

Analisi delle proteine di riserva estratte da semi antichi peruviani

M. DURANTE, L. PIACENZA, P. BRUSCHI E R. BERNARDI

Abstract

Analysis of seed Storage proteins from ancient peruvian seeds - The Storage proteins of ancient seeds from the archaeological site of Ica (Perù) were isolated and compared with those extracted from modern seeds through electrophoresis in denaturing conditions. Glutelins and zeins are well preserved in all the ancient specimens of *Zea mays*. In *Canavalia* sp. were found the polypeptides of the two main Storage components, canavalin and concanavalin A, and other minor bands. The results suggest the possibility of using the electrophoretic patterns of the Storage proteins in ancient and modern seeds for studying the recent evolution of crop plants.

Introduzione

I primi studi sulle proteine di riserva dei semi antichi, risalgono agli anni '40 (BARTON-WRIGHT *et al.*, 1944). Studi evolutivisti su materiale vegetale archeologico di mais, in base a caratteristiche morfologiche, sono stati riportati da MANGELSDORF (1974). DERBYSHIRE *et al.* (1977), dopo elettroforesi in condizioni denaturanti delle proteine totali estratte da campioni di mais provenienti da un sito archeologico del N.E. Arizona e da varietà moderne, hanno rilevato che le componenti proteiche, ed in particolare la frazione zeinica, erano ben conservate. Pertanto, studi comparativi dei profili proteici di semi antichi con semi moderni, possono essere usati sia per ricerche archeologiche, che per studi sull'origine ed evoluzione delle piante coltivate.

SHEWRY *et al.* (1982), confrontando il contenuto aminoacidico e proteico di cariossidi di orzo, datate approssimativamente 1000-3000 anni a.C. e ritrovate in un sito archeologico in Egitto, con tre campioni più recenti (datati 1848, 1852, 1889) ed un campione moderno di controllo, hanno rilevato che il contenuto percentuale degli aminoacidi era conservato, sebbene tecniche elettroforetiche ed immunologiche non evidenzino presenza di globuline o ordeine, poiché le proteine erano altamente degradate.

DURANTE *et al.* (1988) hanno estratto cinque frazioni proteiche da semi antichi di mais, provenienti da un sito archeologico peruviano e datate 950+50 a.C., e le hanno comparate con campioni moderni. Le frazioni più conservate erano rappresentate da gluteline e zeine: di queste ultime risultavano perfettamente conservate le subunità di 22 e 20 kiloDalton (kDa), mentre le subunità di 15 e 10 kDa erano diversamente rappresentate. Quindi, le proteine alcool solubili rappresentano le componenti proteiche prevalenti nei semi archeologici di mais, in accordo con i risultati ottenuti da DERBYSHIRE *et al.* (1977).

Nel presente lavoro, campioni di semi provenienti dal sito archeologico situato nella regione di Ica (Perù), sono stati comparati con semi attuali dello stesso genere, per mezzo di analisi elettroforetiche in condizioni denaturanti, per verificare il grado di conservazione delle principali subunità proteiche e per individuare le possibili relazioni filogenetiche.



Mais



Orzo

Specie vegetali, luogo di ritrovamento ed età dei semi oggetto di studio. I semi moderni di mais, utilizzati come confronto, provengono da campioni attualmente coltivati nella regione peruviana.

Codice	Specie	Località	Età
M7	<i>Zea mays</i>	Perù	moderna
M6	<i>Zea mays</i>	Perù	moderna
M9	<i>Zea mays</i>	Perù	moderna
M4	<i>Zea mays</i>	Pueblo Viejo	200-300 a.C.
M5	<i>Zea mays</i>	Pueblo Viejo	400-500 a.C.
M10	<i>Zea mays</i> var. <i>protokulli</i>	Cahuachi	200 a.C.-300 d.C.
M11	<i>Zea mays</i> var. <i>confite morocho</i>	Cahuachi	200 a.C.-300 d.C.
M12	<i>Zea mays</i> var. <i>confite iqueno</i>	Cahuachi	200 a.C.-300 d.C.
C3	<i>Canavalia maritima</i>	Mozambico	moderna
C5	<i>Canavalia ensiformis</i>	Venezuela	moderna
C1	<i>Canavalia</i> sp.	Pueblo Viejo	400-500 a.C.
C2	<i>Canavalia ensiformis</i>	Pueblo Viejo	200-300 a.C.
C4	<i>Canavalia</i> sp.	Cahuachi	200 a.C.-300 d.C.

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale

I semi antichi utilizzati nel presente lavoro, provengono da un sito archeologico che si trova nelle costa meridionale del Perù, in cui, dal 1982, sta operando il Progetto Nasca del gruppo diretto dal Prof. G. Orefici del Centro Italiano di Studi e Ricerche Archeologiche Precolombiane, Brescia (OREFICI, 1992). In Tab. 1 sono riportati i dati relativi ai campioni utilizzati sia antichi che moderni. Le età attribuite ai semi analizzati, derivano da datazioni con il metodo del radiocarbonio su resti vegetali ritrovati negli scavi archeologici. Non sono state eseguite datazioni dirette sui semi oggetto del presente lavoro, quindi le età, derivate da analisi stratigrafiche, sono da ritenersi approssimative.

Estrazione delle proteine ed elettroforesi

Le proteine totali sono state estratte dai semi antichi e da semi moderni completamente maturi secondo DERBYSHIRE *et al* (1977) per i semi di *Zea* e secondo BERNARDI *et al* (1990) per i semi di *Phaseolus* e *Canavalia*. Le elettroforesi sono state condotte in condizioni denaturanti in gel di poliacrilamide al 12% (SDS-PAGE) secondo LAEMMLI (1970).

Le bande sul gel sono state visualizzate mediante colorazione secondo BERNARDI *et al* (1990). Le analisi densitometriche, condotte mediante un apparato UVP's *e* con software UVP's GelBase TM Windows (Ultra Violet Products Ltd., UK), hanno permesso di calcolare il peso molecolare e la quantità di proteina per ciascuna banda.

Risultati e Discussione

In mais le componenti proteiche ottenute per mezzo di estrazioni delle proteine totali e frazionate (in complesso cinque frazioni denominate SN1-SN5) evidenziano, dopo elettroforesi, la presenza di bande sui campioni antichi. I tracciati elettroforetici delle subunità delle proteine totali, presentano varie bande nei campioni moderni, mentre nei campioni mummificati, sono visibili per lo più bande con basso peso molecolare. La frazione comprendente le proteine solubili in soluzioni saline (SN2) mostra solo delle tracce di bande ad alto peso molecolare nei semi antichi, mentre i tre campioni moderni mostrano una banda addizionale netta di circa 30 kDa. Le frazioni alcool solubili (SN3 e SN4) contengono rispettivamente le componenti proteiche denominate *gluteline*, che costituiscono il secondo importante gruppo di proteine di riserva nei semi di mais, e le *zeine*,

che rappresentano le maggiori componenti di riserva di mais. In tutti i campioni antichi sono ben conservate le subunità zeiniche di peso molecolare 20, 18, 17 e 15 kDa (Fig. 1), oltre a tracce di altre componenti a più alto peso molecolare: in alcuni campioni antichi e moderni è presente una banda addizionale di 16,5 kDa. Anche le maggiori subunità gluteliniche appaiono ben conservate.

Infine la frazione SN5, che rappresenta le proteine alcool insolubili, ha mostrato la presenza di bande nette con pesi molecolari compresi tra 21,5 e 14,4 kDa nei campioni moderni, mentre nelle specie mummificate sono presenti alcune subunità proteiche evidenziabili come bande diffuse: bande più nette sono state individuate nei campione M5, che ha un migliore stato di conservazione rispetto agli altri.

I risultati ottenuti sono in accordo con DERBYSHIRE *et al* (1977) e con DURANTE *et al.* (1988), i quali asseriscono che le proteine alcool solubili sono le componenti principali di semi di mais che meglio si conservano nei semi antichi.

Le maggiori componenti proteiche delle leguminose sono globuline. In tutti i campioni antichi sottoposti ad analisi elettroforetica le bande conservate sono visibili, ma con un fondo oscuro su tutta la pista elettroforetica, che può essere dovuto o alla frammentazione di alcune subunità proteiche che si distribuiscono secondo un gradiente uniforme di vari pesi molecolari, o più probabilmente all'interferenza di alcune sostanze ossidanti presenti nei campioni mummificati.

Tuttavia il genere *Canavalia* ha fornito risultati soddisfacenti rispetto ad altre leguminose analizzate (*Phaseolus* spp.: risultati non riportati nel presente lavoro). Infatti le maggiori subunità delle due proteine principali di *Canavalia*, la canavalina e la concanavalina A, che hanno pesi molecolari di 52 e 32 kDa rispettivamente, sono ben conservate (Fig. 2). È inoltre possibile individuare la presenza di numerose altre componenti in tutti i campioni analizzati: in particolare altre componenti cospicue sono quelle a pesi molecolari di 62, 46,5, 20 e 17 kDa. Tale risultato è confermato dai tracciati densitometrici.

Conclusioni

I risultati sopra riportati confermano la possibilità di individuare e caratterizzare componenti proteiche di riserva in semi antichi. Per quanto concerne il mais, i dati confermano i risultati precedenti di DERBYSHIRE *et al* (1977) e di DURANTE *et al.* (1988), e contrastano con l'ipotesi di ZEVEN *et al* (1975) secondo i quali la massima età per ritrovare proteine intatte in semi di orzo sia tra i 125 e i 175 anni.

È chiaro che il tipo di materiale biologico e le modalità di conservazione nel tempo possono giocare un ruolo importante nel processo di degradazione di macromolecole, quali proteine ed acidi nucleici: nel nostro caso il clima arido della regione in cui è stato rinvenuto il materiale utilizzato nella presente ricerca, ha contribuito sicuramente a mantenere pressoché inalterate le principali componenti di riserva.

L'altro risultato interessante è quello relativo a *Canavalia*. In un'altra leguminosa (*Phaseolus vulgaris*) PAOLOZZO, JAFFÈ (1965), confrontando per mezzo di immunoelettroforesi le globuline estratte da un campione archeologico di circa 1000 anni con campioni moderni, hanno evidenziato una sola banda debole e diffusa. Nel nostro caso sono state individuate, invece, le principali componenti delle proteine di riserva, oltre ad altre minori.

La comparazione attualmente in corso tra campioni antichi e cultivar moderne, attraverso gli indici di similarità costruiti secondo NEL, LI (1979), come rapporto tra il numero di bande a comune ed il numero di bande comuni e differenti, potrebbe dare un contributo importante per lo studio delle distanze genetiche e, quindi, della storia evolutiva recente di piante coltivate nell'America latina.

Letteratura citata

BARTON-WRIGHT E.C., BOOTH R.G., PRINGLE W.J.S., 1944 *Analysis of barley from King Tutankhamen's tomb*. Nature, 153:288.

BERNARDI R., LUPI M.C., DURANTE M., 1990 - *Phaseolus coccineus Storage proteins. Extraction and characterization*. Biologia plantarum, 32. 198-204.

DERBYSHIRE E., HARRIS N., BOULTER D., JOPE M., 1977 - *The extraction, composition and intra-cellular distribution of protein in early maize grains from archaeological site in N.E. Arizona*. New Phytol., 78: 499-504.

DURANTE M., BERNARDI R., ROLLO E., SALVI R., AMICI A., 1988 - *Comparison of Storage proteins in modern and mummified maize (Zea mays) seeds*. Genet. Agr., 42. 446-447.

LAEMMLI U.K., 1970 - *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227: 680-685.

MANGELSDORF P.C., 1974 - *Corn; its origin, evolution and improvement*. Harvard University Press, Cambridge.

MASS. NEI M., LI W.-H., 1979 - *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10: 5269-5273.

OREFICI G., 1992 - *NASCA, Archeologia per una ricostruzione storica*. Ed. Corpus Precolombiano, Jaca Book.

PAOLOZZO A., JAFFÈ W.G., 1965 - *Reaciones inmunológicas de extractos de semillas de habichuelas recuperadas de tumbas prehistorias en el Peru*. Bol. Soc. Quim. Peru, 31: 1-5.

SHEWRY P.R., KLKMAN MA, BURGESS S.R., FESTENSTEIN G.N., MLFLIN B.J., 1982 - *A comparison of the protein and aminoacid composition of old and recent barley grain*. New Phytol., 90. 455-466.

ZEVEN A.C., DOEKES G.J., KISLEV M., 1975 - *Proteins in old grains of Triticum sp.* J. Archaeol. Sci., 2: 209-213.

Riassunto

Le proteine di riserva di semi antichi ritrovati dal sito archeologico di Ica (Perù) sono state isolate e comparate con quelle estratte da semi moderni, attraverso analisi elettroforetiche in condizioni denaturanti.

Nei semi antichi di *Zea mays* le frazioni maggiormente conservate sono rappresentate da gluteline e zeine.

In *Canavalia* sp. sono state ritrovate le bande polipeptidiche delle principali componenti di riserva, la canavalina e la concanavalina A, oltre ad altre minori.

I risultati suggeriscono la possibilità di utilizzare i profili polipeptidici di semi antichi e moderni, per studi relativi ai centri di origine ed all'evoluzione recente delle piante coltivate.

Autori

Mauro Durante, Paola Bruschi, Rodolfo Bernardi, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Sezione di Genetica, Pisa.

Luigi Piacenza, Centro Italiano Studi e Ricerche Archeologiche Precolombiane, Brescia