

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCV.

1908

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVII.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1908

Fisiologia vegetale. — *Intorno a recenti ricerche sulla fotosintesi clorofilliana.* Nota dei dottori EVA MAMELI e GINO POLLACCI, presentata dal Socio GIOVANNI BRIOSI.

In due recenti Memorie sul *Meccanismo dell'assimilazione del carbonio nelle piante verdi*, i signori Fr. L. Usher e J. H. Priestley, basandosi su una serie di originali esperienze, arrivano a conclusioni così sorprendenti che ci parve meritassero una rigorosa conferma sperimentale. Oggetto principale di questa Nota sono appunto i risultati delle nostre ricerche in massima parte discordi da quelli degli autori inglesi. La prima serie di esperienze ⁽¹⁾ istituita da Usher e Priestley è rivolta alla ricerca del modo con cui avviene lo sviluppo di ossigeno nel processo assimilatorio. A questo scopo essi immersero dei getti vivi di *Elodea* in una soluzione diluita di acqua ossigenata, ed ottennero la decomposizione immediata e rapida del liquido, con svolgimento di ossigeno tanto alla luce che al buio. Viceversa questo svolgimento non ebbero quando la pianta veniva immersa per 30° in acqua bollente, o quando la trattavano con soluzione diluita di jodio, di cloruro mercurico, di idrogeno solforato o di aldeide formica. Se invece, dopo aver sospesa l'*Elodea* per un dato tempo in un ambiente carico di vapori di cloroformio, la toglievano dall'azione di tale sostanza, dopo poco notavano rapido svolgersi di ossigeno. Le nostre ricerche confermarono questi risultati, poichè noi ottenemmo da piantine sane di *Elodea canadensis* tenute per tre ore in acqua ossigenata al 2%, cmc. 32 di ossigeno alla luce e cmc. 27,5 al buio, mentre se ne ottenne quantità piccolissima quando l'*Elodea* era stata previamente immersa in acqua bollente od in sublimato corrosivo. Similmente, dopo l'azione del cloroformio noi ottenemmo svolgimento di ossigeno (cmc. 12,5 dopo 14 ore e 20^m). Questi risultati sono, secondo gli Autori, un indizio dell'esistenza di un enzima catalizzatore che essi estraggono e col quale scompongono l'acqua ossigenata. Inoltre, dall'esame microscopico a forte ingrandimento di foglie di *Elodea* poste in soluzione molto diluita di acqua ossigenata, essi deducono « la stretta localizzazione dell'enzima nei cloroplasti », poichè solo da essi, e non dalle altre parti della cellula, si svolgono bollicine di ossigeno. Per quanto questo fatto sembri logico e verosimile, le esperienze nostre non lo confermano, perchè non ci fu possibile, anche con i più potenti mezzi di ingrandimento oggi conosciuti ⁽²⁾, osservare questa localizzazione.

Con una seconda serie di esperienze gli autori si propongono la dimostrazione della presenza e della localizzazione della formaldeide nei tessuti

(1) Proceedings of the Royal Society, B. vol. 77, 1906.

(2) Obiettivo immers. 1,5 Korisk.; ocul. compens. 18, (3000 diam.).

vegetali, e la ricerca delle condizioni necessarie per la sua polimerizzazione. Essi immergono dei rami sani di *Elodea* in acqua bollente per 30^s allo scopo di uccidere il protoplasma e gli enzimi; poi li immergono in una soluzione satura di anidride carbonica, e li espongono al sole. Dopo qualche ora il color verde oscuro è scomparso, ed immergendo i getti sbiaditi nel reattivo di Schiff, Usher e Priestley ottengono la colorazione rossa, caratteristica delle aldeidi. Noi confermiamo quest'esperienza, ma non possiamo convenir con gli autori quando essi affermano che « il materiale verde in origine, trattato in tal modo, non mostrò colorazione ».

Sin dal 1899 venne dimostrato (1) che mettendo un ramo con foglie verdi, ancora attaccato alla pianta ed esposto alla luce solare, entro un vaso contenente reattivo di Schiff, dopo un certo tempo le foglie assumono un colore rosso-violaceo, mentre il liquido resta incolore. La stessa reazione avviene naturalmente ed evidentissima anche con l'*Elodea* (2). Non regge dunque la conclusione che essi traggono, e cioè: « che ci fosse nelle foglie uccise e sbiadite qualche sostanza di natura aldeica che mancava in quelle vive ».

Inoltre noi abbiamo per controllo, immerso in acqua pura, anziché in soluzione satura di CO₂, i getti di *Elodea* uccisi per immersione in acqua bollente, ed abbiamo ottenuto egualmente il fenomeno dell'imbiancamento non solo, ma in modo più rapido.

Quest'è, a parer nostro, la dimostrazione più evidente che l'imbiancamento osservato da Usher e Priestley è dovuto a nient'altro che al comune processo di ossidazione che subisce la clorofilla quando venga esposta al sole in presenza di ossigeno. E che il fenomeno si verifichi anche in soluzione concentrata di CO₂ si spiega con la presenza di una certa quantità di ossigeno nel recipiente che contiene la soluzione, quando non si abbia cura di riempirlo completamente, tanto è vero che con questa precauzione l'imbiancamento non avviene.

Le conclusioni quindi che Usher e Priestley traggono da quest'esperienza non reggono, perchè si fondano su un principio del tutto errato; e nemmeno si può dedurre da essa la presenza dell'H₂O₂ nei vegetali. Questo fatto, finora contestato (3), non trova assolutamente nessuna base nell'esperienza su citata.

La presenza dell'aldeide formica nei vegetali viene dimostrata dai due Autori, oltre che con le reazioni delle aldeidi nel distillato di *Ulva* e di *En-*

(1) G. Pollacci, *Intorno all'assimilazione clorofilliana delle piante*. Memoria I. (Atti Istit. Botan. Pavia, 1899. Vol. VII, pag. 8 e seg.).

(2) Più tardi il Grafe (*Ueber ein neues spezifisches Formaldehydreagens*; in *Osterreichischen botanischen Zeitschrift*, n. 8, 1906) ed il Kimpflin (*Sur la présence du méthanal dans les végétaux verts*; in *Compt. rend. Acad. Sc. Paris*, 1907) confermarono anch'essi con due belle reazioni la presenza dell'aldeide formica nelle piante verdi. Le loro reazioni, come noi potemmo constatare, sono veramente caratteristiche della formaldeide.

(3) Pfeffer, *Physiologie végétale*, I, Paris, 1904, pagg. 87 e 567.

teromorfa (1), anche con la reazione di Trillat nell'interno degli stessi tessuti. Ripetendo quest'elegante esperienza, ossia immergendo foglie di *Elodea* uccise ed imbiancate con soluzione di CO₂, nell'acqua di anilina, ed esaminando dopo 12-15 ore al microscopico con forte ingrandimento, osservammo attorno ai cloroplasti imbiancati, dei cristallini romboedrici, il cui aspetto è del tutto simile a quello dei cristalli di metilenanilina preparati con acqua di anilina e formolo. Essi inoltre, come questi, sono solubili in acido solforico e acido cloridrico diluiti, e in alcool a caldo, dal quale a freddo ricristallizzano.

Quest'esperienza dunque, oltre che confermare ancora una volta l'esistenza dell'aldeide formica nei vegetali, dà altresì la dimostrazione, o almeno permette l'ipotesi, della localizzazione dell'aldeide formica nei cloroplasti, localizzazione che venne pure osservata dal Kimpffin (2), facendo uso del reattivo di Schiff. L'interpretazione per altro data da Usher e Priestley a questi risultati, non è, secondo noi, esatta, poichè non è che « foglie uccise, e poste in condizioni favorevoli, sviluppano formaldeide », ma la formaldeide esisteva già nei tessuti, e i due Autori non hanno fatto altro che rintracciarla, dopo averne resa impossibile l'ulteriore polimerizzazione.

Riguardo al processo di condensazione della formaldeide, Usher e Priestley si propongono il quesito se tale condensazione sia dovuta ad un enzima secreto dal cloroplasto, o se venga effettuata dal protoplasma del granulo stesso. A questo scopo essi sospendono dei getti di *Elodea* in aria carica di vapori di cloroformio, per due ore, ottenendo così l'uccisione del protoplasma, senza danneggiare gli enzimi. Espongono poi i getti alla luce solare in soluzione satura di biossido di carbonio, e li trovano dopo qualche ora sbiancati e contenenti aldeide formica. Gli stessi Autori ne concludono « che il protoplasma del cloroplasto è l'agente condensatore della formaldeide », e, come nell'esperienza precedente, attribuiscono l'imbiancamento dell'*Elodea* all'avvelenamento degli enzimi, causato dall'accumularsi della formaldeide. Ma, chiediamo noi, qual'è l'esperienza di controllo che prova l'esclusione di questi supposti enzimi dal processo di polimerizzazione? E perchè non si ottiene più l'imbiancamento se si sottraggono del tutto dall'influenza dell'ossigeno i getti anestetizzati di *Elodea*? È ovvia poi anche in questa, come nella precedente esperienza, l'osservazione che la formaldeide esisteva nel tessuto verde dell'*Elodea* prima dell'imbiancamento.

(1) Anche in questo caso gli autori non adoperano le piante verdi, ma distillano *Ulva* ed *Enteromorfa* previamente uccise ed imbiancate con soluzione di CO₂. Le reazioni da essi ottenute sono invece evidentissime anche distillando piante in completa attività di assimilazione (vedi Pollacci, l. c.).

(2) G. Kimpffin, *Action du bisulfite de rosaniline sur les végétaux verts* (Soc. Linéenne de Lyon. Yuin, 1907).

La prima serie di esperimenti della seconda Memoria ⁽¹⁾ di Usher e Priestley, consiste nello spalmare delle lastre di vetro con una soluzione acquosa di gelatina, e nel far arrivare sopra questa una soluzione di clorofilla in modo da ottenerne una membrana sottile ed uniforme. Le lastre vengono poi messe in una campana contenente anidride carbonica, ed esposte alla luce: ecco, secondo i due autori, *una riproduzione della disposizione essenziale delle condizioni nella cellula vivente*. Da questa *cellula* artificiale essi ottengono le reazioni caratteristiche delle aldeidi, e concludono quindi per la presenza dell'aldeide formica. Evidentemente gli Autori non si sono domandati se il sistema impiegato contenesse l'aldeide formica prima della loro esperienza. E infatti, se noi tentiamo, in un soluto etero o benzenico ⁽²⁾ di clorofilla, la reazione di Schiff, otteniamo, tanto alla luce che al buio, la colorazione rosso-pavonazza. Per conseguenza, il risultato dell'esperienza di Usher e Priestley non prova che l'aldeide formica si formi nel sistema adoperato, poichè essa vi era già contenuta.

Una prova ancora più convincente della presenza dell'aldeide metilica nel soluto benzenico od etero di clorofilla, venne data dal reattivo: codeina ed acido solforico (Pollacci), da quello di V. Grafe (difenilammina e acido solforico); da quello di G. Kimpflin (metilparammidometacresolo in soluto di bisolfito sodico) e da quello sensibilissimo di H. I. Horstmann Fenton (acido gallico e acido solforico).

Per mezzo di un'esperienza analoga, i due Autori inglesi tentano di constatare lo sviluppo dell'ossigeno per decomposizione dell'anidride carbonica. Essi costruiscono una « cellula » nel modo sopra riferito, ma contenente in più un enzima animale. La lastra viene messa entro un tubo di vetro chiuso ad una estremità, e terminante all'altra con tubo capillare. Si fa passare anidride carbonica priva di ossigeno per sei volte, poi si chiude il tubo capillare e si espone il tutto alla luce solare. Dopo un'ora, secondo i due Autori, la gelatina è rigonfiata da bolle di gas, e la membrana di clorofilla scomposta e lacerata. L'analisi del gas contenuto nel tubo, svela quantità non indifferenti di ossigeno (0,6 cc. una volta; 2 cc. un'altra): il sistema artificiale avrebbe quindi *assimilato*.

Noi ripetemmo rigorosamente l'esperienza parecchie volte, con tubi contenenti enzima e privi di enzima, ma non ottenemmo mai la formazione di ossigeno.

Gli Autori non dicono qual metodo abbiano usato per la ricerca qualitativa dell'ossigeno. Noi adoperammo dapprima una soluzione alcalina di

⁽¹⁾ *Proceed. of the Royal Soc.* 78, 1906.

⁽²⁾ Il soluto alcoolico di clorofilla dà anch'esso la reazione di Schiff. S'intende che l'etero di petrolio, il benzene o l'alcool da noi adoperati per la reazione, vennero anche essi previamente saggiati con il reattivo di Schiff. La clorofilla veniva estratta da piantine di frumento (come indicano Usher e Priestley)

pirogallolo; ma poichè, non solo l'ossigeno, ma anche l'anidride carbonica può determinare una diminuzione di volume se non è totalmente eliminata, sostituimmo a questo metodo quello più preciso e più controllabile dell'eudiometro.

La conferma della mancanza dell'ossigeno nei tubi ci venne anche data usando il fosforo, poichè, introducendone un pezzetto nella campanella dell'eudiometro contenente il gas da analizzare, questo non diminuiva mai di volume.

La soda-calce usata da Usher e Priestley per trattenere tutta l'anidride carbonica, non venne da noi adoperata a causa del suo lentissimo assorbimento, e dell'umidità che può eventualmente trattenere, e che noi crediamo possa essere stata una causa d'errore nell'esperienza di Usher Priestly.

Una terza esperienza è quella che ha per iscopo di dimostrare la formazione di amido da una cellula vivente non clorofilliana. A questo scopo, dei petali bianchi di *Saxifraga Wallacei* vengono messi alla luce in una soluzione di aldeide formica al 0,001 %; Usher e Priestley ottengono da essi la formazione di amido. Noi ripetemmo l'esperienza con petali e parti di petali bianchi di *Galanthus nivalis*, *Leucojum vernum*, *Elleborus*, *Freesia*, *Saxifraga crassifolia*, ecc., ma sempre con risultato negativo, anche variando la concentrazione della soluzione di aldeide formica.

Identico risultato i due Autori dicono di avere ottenuto da petali bianchi, esenti di amido, che venivano spalmati con soluzione di clorofilla, e posti a galleggiare in acqua satura di anidride carbonica, in un vaso esposto alla luce. Noi mettemmo interi (1) rami fioriti di *Asalea*, di cui dei fiori erano stati spalmati con una soluzione eterea di clorofilla, in soluzione satura di anidride carbonica, ed esponemmo al sole: non ottenemmo mai produzione di amido.

CONCLUSIONI.

Dalle esperienze di Usher e Priestley, da noi ripetute, si deduce:

1° Che essi non fecero alcuna ricerca diretta per provare la presenza dell'acqua ossigenata nelle piante.

2° Che non è provato l'ufficio degli enzimi catalizzatori che i due Autori ammettono come necessari nel sistema assimilatore, per la decomposizione dell'acqua ossigenata.

3° Che tutte le deduzioni da essi tratte dal fatto della presenza dell'aldeide formica nelle piante, dopo lo sbiancamento della clorofilla e la morte del protoplasma, sono errate, perchè l'aldeide formica esisteva anche nelle piante verdi, assimilanti.

(1) Allo scopo di favorire il fenomeno dell'assimilazione, dato che avvenisse.

4° Che non è possibile la decomposizione fotolitica dell'acido carbonico in presenza di clorofilla, e tanto meno si può giungere ad ottenere artificialmente aldeide formica, ossigeno ed amido, usando il metodo proposto dai suddetti Autori.

Ci sembra assai probabile che l'acqua ossigenata, già ottenuta chimicamente da anidride carbonica in presenza di ossigeno, possa prendere parte al fenomeno fotosintetico, o quanto meno trovarsi nelle piante; ma in quanto al preteso intervento di un'attività enzimatica nella scissione dell'anidride carbonica, esso non riesce dimostrato in modo sicuro dalle esperienze di Usher e Priestley.

Quindi, secondo noi, rimane solo dimostrato per ora:

1° Che, al fenomeno dell'assimilazione è strettamente legata la presenza dell'aldeide formica, come già venne trovato da uno di noi fin dal 1899, e confermato dal Grafe prima e poi dal Kimpflin con la sua reazione sulla pianta viva.

2° Che l'aldeide formica è localizzata nei soli cloroplasti, e precisamente negli strati periferici di essi, come venne osservato dal Kimpflin con il reattivo di Schiff, e da Usher e Priestley con la reazione microchimica della metilenanilina.

Tutto il resto non ha finora basi scientifiche sperimentali (1).

Il presente lavoro era già ultimato, quando comparve una memoria critica dell'Ewart (2) sulle esperienze di Usher e Priestley.

Siamo lieti di accertare che le sue osservazioni, pur condotte in modo diverso, confermano gran parte delle nostre: sicchè entrambe, frutto di esperienze indipendenti fatte contemporaneamente, acquistano maggior valore.

Con quest'ultimo Autore però, non possiamo convenire in alcune conclusioni che egli deduce dalle sue ricerche, secondo noi male interpretate. Egli scrive infatti: *Questa produzione di aldeide formica non rappresenta il primo stadio della fotosintesi, ma è, o uno degli ultimi, o un fenomeno più o meno accidentale, che si dimostra in cellule od in tessuti privi di clorofilla, anormali o morti, o nella clorofilla estratta.*

Secondo noi la presenza di questo composto è invece in stretta dipendenza con il fenomeno dell'assimilazione.

(1) Si potrebbe obiettare che le ricerche di Plancher e Ravenna (Rend. Accad. Linc. 1904) hanno dato risultati contrari a questi; ma è bene osservare che Euler, Grafe, Ritter v. Portheim, Usher e Priestley, e Kimpflin, hanno ottenuto risultati opposti a quelli dei suddetti autori, i quali d'altra parte non hanno adoperato i reattivi sensibili usati dagli altri.

(2) Ewart A. I. — *Proceed. of the Royal Society*, 80, 30.