

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIV.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

Fisiologia vegetale. — *Influenza del fosforo e del magnesio sulla formazione della clorofilla* (1). Nota della dottoressa Eva MAMELI, presentata dal Socio GIOVANNI BRIOSI.

Nelle sue importanti ricerche sulla composizione chimica della clorofilla, Willstätter (2) giunse alla conclusione che il pigmento verde delle piante, estratto, sia da foglie fresche, sia da foglie secche, non contiene fosforo, o ne contiene solo minime tracce dovute ad impurezze. Queste tracce, riscontrabili nella *clorofilla greggia* ottenuta col vecchio metodo di estrazione (Kraus e Sorby) generalmente adottato, non si riscontrano invece nella clorofilla purificata mediante il soluto colloidale acquoso (Willstätter). Naturalmente, l'autore non esclude che qualche pianta contenga una sostanza verde fosforata, nè che possa formarsi un prodotto di addizione della clorofilla con composti fosforati; certo è che, secondo i risultati delle sue vaste ed accurate ricerche, sono da confutarsi tanto l'ipotesi della natura lecitinica della clorofilla, sostenuta da Hoppe-Seyler (3), quanto la tesi sostenuta da Stoklasa (4), che cioè non sian possibili senza fosforo la produzione di clorofilla e la formazione di cloroplasti.

Nonostante che Stoklasa abbia ripetutamente confermato le sue ricerche (5), la teoria lecitinica della clorofilla è oggidi fortemente scossa, ed autori quali Marschlewski (6), Tswett (7), Czapek (8) l'hanno già definitivamente abbandonata. L'interessante rivista critica pubblicata recentemente da quest'ultimo

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto botanico della R. Università di Pavia, aprile 1915.

(2) Willstätter R. u. W. Mieg, *Ueber eine Methode der Trennung und Bestimmung von Chlorophyllderivaten* (Ann. d. Chemie, 350, 1), 1906.

(3) Hoppe-Seyler, *Ueber das Chlorophyll* (Ber. d. deut. Chem. Ges. 12, 1555), 1879; *Ueber das Chlorophyll der Pflanzen* (Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 399, an. 1879; 4, 1193, an. 1880; 5, 75, an. 1881).

(4) Stoklasa J. (Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. Wien., 104, 1895); (Ber. d. deut. Chem. Ges. 29, 2761, an. 1896); (Bull. Soc. chim. 17, 520, 1897); (Ann. agron. 23, 79, an. 1897). Ved. anche Griffon: Rev. gén. d. bot. 14, 141, an. 1902.

(5) Stoklasa J., Brdlik V. u. Just J., *Ist der Phosphor an dem Aufbau des Chlorophylls beteiligt?* (Ber. d. bot. Gesellsch. XXXI a) 1908. — Stoklasa, *Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Funktion des Kalis im Pflanzenorganismus* (Zeitschr. f. landw. Versuchswesen, XI, 52), 1908. — Stoklasa, Brdlik u. Ernest, *Zur frage des Pphosphorgehaltes des Chlorophylls* (Ber. d. bot. Ges. XXVII), 1909.

(6) Marschlewski, *Studien in der Chlorophyllgruppe I.* (Biochem. Zeitschr. 10, 131), 1908.

(7) Tswett M., *Ist der Phosphor an dem Aufbau der Chlorophylline beteiligt?* (Ber. d. bot. Ges. XXVI a, 214) 1907.

(8) Czapek I., *Neuere Literatur über das Chlorophyll* (Zeitschr. f. Bot. III, 43), 1911.

sulle moderne ricerche riguardanti la clorofilla, mi esime dal riportare per esteso i dati sperimentali controversi e i particolari sull'importante dibattito.

Mi soffermerò invece a considerare un altro ordine di ricerche riguardanti i rapporti tra fosforo e clorofilla, e cioè quelle che direttamente o indirettamente portarono un contributo alla questione se la nutrizione fosfatica abbia o no un'influenza sulla formazione del pigmento verde.

Il Loew ⁽¹⁾ constatò che, coltivando delle alghe in soluzioni nutritive ricche in ferro, ma prive di fosforo, esse assumono una colorazione giallastra. Inoltre, filamenti di *Spirogyra majuscula*, coltivati in soluzione nutritiva contenente solo nitrato di calcio e solfato d'ammonio, divennero da gialli, di un verde intenso, per aggiunta di solfato di ferro e di fosfato biosodico, mentre per la sola aggiunta di solfato di ferro l'inverdimento non avveniva. L'autore conclude, da ciò, che per le alghe l'acido fosforico è necessario alla formazione della clorofilla.

Si noti, però, che le soluzioni nutritive adoperate in queste esperienze (soluzioni ricche in ferro, o contenenti solo alcuni fra gli elementi necessari allo sviluppo delle alghe) non sono le più adatte per ottenere risultati sicuri e conclusivi sulla questione dell'influenza che un dato elemento esercita sulla vita delle piante.

Servettaz ⁽²⁾ coltivò recentemente l'*Hypnum purum* in soluzioni nutritive sterili diverse. Egli non fa osservazione alcuna sul colore delle piantine nelle soluzioni esenti da fosforo, mentre osserva che, in capo a 15 giorni, tutti i protonemi in culture prive di magnesio avevano una tinta giallo-verdastro, poi morirono; quelli coltivati senza calcio diedero segni di sofferenza dopo un mese, e ingiallirono solo dopo 72 giorni.

Nessun altro lavoro venne pubblicato, almeno per quanto a me consta, nè sulle crittogame clorofilliane nè sulle fanerogame, sino a quello, recente, di Stoklasa, Sebor e Senft ⁽³⁾, che merita una speciale attenzione.

Da culture di *Zea Mais* e di *Polygonum Fagopyrum* — a) in soluzione nutritiva completa; b) in soluzione priva di fosforo; c) in soluzione priva di magnesio — gli autori ottengono i seguenti risultati:

Senza magnesio, le piante di *Polygonum* vivono 70-80 giorni; senza fosforo, 40-50. Dopo 20-30 giorni, le piante in soluzione priva di magnesio erano ben sviluppate; le foglie avevano un bel color verde, e, al microscopio, il tessuto a palizzata era ricco di cloroplasti dal colore verde normale. In

⁽¹⁾ Loew O., *Ueber den Einfluss der Phosphorsäure auf die Chlorophyllbildung* (Bot. Centralbl. 48, 37) 1891.

⁽²⁾ Servettaz C., *Recherches expérimentales sur le développement et la nutrition des mousses en milieux stérilisés* (Annales d. sciences nat. XVII, 111) 1913.

⁽³⁾ Stoklasa, Sebor, e Senft, *Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls* (Beitr. bot. Centralbl., XXX, 167) 1913.

assenza di fosforo, invece, lo sviluppo era più stentato. Le piante erano da principio verdi; ma, dopo 30 giorni, divennero bruno rossastre come se la clorofilla si scindesse per idrolisi, e morirono dopo 40-50 giorni di vegetazione. L'esame microscopico delle foglie, fatto quando esse erano ancora verdi, indicò che le cellule del palizzata erano molto povere di cloroplasti.

Le culture di *Zea Mais* durarono 125-128 giorni se in soluzione completa o in soluzione esente di magnesio; 40-65 giorni se in soluzione esente di fosforo. Nelle piante private del magnesio, il tessuto a palizzata (!) era sviluppato normalmente e ricco di granuli clorofilliani, normalmente verdi; in quelle private del fosforo, il tessuto a palizzata (!) conteneva solo pochi cloroplasti, e il verde delle foglie diventava presto bruno.

Gli autori concludono (pag. 231) che il fosforo fa parte della molecola della clorofilla, e che i cloroplasti non possono formarsi senza di esso.

I risultati suddetti sono, per ciò che riguarda le culture prive di magnesio, in così palese contraddizione con le osservazioni da me fatte e pubblicate sin dal 1911 ⁽¹⁾ (ma non citate dai suddetti autori), che mi parve utile, anzichè limitarmi al pubblicare una Nota puramente critica, ripetere fedelmente le esperienze fatte dagli autori. Mi confermò in questo proposito la considerazione che ben diversa dalla soluzione nutritizia da me usata era quella adoperata dai tre autori su citati, e che qui riporto. Soluzione completa: nitrato di calcio gr. 1; cloruro potassico gr. 0,25; cloruro di sodio gr. 0,02; solfato di magnesio gr. 0,25; fosfato bipotassico gr. 0,50; fosfato di ferro gr. 0,1; silicato di calcio gr. 0,25.

Soluzione senza Mg: i sali precedenti, meno il solfato di magnesio, più solfato potassico gr. 0,25.

Soluzione senza P: come nella soluzione completa, meno i due sali di fosforo, più solfato di ferro gr. 0,01.

Per ragioni diverse, che esporrò in seguito, eseguii anche una seconda serie di culture con soluzioni nutritizie diverse da queste.

Il metodo seguito è lo stesso descritto a pagina 152 del mio precedente lavoro.

Riporto da prima i risultati ottenuti dalle culture fatte con le soluzioni di Stoklasa:

Zea Mais: a) in soluzione completa le piante crescono stentate e pallide; — b) in soluzione priva di magnesio le foglie appaiono leggermente venate di verde, o pallide, o perfettamente gialle, pur restando erette e rigide. Dopo un mese, ogni pianta ha 5-6 foglie, ed è alta 35-40 cm. Alcune foglie presentano grandi macchie antocianiche, e piccole zone antocianiche sono anche sul fusto. Dopo 50 giorni, 1-2 foglie basali sono inaridite; tutte le

⁽¹⁾ Mameli Eva, *Sulla influenza del magnesio sopra la formazione della clorofilla* (Atti della Soc. ital. per il progr. delle scienze, V, 93, an. 1911); e (Atti Ist. bot. di Pavia, XV, 251, an. 1912).

altre (5-8) sono pallidissime, largamente chiazzate di antocianina. L'osservazione microscopica, se non rivela la presenza di un tessuto a palizzata, scoperto dallo Stoklasa nelle foglie di *Zea Mais*, rivela nel mesofillo la presenza di cloroplasti, in grandissima maggioranza gialli; pochi eccettuati, di un verde pallido, sono situati in vicinanza della nervatura mediana. Il loro diametro è di μ 2,22-2,50; — *c*) in soluzione priva di fosforo, dopo 14 giorni il color verde delle foglie appare normale, ed è ben netta la differenza tra queste piante e quelle prive di magnesio, aventi foglie assai pallide. Dopo un mese, la colorazione è in alcune foglie stazionaria, in altre è diventata più intensa; lo sviluppo, il vigore, l'altezza non sono differenti da quelli delle piante prive di magnesio. Pochissima antocianina si osserva sulle foglie; abbondante è sui fusti. Dopo 50 giorni, le foglie più giovani sono ancora verdi: alcune, anzi, sono veramente colorate in verde-scuro; ma ogni pianta ha 4-5 foglie basali inaridite. Tuttavia le restanti non accennano a impallidire neppure dopo un altro mese di soggiorno nello stesso liquido; le piante, naturalmente, non crescono più. L'osservazione delle foglie al microscopio, fatta dopo 50 giorni dalla nascita delle piantine, rivela la presenza di cloroplasti normali per forma e per colore. Dopo un mese, si nota che alcuni di essi appaiono in via di disgregazione: fatto, questo, più che naturale, data l'importanza che ha il fosforo nella costituzione delle sostanze proteiche. I cloroplasti che appaiono interi misurano μ 4,44-6,6.

Polygonum Fagopyrum: *a*) in soluzione completa. In generale le piantine muoiono dopo pochi giorni; quelle che sopravvivono hanno foglie di un verde oscuro e uno sviluppo buono in confronto a quelle senza magnesio, ma non rigoglioso. Altezza 18 cm.; — *b*) in soluzione priva di magnesio. Dopo 20 giorni le piante hanno foglie o pallidissime o di un verde chiaro; sono alte 14-17 cm. ed hanno 3-5 foglie e numerosi boccioli fiorali. Dopo un mese l'intensità del colore non è affatto aumentata. L'esame delle foglie al microscopio rivela la presenza di cloroplasti pallidissimi, molti dei quali lenticolari o quasi filiformi, addossati alle pareti cellulari; — *c*) in soluzione priva di fosforo. Le nove piante che formano questa serie di culture, hanno tutte, dopo 20 giorni, 2-3 foglie di un bel verde scuro, e qualcuna ha fiori sbocciati. Lo sviluppo è più stentato in confronto di quelle senza magnesio, ma l'intensità del colore non accenna a diminuire neppure dopo un mese. L'esame delle foglie al microscopio rivela la presenza di cloroplasti normali per colore e per forma.

I risultati ottenuti, perfettamente opposti a quelli resi noti dallo Stoklasa, e confermantissimi, per ciò che riguarda il magnesio, le mie esperienze precedenti, erano tuttavia poco soddisfacenti, dato lo scarso sviluppo che raggiungevano le piante nella soluzione nutritizia completa: fatto che, per la poca sicurezza degli elementi di controllo, toglieva efficacia alla dimostrazione.

Già un semplice esame dell'elenco dei componenti le soluzioni nutritive adoperate dallo Stoklasa e dai suoi collaboratori conduce alla considerazione che soluzioni siffatte non sono comparabili fra loro nè per la qualità nè per la quantità dei costituenti. La concentrazione delle due prime è infatti del 3,37 ‰; quella della terza, dell'1,78 ‰.

Inoltre, la presenza del fosfato bipotassico e del nitrato di calcio, contenuti nelle due prime soluzioni, provoca la precipitazione di un fosfato di calcio insolubile, che insieme col silicato di calcio, anch'esso quasi insolubile, rende assai inadatte queste soluzioni allo sviluppo delle piante. L'uso del fosfato bipotassico nelle soluzioni nutritive venne seguito anche da Crone (1); ma Takeuchi (2) e Benecke (3) lo sconsigliano, perchè, nel caso da essi criticato, provocava la precipitazione di un fosfato di ferro insolubile. È sempre più opportuno, perciò, l'uso del fosfato monopotassico.

Le soluzioni nutritive adoperate dallo Stoklasa, e contenenti notevoli quantità di sali indisciolti, erano assai torbide, e nel fondo dei recipienti di cultura si aveva ben presto un accumulo di sali precipitati. Era necessario quindi fare un'altra serie di culture con soluzioni nutritive più adatte e comparabili fra loro per la qualità e la quantità dei sali in esse contenuti. Scelsi a questo scopo le soluzioni seguenti, due delle quali avevo già adoperate nel mio precedente lavoro:

Soluzione completa: H₂O gr. 1000; Ca (NO₃)₂ gr. 1; KNO₃ gr. 0,25; K H₂ PO₄ gr. 0,25; (NH₄)₂ SO₄ gr. 0,25; Mg SO₄ gr. 0,25; Fe SO₄ gr. 0,02.

Soluzione esente da magnesio: come la precedente, meno Mg SO₄.

Soluzione esente da fosforo: come la soluzione completa, meno K H₂ PO₄.

Queste soluzioni hanno, sopra quelle usate dallo Stoklasa, i seguenti vantaggi:

1°) quello di avere concentrazioni non eccessive e non troppo diverse da una soluzione all'altra (2,02 ‰ nella prima; 1,77 ‰ nelle altre due;

2°) quello di essere comparabili fra loro, poichè le soluzioni esenti da fosforo e da magnesio differiscono da quella completa solo per la mancanza di un sale. Ciò ho potuto ottenere mediante l'introduzione del solfato d'ammonio, che supplisce alla mancanza dello zolfo allorchè si esclude il solfato di magnesio, ed è un sale che contribuisce moltissimo allo svi-

(1) Crone G., *Ergebnisse von Untersuchungen über die Wirkung der Phosphorsäure auf die höhere Pflanze und eine neue Nährlösung*. Diss., Bonn 1904; Just., 32, 3 A, 11, an. 1905.

(2) Takeuchi T., *Können Phosphate Chlorose erzeugen?*, The bull. of Coll. agric. Tokyo, VII, 425, an. 1907.

(3) Benecke W., *Die von der Cronesehe Nahrsalzlösung*, Zeitschr. f. Bot., I, 235, an. 1909.

luppo degli organi verdi delle piante. Nè la soluzione di Knop, nè quella di Strasburger, presentano questo vantaggio;

3°) quello di non produrre precipitazioni di sali, la cui formazione è per vari aspetti dannosa alla vita delle piante coltivate in soluzioni nutritizie.

Con queste soluzioni ottenni:

1°) sviluppo vigoroso e colorazione verde intensa delle piante in soluzione completa;

2°) sviluppo discreto e foglie a colorazione pallida o quasi completamente eziolate nella soluzione priva di magnesio;

3°) sviluppo ridotto, e colorazione verde intensa delle piante nella soluzione priva di fosforo.

Anche questa serie di esperienze ha dato dunque risultati contrari a quelli esposti nel recente lavoro dello Stoklasa.

CONCLUSIONE.

Da culture di *Zea Mais* e di *Polygonum Fagopyrum* in soluzioni nutritizie prive di magnesio ottenni, come già in esperienze precedentemente pubblicate (¹), piante completamente eziolate o appena debolmente verdi e contenenti cloroplasti anormali per forma e per colore.

Invece, da colture delle stesse specie in soluzioni nutritizie prive di fosforo ottenni piante con intensa colorazione verde e contenenti cloroplasti normali per colore e per forma.

Questi risultati, ripetutamente controllati, sono contrari a quelli recentemente ottenuti dallo Stoklasa, sostenitore della teoria lecitinica sulla costituzione della clorofilla, e concordano invece con i risultati analitici ottenuti da Willstätter e dai suoi collaboratori circa la presenza del magnesio e l'assenza del fosforo nella molecola della clorofilla.

(¹) Mameli E. loc. cit.