

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVI.

1909

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

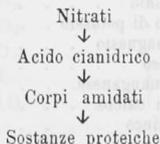
1909

Chimica vegetale — Nuove ricerche sulla funzione fisiologica dell'acido cianidrico nel *Sorghum vulgare* (1). Nota di C. RAVENNA e M. ZAMORANI, presentata dal Socio G. CIAMICIAN.

In una Nota precedente sono state descritte da uno di noi (2) alcune esperienze eseguite allo scopo di studiare il significato dell'acido cianidrico nel *Sorghum vulgare*. La ricerca fu condotta allora esclusivamente sulle foglie staccate dalle piante e si può così brevemente riassumere: quando le foglie venivano immerse colle guaine in una soluzione nutritiva contenente un idrato di carbonio (glucosio o saccarosio) e si tenevano per un certo periodo di tempo al buio, si notava che il loro contenuto in acido cianidrico era superiore a quello delle foglie poste in condizioni simili, ma senza idrato di carbonio. Altrettanto avveniva immergendole in soluzioni relativamente concentrate di nitrati. Aumenti notevoli, dalla quantità iniziale, si ottennero nelle foglie raccolte la sera in confronto di quelle raccolte al mattino. Invece, ponendo le foglie in condizioni di esclusione di carboidrati, sia facendole vivere in soluzione nutritiva al buio, sia in ambiente privo di anidride carbonica, alla luce, si osservarono forti diminuzioni. Altrettanto successe per le foglie private dell'alimento azotato (nitrati). Questi risultati ci portarono alla conclusione che l'acido cianidrico nel *Sorghum vulgare* prendesse origine direttamente dagli idrati di carbonio e dai nitrati e che, riguardo alla funzione fisiologica, potesse essere, anche in questo caso, applicabile l'ipotesi emessa da M. Treub in seguito a ricerche sperimentali (3) e cioè che l'acido cianidrico rappresenti il primo prodotto organico che si origina nella sintesi delle sostanze proteiche.

Allo scopo di portare qualche altro fatto in appoggio a quanto era stato osservato, abbiamo ripreso, fin dall'anno scorso, lo studio dell'argomento, il cui risultato è una ulteriore conferma delle precedenti supposizioni.

Poichè, secondo le attuali vedute, i corpi amidati sono i termini di passaggio nella formazione delle sostanze proteiche, noi pensammo che l'elaborazione dell'azoto nelle piante potesse avvenire secondo il seguente schema:



(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Chimica agraria della R. Università di Bologna.

(2) C. Ravenna e A. Peli, Gazzetta chimica italiana, 37, 2, 586 (1907).

(3) Annales du Jardin botanique de Buitenzorg, vol. 13, pag. 1 (1896); ibid. (vol. 19), 2ª serie, vol. 4º, pag. 86 (1904); ibid., vol. 6º, pag. 79 (1907).

Se così fosse realmente, fornendo come alimento azotato esclusivamente un'amide o un acido amidato ai vegetali in cui l'acido cianidrico rappresenta un materiale di sintesi, questi dovrebbero costituire le sostanze proteiche senza il passaggio attraverso ai termini precedenti; si giungerebbe perciò ad ottenere piante naturalmente cianogenetiche, sprovviste del principio in questione.

Di questa supposizione abbiamo cercato di dare la dimostrazione sperimentale nutrendo alcune piante di sorgo coll'asparagina. Fu prescelta tale sostanza perchè è grandemente diffusa nelle piante e perchè si attribuisce ad essa un ufficio preponderante nel metabolismo delle sostanze proteiche.

Una delle difficoltà nel fare assorbire alle piante l'asparagina, è data dalla grande rapidità colla quale essa subisce la fermentazione ammoniacale. Era quindi necessario che il mezzo di coltura fosse sterilizzato. A tale scopo facemmo un primo tentativo, servendoci di una disposizione di apparecchio che aveva già dato buoni risultati ad uno di noi (1). I recipienti adoperati sono palloni della capacità di un litro, muniti di una tubulatura laterale come nei palloni Pasteur-Hansen. Il collo, lungo tredici centimetri e largo tre, porta, a tre centimetri dalla base una strozzatura, sulla quale viene posto un tampone di cotone; un altro tampone chiude l'estremità superiore del collo. Il pallone, per mezzo della tubulatura laterale congiunta ad un tubo di gomma che può chiudersi con tappo, viene riempito per metà colla soluzione nutritiva e si sterilizza in autoclave; quindi, per mezzo di un altro pallone preparato nello stesso modo e congiunto al primo per le tubulature laterali, si aggiunge tanta soluzione fino a bagnare il tampone inferiore. I semi si sterilizzavano tenendoli immersi per un quarto d'ora in una soluzione di sublimato all'uno per cento contenente altrettanto acido cloridrico; poi si lavavano ripetutamente con acqua distillata sterilizzata. Essi venivano posti poi, con ogni precauzione asettica, sul tampone inferiore del pallone; un seme per ogni pallone. Iniziativa la germinazione, la radichetta perforava il tampone inferiore e andava a pescare nel liquido sterilizzato, mentre la piumetta si apriva generalmente la via tra il cotone superiore e la parete interna del collo.

La soluzione nutritiva adoperata per queste esperienze aveva la seguente composizione per litro:

Asparagina	gr.	1,00
Solfato di sodio	"	0,30
Fosfato acido di potassio	"	1,00
Solfato di magnesio	"	0,20
Solfato ferroso	"	0,10
Cloruro di manganese	"	0,10
Carbonato di calcio	"	2,00
Cloruro di zinco	"	
Silicato di potassio	}	traccie.

(1) G. Ciamician, e C. Ravenna, *Sul contegno di alcune sostanze organiche nei vegetali* (Memoria I). Memorie della R. Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna, serie 6ª, tomo 5º, pagg. 31 e 41 (1907-08).

L'esperienza si fece da principio con due soli palloni. Essa però diede risultati negativi perchè, pur non essendovi nel liquido tracce di fermentazione ammoniacale, dopo la germinazione, che avveniva in modo regolare, le giovani piantine morivano.

Si ripeté la prova con altri otto palloni, ma l'esito non fu dissimile dal precedente. Sembrava quindi che l'asparagina, pur non danneggiando in alcun modo la germinazione dei semi, non potesse servire come alimento azotato o, per lo meno, che non venisse assorbita per la via delle radici.

Tuttavia pensammo di ripetere l'esperienza partendo però, invece che dai semi, da piantine già sviluppate coltivate in terra. Quelle adoperate, raggiungevano l'altezza di dieci centimetri; esse venivano, appena tolte dal terreno, dopo aver loro recise le radici, poste in vasi contenenti acqua, affinché organizzassero un nuovo sistema radicale in relazione coll'ambiente diverso. Dopo tre o quattro giorni, quando numerose e robuste radici si erano formate, le piantine venivano collocate in appositi recipienti per colture in soluzione acquosa, contenenti il liquido nutritivo della composizione data precedentemente. Per impedire la fermentazione dell'asparagina, siamo ricorsi, in questo caso, agli antisettici. Dopo una lunga serie di prove, adoperando acido salicilico, toluolo, solfato di rame, cloruro mercurico a diverse concentrazioni, abbiamo ottenuto i migliori risultati usando quest'ultimo antisettico alla dose dell'uno per cinquemila. La fermentazione ammoniacale, in tal modo, non si iniziava che dopo due giorni.

Le piante venivano dunque poste, dopo che avevano cacciate le nuove radici, nel liquido contenente la dose accennata di cloruro mercurico. Le soluzioni si rinnovavano ogni due giorni, non senza esserci assicurati, col reattivo di Nessler dell'assenza di ogni traccia di ammoniaca. Contemporaneamente altre piante, che avevano l'ufficio di testimoni, erano state poste, seguendo lo stesso metodo, in soluzione nutritiva della seguente composizione per litro:

NaNO ₃	gr. 1,00
KH ₂ PO ₄	1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25
MgSO ₄	0,20
FeSO ₄	0,10
MnCl ₂	0,10
CaCO ₃	2,00
ZnCl ₂	} tracce
K ₄ SiO ₄	

Pure a questa fu aggiunto uno per cinquemila di sublimato per mettere i testimoni in condizioni, all'infuori della forma dell'alimento azotato, uguali e quelle delle piante in esame.

Ma neppure con questo secondo metodo si poté raggiungere l'intento desiderato. Dopo breve periodo, infatti (circa dieci giorni), le piante alle quali era somministrata l'asparagina, cominciarono ad ingiallire. Poichè i testimoni continuavano invece a vivere senza dar segno di sofferenza, ci sembrò che fosse avvalorata la supposizione fatta dianzi che il sorgo non potesse assorbire l'asparagina per le radici.

Falliti adunque i tentativi descritti, siamo ricorsi ad un metodo che fu già largamente usato e con successo, in altre ricerche (1); quello della inoculazione diretta della sostanza nel fusto.

Le piante venivano, a tal fine, tolte dal terreno e, tagliate le radici, messe in condizioni, mediante l'immersione del colletto nell'acqua, di organizzare rapidamente il nuovo sistema radicale e di esaurire, nello stesso tempo, buona parte dei nitrati immagazzinati; quindi si ponevano in una soluzione nutritiva priva di qualsiasi sostanza azotata contenente per litro:

NaSO ₄	gr.	0,30
KH ₂ PO ₄	"	1,00
MgSO ₄	"	0,20
FeSO ₄	"	0,10
MnCl ₃	"	0,10
CaCO ₃	"	2,00
ZnCl ²	}	traccie.
K ₄ SiO ₄		

Ad alcune piante immerse in detta soluzione, veniva inoculata l'asparagina. A tal uopo, si praticava nel fusto una ferita longitudinale, immediatamente sopra il colletto; in essa veniva introdotta la sostanza da sperimentare finemente polverizzata; quindi si legava il fusto in corrispondenza alla ferita e si chiudeva con paraffina. Si fecero due inoculazioni per ogni pianta, la seconda a distanza di quindici giorni dalla prima, nella quantità di circa mezzo grammo per volta e per pianta. Gli individui inoculati continuarono a svilupparsi normalmente, non accennando alla minima sofferenza. Le analisi si fecero alla distanza di trenta, trentacinque o quaranta giorni dopo che erano state tolte dal terreno, mentre lo sviluppo rigoglioso ci lasciava supporre che le piante avrebbero compiuto regolarmente il ciclo vegetativo.

Era nostro desiderio, perchè i risultati fossero il più possibilmente confrontabili, di fornire anche ai testimoni l'azoto per inoculazione, ma sotto forma di nitrato sodico. I tentativi fatti a tal fine, però, fallirono perchè i soggetti inoculati col nitrato mostrarono subito di soffrire e si seccarono in pochi giorni. Abbiamo perciò dovuto scegliere, per il confronto, delle piante della stessa età e grandezza di quelle sperimentate per l'asparagina alcune

(1) G. Ciamician e C. Ravenna, loc. cit.; ibid. (Memoria II), serie 6^a, tomo 6^o, pag. 109 (1908-09).

delle quali si ponevano, come quelle, in soluzione nutritiva, ma completa; altre venivano tolte direttamente dal terreno.

Per l'analisi, le piante venivano triturate e poste a macerare per ventiquattro ore a temperatura ambiente con circa ugual peso di acqua; il tutto si distillava quindi in corrente di vapore e si raccoglievano, su latte di magnesia, 250 cc. di liquido che si titolavano con nitrato d'argento decinormale, in presenza di alcune gocce di cromato di potassio.

I risultati ottenuti dall'analisi furono i seguenti:

Numero d'ordine	PIANTE CON ASPARAGINA				PIANTE TESTIMONI			
	Durata della esperienza in giorni	Peso in grammi	Ag NO ₃ $\frac{N}{10}$ c. c.	HCN per cento	Peso in grammi	Ag NO ₃ $\frac{N}{10}$ c. c.	HCN per cento	
1	30	124	6,5	0,0141	90	7,6	0,0228	
2	30	180	9,4	0,0141	143	9,1	0,0172	
3	35	129	5,5	0,0115	139	15,1	0,0293	
4	35	220	7,3	0,0089	202	14,5	0,0194	
5	35	138	4,7	0,0092	159	16,1	0,0273	
6	35	184	6,8	0,0100	181	12,2	0,0182	
7	40	72	2,0	0,0075				

La pianta della prova 7, per causa traumatica si seccò nella parte superiore e cacciò due nuovi getti. Non fu quindi possibile avere il testimone.

Dalle analisi esposte, appare dunque che nelle piante di sorgo a cui fu somministrata l'asparagina come alimento azotato, l'acido cianidrico ha subito una forte diminuzione. Riteniamo che la sostanza inoculata sia stata utilizzata dalle piante perchè non ci sembra verosimile che abbiano potuto vivere per tanto tempo e con uno sviluppo realmente rigoglioso, a sole spese delle proprie riserve in nitrati.

Sembrirebbe perciò non priva di fondamento la supposizione fatta, che dai nitrati si giunga alle sostanze proteiche per gli stadi intermedi, prima dell'acido cianidrico, poi delle sostanze amidate. Si avrebbe quindi una nuova prova che l'acido cianidrico rappresenti realmente il primo composto organico che si origina nella sintesi delle sostanze azotate.

A conferma dei risultati ottenuti insisteremo però su tali ricerche mediante esperienze su più larga scala e non sembra impossibile che si possa giungere ad ottenere del tutto prive o quasi di acido cianidrico, piante normalmente cianogenetiche.