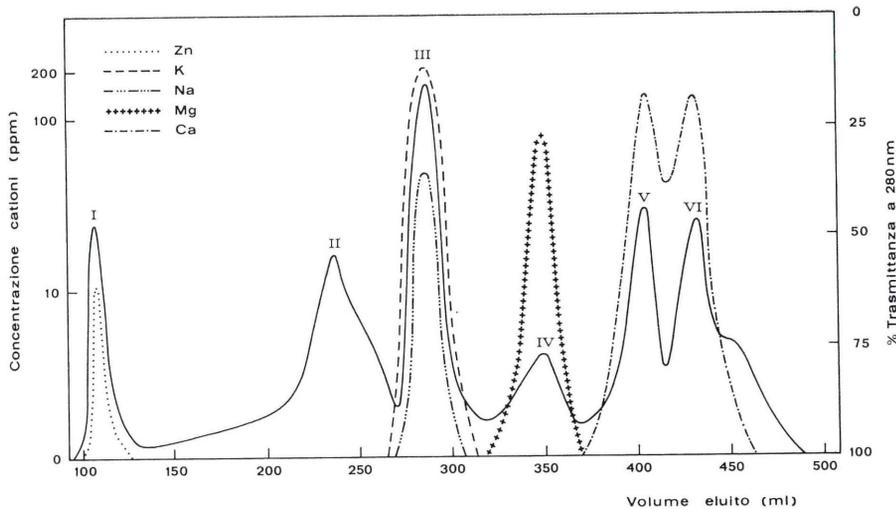


Fig. 3 - Gel filtrazione con Bio-Gel P6, 400 mesh dell'estratto con TRIS delle foglie di mais (rapporto campione-estraente 1:5) e determinazione dei cationi (i valori dello zinco sono moltiplicati per 10).

Nelle diverse porzioni di eluizione abbiamo proceduto alla determinazione in assorbimento atomico dei diversi cationi riscontrati. Nella stessa Fig. 3 sono indicate le concentrazioni in p.p.m. di zinco, sodio, potassio, magnesio e calcio. Come risulta chiaramente evidente dall'esame della figura, le variazioni delle concentrazioni dei singoli elementi seguono esattamente l'andamento dei singoli picchi.

Appare chiaro che alla frazione proteica I, di più elevato peso molecolare, risulta associato solamente lo zinco, mentre alla fra-

zione II non risulta associato alcun catione in quantità dosabile. Alla frazione III risultano uniti sodio e potassio, alla frazione IV il solo magnesio, mentre alle frazioni V e VI risulta associato unicamente il calcio.

Il fatto che nella I frazione, come abbiamo già detto confrontabile con la «frazione proteica I» di S. G. WILDMANN e J. BONNER [1947] sia associato lo zinco, risulta in accordo con quanto da noi riscontrato nell'estratto con TRIS delle foglie di medica (F. NAVARI-IZZO et Al. [1975]), nel quale lo zinco rimaneva quasi del tutto nella sospensione finale, dopo centrifugazione a 15.000 r.p.m.

L'elemento appare quindi associato alle proteine citoplasmatiche, in quanto facente parte integrante di numerosi sistemi enzimatici, oltre che formante complessi proteici nei quali (F. R. N. GURD e D. S. GOODMAN [1952]) sembra in relazione ai residui di istidina nella molecola proteica.

Nella frazione III il sodio e il potassio probabilmente si trovano come complessi di adsorbimento con le molecole glucoproteiche, mentre la frazione IV associata al magnesio può essere in parte costituita da enzimi per i quali il magnesio rappresenta l'attivatore. Le frazioni V e VI infine che contengono calcio, presumibilmente sono formate soltanto da poliuronidi. Queste deduzioni sono confermate in linea molto generale dai dati che si ottengono effettuando il dosaggio quantitativo dei cationi associati alle singole frazioni depurate dal TRIS eventualmente presente. In prima approssimazione si riscontra che la frazione I contiene lo 0,06% di zinco, la III il 4,7% di potassio e lo 0,2% di sodio, la IV l'1,8% di magnesio, la V e la VI rispettivamente lo 0,4 e lo 0,3% di calcio.

CONCLUSIONI

Le indagini condotte sulle proteine solubili delle foglie di mais estratte con TRIS, che rimangono in soluzione dopo centrifugazione a 18.400 g, hanno permesso di accertare che:

- a) la frazione proteica citoplasmatica può essere separata per cromatografia su colonna di Bio-Gel P6 in sei frazioni di peso molecolare decrescente;
- b) la frazione I (peso molecolare maggiore di 5.000) risulta composta da sole sostanze proteiche, mentre nelle altre si riscontrano anche componenti glucidici;

- c) alla frazione I risulta associato soltanto lo zinco, alla II nessun catione, alla III il sodio e il potassio, alla IV il magnesio ed alla V e VI il calcio.

Dato l'interesse che queste ricerche possono rivestire nella biochimica cellulare, ci ripromettiamo di proseguirle ed estenderle su diverse specie vegetali, procedendo alla precisazione del peso molecolare delle singole frazioni ed alla loro precisa caratterizzazione chimica.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN N. G. (1962) - The zonal centrifuge. A new instrument for fractionating mixtures of particles. *J. Phys. Chem.*, **66**, 1984-1989.
- ANELLI G., LOTTI G., NAVARRINI A. (1973) - Influenza degli zuccheri e degli acidi organici sull'idrolisi delle proteine. *Sci. Tecnol. Alim.*, **3**, 347 (1973).
- BETSCHART A., KINSELLA J. E. (1973) - Extractability and solubility of leaf protein. *J. Agr. Food Chem.*, **21**, 60-65.
- BOSQUET J. (1957) - Note sur l'absence de potassium dans les chloroplastes de différentes végétaux. *France Inst. Nat. Rec. Agron.*, Ser. A, **8**, 151-153.
- DIEZ-ALTARES C., BORNEMISZA E. (1967) - The localization of zinc-65 in germinating corn tissues. *Plant & Soil*, **26**, 175-188.
- DORNER R. W., KAHN A., WILDMAN S. G. (1958) - Proteins in green leaves. VIII. Distribution of fraction I protein in the plant kingdom as detected by precipitin and ultracentrifugal analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 240-248.
- GURD F. R. N., GOODMAN D. S. (1952) - Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXXII - The interaction of human serum albumin with zinc ions. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 670-675.
- JAMBUNATHAN R., MERTZ E. T. (1973) - Relationship between tannin levels, rat growth and distribution of proteins in sorghum. *J. Agr. Food Chem.*, **21**, 692-696.
- KAWASHIMA N., WILDMAN S. G. (1970) - Fraction I protein. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 325-358.
- NAVARI-IZZO F., LOTTI G., SOLDATINI G. (1975) - Distribuzione dello zinco nelle frazioni proteiche e subcellulari delle foglie di *Medicago sativa*. *Atti Soc. Tosc. Sc. Nat. Mem.*, Serie B, **81**, 120-135.
- NEISH A. C. (1939) - Studies on chloroplasts. II. Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf. *Biochem. J.*, **33**, 300-308.
- ÖKUBO K., SHIBASAKI K. (1967) - Fractionation of main components and their subunits of soybean proteins. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1276-1282.
- PON N. G. (1967) - Some physical properties of purified fraction I protein from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 179-193.

- PRICE C. A., BROWN D. H. (1965) - Zonal centrifuge analysis of a transformation in *Ustilago* controlled by zinc. *Plant Physiol.*, **40**, 1278-1282.
- RATHORE V. S., BAJAJ Y. P. S., WITTWER S. H. (1972) - Subcellular localization of zinc and calcium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) tissues. *Plant Physiol.*, **49**, 207-211.
- RIDLEY S. M., THORNER J. P., BAILEY J. L. (1967) - A study of the water-soluble proteins of spinach beet chloroplasts with particular reference to fraction I protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 62-79.
- SODEK L., WILSON C. M. (1971) - Amino acid composition of proteins isolated from normal, Opaque 2 and Floury-2 corn endosperms by a modified Osborne procedure. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 1144-1150.
- STOCKING C. R., ONGUN A. (1962) - The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. *Amer. J. Bot.*, **49**, 284-289.
- THORNER J. P., SMITH C. A., BAILEY J. L. (1966) - Partial characterization of 2-chlorophyll-protein complexes isolated from spinach beet chloroplasts. *Biochem. J.*, **100**, 14P-15P.
- VARNER J. E., SCHIDLOVSKY G. (1963) - Intracellular distribution of proteins in pea cotyledons. *Plant Physiol.*, **38**, 139-144.
- VASCONCELOS A. C. L., BOGORAD L. (1971) - Proteins of cytoplasm, chloroplast and mitochondrial ribosomes of some plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 492-502.
- WHATLEY F. R., ORDIN L., ARNON D. I. (1951) - Distribution of micronutrient metals in leaves and chloroplast fragments. *Plant Physiol.*, **26**, 414-418.
- WILDMAN S. G., BONNER J. (1947) - Proteins of green leaves. I. Isolation, enzymic properties, and auxin content of cytoplasmic proteins. *Arch. Biochem.*, **14**, 381-413.

(ms. pres. il 10 ottobre 1976; ult. bozze il 16 novembre 1976).