

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIII.

1906

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1906

Il sale è poco solubile in alcool, insolubile in etere, solfuro di carbonio, ligroina, benzolo ed acqua, solubile in cloroformio ed etere acetico, solubilissimo in alcool metilico. Non cristallizza da nessun solvente. Imbrunisce a 105° e fonde a 115° con deflagrazione. Fondendo in un tubo d'assaggio una certa quantità di sale, si ha svolgimento di ipoazotide e formazione di solfuro di argento.

5. *Riduzione.* — 1 gr. di tiobenzanilide si scioglie in 60 cm³ di potassa al 20 %, ed alla soluzione bollente si aggiungono a piccole proporzioni per volta 2 gr. di polvere di zinco. Quasi subito si separa un olio giallognolo; si fa bollire ancora per 10 minuti e dopo raffreddamento si estrae con etere. All'olio rimasto dopo evaporato l'etere si aggiungono 100 cm³ cubici di acido cloridrico diluito, e si distilla col vapor d'acqua. L'olio che passa è benzaldeide come si può stabilire dall'odore, e dal fenilidrazone che fonde a 156° (un miscuglio di parti uguali di fenilidrazone dell'aldeide benzoica e di questo idrazone fonde parimenti a 156°), che arrossa alla luce e che, sciolto in pochissimo alcool bollente, dà con una soluzione alcoolica concentrata bollente di acido picrico il picrato caratteristico fondente a 117° (1). Da un grammo di tiobenzanilide si ottennero gr. 0,4 di idrazone, ossia gr. 0,21 di benzaldeide: il rendimento è del 42 %.

Fisiologia vegetale. — Ricerche sulla vitalità e la digestione dell'albumine delle Graminacee (2). Nota di DIANA BRUSCHI, presentata dal Socio R. PIROTTA.

Per risolvere la questione, se il materiale di riserva contenuto nell'endosperma dei semi amiliferi venga durante la germinazione digerito esclusivamente dagli enzimi segregati dall'embrione, o se le cellule stesse dell'albumine ritornino in attività vitale e sciolgano da sè le sostanze nutritizie, si sono battute due vie.

L'una consisteva nel cercare se l'embrione secerne realmente enzimi, l'altra se esso possa sostentarsi da sè anche se strappato all'endosperma e provvisto di alimento.

Io non posso riportare qui tutta la letteratura concernente l'argomento, la cui critica comparirà nel lavoro esteso (3), e mi limiterò a ricordare che, mentre Pfeffer (4), insieme con i suoi allievi Hansteen (5) e Puriewitsch (6),

(1) G. 36, 2^a, 94.

(2) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Fisiologia del R. Istituto Botanico di Roma.

(3) Negli Annali di Botanica del Prof. Pirotta.

(4) Ber. Sächs. Ges., 1893, pag. 412 e *Pflanzenphysiologie*, II^a ed., vol. I, pagg. 518-603 (1897).

(5) Flora, 1894, suppl., pag. 419.

(6) Jahrbücher f. wiss. Botan., vol. XXXI, pag. 1 (1887).

ritiene che gli endospermi amiliferi e cornei siano vivi e si vuotino da sè durante la germinazione al pari di quelli oleosi, Brown con i suoi collaboratori Morris (1) ed Escombe (2) sostiene che sono morti e che gli enzimi, i quali sciolgono le sostanze di riserva in essi accumulate, provengono dall'embrione, anzi essenzialmente dall'epitelio dello scutello, di quel cotiledone metamorfosato caratteristico delle graminacee (3).

La questione è resa più imbrogliata dal fatto che altri autori i quali, come Linz (4) e Grüss (5) hanno sperimentato esclusivamente col frumento, hanno potuto constatare che nell'endosperma di questa pianta la vitalità non è spenta durante la germinazione, mentre i suddetti inglesi si appoggiano ad esperienze eseguite coll'orzo.

Anche la teoria di Haberlandt (6) secondo cui le cellule del così detto strato od aleurona, che sta alla periferia dell'albumo delle graminacee, sarebbero le cellule secernenti la diastasi che scioglie l'amido dell'endosperma stesso, teoria che le esperienze di Linz, Brown e Morris, Hansteen, Puriewitsch hanno abbattuto, ha portato non poca confusione in questo campo.

Per l'albumo corneo del Dattero, Pond (7) ha già provato che l'autodigestione è impossibile, in opposizione a quanto sosteneva Puriewitsch. Occorre dunque la presenza dell'embrione per disciogliere l'emicellulosa, che costituisce la riserva di questo albumo. Pond però non ha ricercato in qual modo l'embrione riesca ad ottenere questo scopo.

Le mie ricerche hanno per punto di partenza le esperienze di Puriewitsch che ho accuratamente ripetute.

In seguito poi mi sono valso di tutte le possibili risorse della Fisiologia macroscopica e cellulare per stabilire se e quanta vitalità si abbia negli endospermi delle quattro graminacee: mais, frumento, orzo e segale.

Incominciai prima con lo studiare lo svotamento degli endospermi di queste quattro graminacee per mezzo della germinazione per compararlo con quanto avveniva in semi posti nelle medesime condizioni di germinazioni, ma privati dello embrione e dello scutello, ripetendo così le esperienze di Hansteen e Puriewitsch.

(1) Brown and Morris, Journal of the chemical Society, vol. LVII, pag. 458 (1890).

(2) Brown and Escombe, Proceed. Royal Society, vol. LXII, pagg. 3-34 (1898).

(3) *Descrizione citologica dell'epitelio secernente dello scutello* in Reed, Annals of Botany, vol. XVIII, pag. 267 (1904), e in Sargent e Robertson, Annals of Botany, vol. XIX, pag. 115 (1905).

(4) Landwirtsch. Jahrbücher, vol. XXIX, pag. 257 (1896).

(5) Berichte d. bot. Ges., vol. XI, pag. 286 (1893); Jahrbücher f. wiss. Botanik, vol. XXVI, pag. 424 (1894); Beitr. zur wiss. Botanik, vol. I, pag. 295 (1895); Landwirtsch. Jahrbücher, vol. XXV, pag. 431 (1896); Jahrbücher. wiss. Bot., vol. XXX, pag. 644 (1897).

(6) Berichte d. Bot. Ges., vol. VIII, pag. 40 (1890); *Physiologische Pflanzenanatomie*, III ed. pag. 444 (1904).

(7) Annals of Botany, vol. XX, pag. 181 (1906).

In questo caso i semi tenuti in bagno per quarantotto ore furono immersi in CuSO_4 al 3% per disinfettarli, quindi privati dell'embrione e dello scutello furono posti in camera di Koch su colonnette o su forme di gesso, sterilizzate e immerse sia in acqua sterile, sia in $\text{H}^3 \text{PO}_4$ $1/1000$ normale, pure sterile.

Le esperienze furono fatte e in aria libera e in atmosfera di cloroformio. I semi di tutte le esperienze venivano fissati, per ulteriori studi citologici, in vari liquidi fissatori.

Con questo procedimento ho potuto rilevare che nel seme di mais il cui endosperma è formato di una porzione periferica più ricca di protoplasma con consistenza e aspetto di tessuto corneo (glutinoso) e di una parte centrale più povera di protoplasma e del tutto farinosa, si ha un parziale svotamento dell'endosperma privato di scutello e di embrione, con distruzione completa dello strato farinoso o parte del glutinoso, corrosione fortissima dei grani d'amido, e diffusione di zucchero riducente e di altri prodotti di digestione (albumine) nei liquidi esterni. Le varietà di mais usate in queste esperienze furono: *Zea Mais romana*, *Mais quarantino*, affine al *cinquantino Mais* di Puriewitsch, *Z. Mais saccharata lilacina dulcis*, *Z. Mais saccharata rubra dulcis*.

I migliori risultati furono dati dal *Mais quarantino*.

Il massimo svotamento si aveva verso il 16°-18° giorno, tempo corrispondente al periodo normale coll'embrione.

Le esperienze comparative di endospermi posti in aria libera e in atmosfera di cloroformio dimostrarono che il cloroformio, se non arresta completamente lo svotamento, lo ostacola rallentandolo notevolmente. Poi volli vedere se per la produzione di un enzima attivo fosse necessaria la vitalità delle cellule dell'endosperma stesso, e perciò triturai separatamente aggiungendo acqua e glicerina oppure acido cloridrico $1/100$ normale, una massa di endospermi isolati e d'altra parte i rispettivi scutelli con gli embrioni, ed abbandonai all'autolisi asettica in presenza di cloroformio le poltiglie ottenute.

Potei notare, che alla temperatura di 18°-20° C, si ha in essi un notevole aumento di amilasi, anche entro pochi giorni; p. es. mentre l'azione della poltiglia su soluzione al 2% di amido solubile subito dopo la triturazione dava per gli endospermi solo tracce di zucchero, dopo 17 giorni dava già mg. 219 di $\text{CuO} = 89,6$ mq. di glucosio o 130,4 mg. di maltosio per 5 cmc. di poltiglia; e per l'estratto di scutelli con embrioni, mentre nella prima prova l'amilasi dava 42,5 mg. di CuO , nell'ultima dava mg. 584.

In una seconda esperienza, l'esame fatto immediatamente dopo la triturazione dette per l'amilasi degli endospermi mg. 20 di CuO e dopo 7 giorni mg. 98,8, per l'amilasi degli scutelli con gli embrioni dette nella prima

prova mg. 9, e dopo 7 giorni mg. 141,9 (1). Così non potendosi ritenere l'aumento di diastasi che i vari autori hanno osservato avvenire nell'endosperma, come una prova della vitalità delle cellule, poichè questo aumento si può notare anche in condizioni in cui la vitalità manca certamente, si tentò di risolvere la questione con alcuni metodi della Fisiologia cellulare.

Si adoperò prima il metodo plasmolitico, il quale dette un risultato molto incerto, perchè la quantità del materiale di riserva accumulato nelle cellule impedisce un'osservazione sicura; ma un accenno di plasmolisi parve aversi nelle cellule dello strato corneo del seme. Adoperando invece il metodo delle colorazioni vitali col violetto di metile, o col bleu d'anilina, si ottenne una immediata colorazione delle cellule dello strato farinoso e di quelle più lontane dalle cellule ad aleurona, mentre non si colorarono quelle dello strato corneo, in ispecie quelle prossime alle cellule ad aleurona, accennando così ad una gradazione fra le cellule vive, che sarebbero quelle più vicine alla parte periferica del seme, e le cellule morte che si troverebbero nella parte centrale.

Lo studio citologico del nucleo, che fu fatto tentando di colorarlo con metodi diversi, mostrò che i nuclei dello strato dell'endosperma più vicino allo strato ad aleurona fissano maggiormente il verde di jodio, il verde di metile, l'eosina; e che sono un po' meno deformati e più piccoli, mentre la deformazione e la poca colorabilità aumentano quando si passa nella porzione farinosa. Se con ciò non si può stabilire che i nuclei siano addirittura morti, certo è che essi non assorbono più i colori che tingono normalmente le cellule giovani e piene di vitalità. Il nucleo si presenta lobato, vacuolizzato e accusa decrepitezza, la quale sembra aumentare dalla periferia al centro dell'albumo.

Ripetute tutte queste esperienze per l'orzo (*Hordeum distichum*), potetti concludere che nell'endosperma di orzo si ha uno svtamento se non completo molto maggiore che nel mais, che l'acido fosforico $\frac{1}{1000}$ normale agevola lo svtamento dell'endosperma come nel Mais, mentre il cloroformio ha un'azione ostacolante assai minore che sull'endosperma di mais: ciò che indica di già come la vitalità dell'albumo di orzo debba essere minore che nel frumentone.

È da notarsi che Puriewitsch aveva eseguito le sue esperienze di narcosi solo sul *cinquantino Mais*. — Del resto anche lo svtamento è nell'orzo assai più energico che nel mais, e siccome le pareti cellulari vengono attaccate anche prima dell'amido, difficilmente si potrebbe ammettere che un tessuto che non esiste più come tale, disciolga per propria attività vitale le sue riserve; convinzione che già aveva conquistato la mente di Brown e Morris.

Feci quindi anche qui la prova per vedere se esistesse in questi endospermi un pro-enzima che diventi attivo anche in autolisi asettica a bassa

(1) Sul metodo di determinazione dell'amilasi rimando al lavoro esteso.

temperatura: e venni alla conclusione che difatti esiste un pro-enzima che diventa attivo in presenza di O libero o di un acido debole senza bisogno che queste cellule conservino alcuna traccia di vitalità. Infatti, mentre subito dopo la triturazione la poltiglia degli endospermi dette per l'amilasi mg. 3 di CuO, dopo 22 giorni di macerazione asettica dette mg. 73,2; mentre la poltiglia di scutelli con gli embrioni dette nella prima prova mg. 4, nell'ultima mg. 80,3 di CuO.

Con questo non voglio dire che tutte le cellule dell'endosperma di orzo debbano essere morte fin dal principio. Le ricerche cellulari sulla vitalità dimostrarono che se un residuo di vitalità esiste in questo endosperma va ricercato solo nello strato posto immediatamente sotto l'aleurona, perchè solo in esso si può, sebbene con sforzo a causa del materiale di riserva, riscontrare un accenno alla plasmolisi, e perchè solo in esso si possono trovare, con le diverse colorazioni tracce di *sostanza nucleare*, sebbene non si possa parlare di un nucleo nettamente distinto.

Per il *frumento* potei ottenere uno svotamento completo dell'endosperma nelle esperienze all'aria libera; in quelle in atmosfera di cloroformio invece si ebbe un arresto nello svotamento, non solo, ma anche un indurimento nel seme provando con ciò che il cloroformio arresta tanto l'azione citasica come l'azione amilasica. Le ricerche cellulari e citologiche per frumento mostrerebbero che le cellule del suo albume non riacquistano vitalità durante la germinazione, poichè non si ebbe nelle cellule amilifere alcun accenno a plasmolisi; nè le colorazioni vitali dettero alcun accenno a residuo di vitalità, nè si potè in alcun modo, con differenti metodi di fissazione e colorazione, mettere in evidenza il nucleo, mentre si ha la colorazione netta di esso nell'endosperma in via di formazione. Rimane però il fatto che l'albume si vuota senza l'embrione e che il cloroformio ostacola assai questo svotamento.

Ma il discioglimento dei materiali di riserva non prova la vitalità del tessuto perchè nel seme in riposo ho potuto con le solite esperienze constatare che questo contiene un pro-enzima, che anche in autolisi, per azione dell'O e di acidi diluiti si trasforma in enzima attivo. Infatti, mentre nella prima prova dell'amilasi ebbi solo tracce di CuO, dopo 20 giorni (a 18° C.) ebbi mg. 123,92 per 5 cmc. di poltiglia degli endospermi; mentre per gli scutelli con gli embrioni nella prima prova ebbi solo tracce, nell'ultima mg. 40,26 di CuO.

È poi interessante che il cloroformio ostacola nell'albume intatto non solo la decomposizione dell'amido, ma anzitutto lo scioglimento delle pareti; si dovrebbe quindi ammettere che la citasi sia prodotta da cellule vive. Siccome però le cellule dell'endosperma sono da ritenere in massima parte morte per le ragioni suddette, così non resterebbe che ammettere che la fabbrica della citasi risieda nelle cellule ad aleurona, o al più nello strato amilifero immediatamente sottostante.

Infine per la *Segale romana* potei avere, col solito metodo, uno svotamento completo dell'endosperma, privo dell'embrione, con abbondante diffusione nel liquido esterno di zuccheri riducenti e di altri prodotti di digestione (albumine); ma fin dal primo momento si ebbe lo sfasciamento completo del tessuto amilifero, per separazione delle singole cellule. Il cloroformio non aveva azione alcuna sullo scioglimento dell'amido, nè delle pareti, nè sullo svotamento dell'endosperma, perchè sebbene i semi prendessero una tinta più bruna e si indurissero un poco, ottenni la solita separazione delle cellule e forte produzione di zuccheri riducenti, che diffondevano nel liquido esterno, e quindi questi endospermi dovrebbero essere morti fino alle cellule ad aleurona. Siccome il distacco delle cellule precede lo scioglimento dell'amido, così non si può ascrivere quest'ultimo processo ad un'attività vitale delle cellule medesime; però, mentre nell'orzo prima viene sciolta l'emicellulosa poi quasi subito anche la cellulosa, qui da prima scompare la sostanza della lamella primaria, quella che tiene cementate le cellule fra loro (probabilmente sostanze pectiche) e solo in istato molto avanzato, quando l'amido è quasi tutto sciolto, anche la membrana di cellulosa ed i suoi spessimenti di emicellulosa vengono idrolizzati e compaiono.

Siccome Puriewitsch non parla affatto di questi fenomeni che egli ha del resto sorvolato anche per l'orzo ed il frumento, così sorse il dubbio che la *Segale romana* si comportasse diversamente dalle altre specie di segale. Per fortuna il prof. Pirotta ha potuto farmi pervenire subito le più svariate qualità di Segale da diversi Istituti Botanici italiani ed esteri, e non solo di Segale cereale ma anche di Segale montanum: [*Secale cereale* del Giardino Botanico di Parigi, *Secale cereale* del Giardino Botanico di Lione, *Secale cereale* di Liegi, *Secale cereale aestivum* annuale della Stazione dei semi di Zurigo, *Secale cereale perenne* di Zurigo, *Secale cereale* del Giardino Botanico di Marburg, *Secale montanum* Grüss di Parigi, *Secale montanum* di Lione, *Secale cereale* di Utrecht]. In tutte ho potuto constatare il medesimo comportamento nello svotarsi degli endospermi, e il fenomeno del distacco delle cellule.

Allora feci delle esperienze per vedere se realmente nell'endosperma di segale esistesse un enzima citasico, e le esperienze mi dettero un risultato positivo, poichè gli estratti di endospermi di segale attaccavano e scioglievano rapidamente le pareti cellulari di sezioni di Lupino (tenute per diversi giorni immerse negli estratti).

Poichè fin dai primi momenti si ebbe lo sfasciamento del tessuto amilifero, si poteva concludere che in esso non vi è più traccia alcuna di vitalità, non di meno ripetei sulla segale gli studi cellulari e citologici. I risultati non fecero che affermarmi nella mia opinione. Nelle cellule dell'albumine di segale non si ha accenno a plasmolisi, nè è possibile con alcun mezzo porre in rilievo il nucleo.

Col metodo della colorazione vitale si ebbe immediatamente e perfettamente colorata tutta la porzione amilifera nell'endosperma.

L'auto-svotamento è prodotto anche qui da un pro-enzima che diventa attivo in presenza dell'aria o di un acido diluito. Infatti la poltiglia di endospermi in autolisi asettica nella prima prova dell'amilasi dette solo traccia di CuO mentre dopo 21 giorni ebbi mg. 129,93 per 5 cmc.; in quegli degli scutelli nella prima ebbi solo tracce, nell'ultima mg. 25,6 di CuO .

In conclusione, l'albumo amilifero delle graminacee studiate: mais, orzo, frumento e segale, può digerire sè stesso, però in grado molto diverso. Da ciò i risultati diversi ottenuti dai vari autori. L'auto-svotamento nelle diverse specie può avvenire senza bisogno della vitalità delle cellule amilifere, poichè la digestione dell'amido si compie per l'azione acceleratrice di un enzima, che per l'influenza degli acidi diluiti si forma a poco a poco da un pro-enzima che esiste nell'albumo del seme in riposo, e ciò anche quando si sia con mezzi meccanici tolta una vitalità possibile al tessuto di riserva.

Con ciò non è negata qualunque vitalità alle cellule dell'endosperma di queste graminacee, anzi i nostri studi conducono ad ammettere che la vitalità, la quale è certa per le cellule ad aleurona che si trovano alla periferia dell'albumo, sia conservata anche negli strati posti subito al di sotto dello strato aleuronico; ma che poi essa vada via via diminuendo fino a scomparire del tutto verso la parte centrale dell'albumo, come pure nella porzione attigua allo scutello. Ciò si vede chiaramente nel mais il cui albumo mostra nuclei ben netti, sebbene curiosamente deformati, nella porzione glutinosa che costituisce per così dire, lo strato corticale dell'albumo; mentre non si riesce più a metterli in evidenza nella porzione farinosa centrale che ne costituisce la polpa. Nell'orzo e nel frumento invece, se un resto di vitalità è rimasto nelle cellule amilifere, esso si deve rintracciare nello strato subito sottostante a quello delle cellule ad aleurona mentre tutta la massa maggiore dell'endosperma può considerarsi morta. Lo sfasciamento completo fin dai primi momenti della germinazione del seme di segale, mostra come quivi l'albumo sia completamente morto.

Quindi le discordanze esistenti nei dati dei vari autori che studiarono questo argomento provengono molto probabilmente dall'aver essi usato nelle loro esperienze diverse specie di graminacee: così Puriewitsch, Grüss e Linz, che hanno sperimentato a preferenza con frumentone, non hanno torto se in complesso ammettono che il suo albumo sia vivo, mentre Brown e i suoi collaboratori hanno ragione quando sostengono che l'albumo di orzo è un « magazzino morto » di riserve alimentari.

V. C.