

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI  
ANNO CCCXVI.

1919

---

SERIE QUINTA

---

RENDICONTI

---

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

---

VOLUME XXVIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

---

1919

piezza della trasgressione neocarbonifera, che i nostri precedenti studi avevano già esteso alle Alpi Carniche centrali e occidentali, e che è ora dimostrata ininterrotta per lo meno dalla cima Vanscuro nell'alto Comelico fino alle Caravanche occidentali, sopra una lunghezza di oltre cento chilometri, così da acquistare significato fondamentale per la storia geologica del sistema alpino.

Fisiologia vegetale— *Sulla presenza, nelle piante, di composti ematoidi di ferro* <sup>(1)</sup>. Nota III del dott. G. GOLA <sup>(2)</sup>, presentata dal Socio O. MATTIROLO.

Per la ricerca di piccole quantità di sangue non sempre si possono preparare i cristalli di emina, sia per la piccola sensibilità del processo, sia perchè non sempre i materiali ematici in esame sono chimicamente adatti a reagire col cloro in modo da formare di emina.

Si ricorre perciò, ed in ispecie nelle ricerche cliniche, ai processi fondati sulle proprietà perossidasiche del sangue.

Da qualche anno sono stati accolti con favore il metodo di Mayer (o di Utz) fondato sull'uso del sale alcalino di fenolftalina, il quale in presenza di sangue e di  $H_2O_2$  si trasforma in sale di fenolftaleina dalla nota intensa colorazione rossa, e quello di Adler, secondo il quale una soluzione acetica di benzidina in presenza di sangue e di  $H_2O_2$  assume una intensissima colorazione azzurra, probabilmente per la formazione di un chinidrone <sup>(3)</sup>.

Ho voluto verificare sopra i composti ematoidi di ferro nelle piante, il valore dei metodi usati con tanto successo per il sangue.

Più che ricorrere all'uso di soluzioni o di sospensioni in provette ho trovato utile fare assorbire una goccia di materiale in esame da carta da filtro, aggiungendovi poi i reattivi; si aveva così una reazione assai netta e pronta, e si poteva così operare anche su liquidi fortemente colorati. All'acqua ossigenata ho spesso sostituito l'essenza di trementina.

a) Una prima serie di saggi sopra i diversi derivati ferriferi delle piante ebbe costantemente risultato negativo, o talora si notarono reazioni così tenui da potersi considerare negative.

Tali risultati negativi si ebbero sia dal derivato ottenuto operando come nella preparazione dell'emina di Mörner, sia col materiale ottenuto estraendo

<sup>(1)</sup> Lavoro eseguito nel R. Orto botanico di Torino.

<sup>(2)</sup> Pervenuta all'Accademia il 15 agosto 1919.

<sup>(3)</sup> Al valore di queste reazioni per la ricerca del sangue sono state mosse da S. Sartory (Compt. Rend. Soc. biol., Paris 1911, tom. 70, pagg. 961, 993, 1031) alcune obiezioni, delle quali quanto si dirà in queste pagine costituisce in parte una conferma.

le piante con soluzioni alcaline, e quindi di tipo ematinico, sia infine dai derivati dalla fusione con KOH a 200°-220°.

Prove di confronto eseguite su derivati di sangue ottenuti nelle medesime condizioni, - hanno invece dato costantemente risultato positivo.

La netta differenza di comportamento tra i due tipi di composti potrebbe far pensare ad una altrettanto distinta loro costituzione, ciò che sarebbe in contrasto con tutte le analogie precedentemente considerate. Ma tale ipotesi non è attendibile.

Osservo anzitutto che la proprietà perossidica del sangue non è dovuta al legame del ferro con la molecola organica, quale si ritiene esista nell'emoglobina, poichè essa permane anche quando, con la formazione di ematina, si altera tale legame; nè è dovuta all'associazione del gruppo cromoforo con la globina, perchè permane nell'emina, e permane altresì dopo che, col riscaldamento prolungato con KOH a temperatura elevata, si sono disgregati profondamente i gruppi atomici riuniti attorno agli anelli pirrolici.

Del resto, anche i derivati vegetali più volte descritti in queste Note, se riscaldati con KOH al di sopra di 300° C, danno un residuo carbonioso che, spappolato in acqua, reagisce positivamente con benzidina e  $H_2O_2$ .

Questo composto, certamente non più ematoide, che ne risulta, si ricollega al tannato, al solfocianuro e al ferrocianuro di ferro, e a quei composti di ferro tutt'altro che ematoidi, i quali, sotto l'azione di  $H_2O_2$ , ossidano l'idrochinone, il guaiacolo, la benzidina e la fenolftalina (1).

Si hanno cioè nuovi argomenti a convalidare l'affermazione di Bertrand (2) che l'azione perossidica presentata dal sangue non sia dovuta a proprietà peculiari a questo, ma alla presenza di composti di ferro, attivi forse più per il loro stato fisico che non per la loro forma di combinazione.

La mancata analogia di comportamento tra i miei composti ematoidi delle piante e quelli ferriferi del sangue, non ha perciò alcun valore per giudicarne l'affinità.

b) Se si opera non più con preparati ematoidi più o meno puri, ma con frammenti o sezioni di vegetali freschi, si osserva quasi costantemente una reazione positiva che talora è di straordinaria intensità; tale reazione, ma più debole, ha luogo anche con materiali essiccati all'ombra o con succo cellulare spremuto da vegetali freschi stati sottoposti all'azione dei vapori di etere o di cloroformio, o con estratti di piante secche, e trattate con soluzione diluita di  $NH_3$ , o con acqua, nella quale sia stata disciolta un po' di piridina; si verifica spesso anche dopo azione dell'acqua bollente e dopo permanenza per più giorni in formalina.

(1) Stoecklin E., Compt. Rend., Paris 1908, tom. 147, pag. 1489; 1911, tom. 152, pag. 1586

(2) Bertrand et Ragozinski, Compt. Rend. 1919, tom. 152, pag. 148.

All'incontro, il trattamento con acidi (soluz. acquosa di acido acetico o di HCl; alcool acido per acido acetico, soluzione picrico-alcoolica), spesso annulla in pochi minuti le proprietà in discorso sia nell'estratto, sia nel tessuto vegetale così trattato. Così pure una leggera acidificazione del liquido ammoniacale o piridico, che pur dava prima reazione positiva, esercita azione inibitrice o rallentante sulla reazione ossidante.

Si tratta qui evidentemente di una perossidasi. Di tali enzimi è infatti nota la particolare resistenza verso il calore e verso alcuni agenti, quali la formaldeide, che sono esiziali ad altri enzimi. A dirimere ogni dubbio vale poi la coincidenza delle reazioni di Mayer e di Adler con le note reazioni all'idrochinone, al guaiacolo, all'acido pirogallico ecc.

È anzi da rilevare come il reattivo alla benzidina sia assai migliore e più sensibile di tutti quelli finora proposti per le ricerche delle perossidasi; l'intensità della colorazione da esso determinata, la persistenza di essa per un tempo abbastanza lungo per permettere un accurato apprezzamento dei risultati, consigliano a considerarlo come il reagente più adatto per studiare la localizzazione di tali enzimi nelle piante.

Ho già altra volta studiato a lungo ossidasi e ossigenasi nelle piante palustri, ed alcuni controlli eseguiti col nuovo reattivo mi hanno permesso di confermarne e di affinarne i risultati. Così nella *Lemna minor* e nella *polyrrhiza* la perossidasi è abbondantissima nelle cellule della pagina inferiore a contatto con l'acqua, e nelle radici; nelle radici di *Cicuta virosa* l'enzima è presente nelle cellule sottoepidermiche e specialmente presso le bozze delle nuove radici, nonché nelle pareti delle lacune; nei canali aeriferi delle foglie di *Nelumbium speciosum* le pareti di tali lacune e le superficie dei numerosi peli che la tappezzano contengono perossidasi. Nella *Cicuta* come nel *Nelumbium*, nella *Nymphaea* come nel *Potamogeton crispus*, la parte liberiana dei fasci è pure ricca di perossidasi.

In piante terrestri (radici di *Astragalus aristatus*, rami di *Cellis australis* e di *Sorbus Aucuparia*, cauli di *Polygonum cuspidatum* e culmi di graminacee, picciuoli di felci e stami di campanule), troviamo, pur lasciando da parte fatti particolari che verranno trattati in altra occasione, due ordini di localizzazione delle perossidasi: l'una periferica nelle cellule sottoepidermiche delle cortecce, in quelle dei giovani germogli di *Avena planiculmis*, e dei cauli del *Polygonum cuspidatum*; l'altra assile rappresentata dalla porzione liberiana dei fasci fibrovascolari e dai raggi midollari del tessuto legnoso.

Nei tessuti giovani può anche essere interessato il tessuto fondamentale (germogli di *Avena planiculmis*, cauli di ciperoidi); e appartengono a manifestazioni del tessuto fondamentale le lievi reazioni di perossidasi presentate dal midollo di alcune specie legnose, e dai raggi midollari.

Un più minuto esame alle singole cellule portatrici di perossidasi ne fa rilevare la presenza non tanto nel plasma cellulare quanto nella mem-



brana: e in queste con particolare preferenza, a quanto sembra, nella lamella mediana; ciò ho potuto constatare con particolare nettezza nella *Lemna* e nel *Sorbus Aucuparia*. Una conferma di tale localizzazione nelle membrane si ha nel fatto che il succo cellulare estratto per pressione, secondo il metodo Giglioli, dopo narcosi cloroformica, fornisce un materiale assai povero di enzima, mentre il rendimento è assai maggiore se il residuo della pressione viene trattato con soluzione assai diluita di  $\text{NH}_3$  <sup>(1)</sup>.

Conchiudendo, farò rilevare l'uniformità, in un grandissimo numero di piante, dei due tipi di localizzazione di tali enzimi, l'una periferica (periferia dell'organo, periferia della singola cellula), l'altra di conduzione lungo il sistema liberiano e lungo i raggi midollari.

Le perossidasi sono assai scarse nei tessuti verdi.

Se, partendo per es. dal *Polygonum cuspidatum*, mediante estrazione con  $\text{NH}_3$  diluita e precipitazione con tartrato acido di potassio si prepara del materiale di tipo ematinoide, e lo si purifica con successive dissoluzioni e riprecipitazioni, si osserva che, mentre le soluzioni madri si vanno facendo sempre più povere di perossidasi, il precipitato ematinoide conserva in grado notevole la proprietà di agire come ossidante con i perossidi, specialmente se prima del saggio venne neutralizzata l'acidità con vapori di  $\text{NH}_3$ .

Con l'essiccamento, in specie se prolungato e avvenuto in mezzo acido, le proprietà perossidasiche si attenuano e si annullano.

c) Quali sono dunque le relazioni tra i composti ematoidi e le perossidasi nelle piante?

Operando mediante precipitazione frazionata con alcool sul succo cellulare ottenuto per narcosi e pressione, oppure operando con alcool su estratti alcalini di vegetali, o acidificando frazionatamente gli estratti alcalini, mai ho ottenuto precipitati aventi proprietà perossidasiche, e privi di ferro.

Io sarei pertanto portato ad accostarmi alla nota ipotesi di Bertrand, secondo la quale la proprietà degli enzimi perossidanti sarebbe dovuta al ferro; mi verrei così ad allontanare dall'altrettanto conosciuta ipotesi di Bach, il quale ritiene l'attività enzimatica indipendente dall'elemento metallico. Ma astenendomi per ora dall'emettere giudizi sul problema della costituzione e della fisiologia delle perossidasi nelle piante, che spero di trattare un'altra volta, io ritengo che si possa spiegare altrimenti il comportamento dei vegetali rispetto ai perossidi e al loro contenuto in composti ematoidi.

Studiando altre volte i composti di ferro nelle piante palustri, ho dimostrato esistere nelle piante stesse diverse forme di combinazione del ferro, variabili da alcuni tannati, evidentemente formati per combinazione del

(1) Anche la reazione del guaiaacolo, del resto, malgrado la sua scarsa sensibilità e la tendenza del reattivo a riunirsi in goccioline, allorchè si aggiunge  $\text{H}_2\text{O}_2$  fa rilevare, sebbene con difficoltà, la presenza di perossidasi nelle membrane.

tannino col ferro del limo circostante, a composti di origine completamente cellulare, aventi il ferro labilmente legato alla molecola organica, fino a composti aventi tale elemento assai stabilmente legato, tanto da non essere riconosciuto che dopo incinerazione della sostanza organica.

Ora, se si fanno bollire per qualche tempo delle lemne, o delle foglie di *Nuphar* con HCl diluitissimo, si ottiene una soluzione attivissima come perossidasi e che non è certo un enzima; i tessuti che ne residuano contengono ancora ferro di tipo ematoide, che si lascia estrarre, almeno in parte, mediante  $\text{NH}_3$  o con soluzione alcoolica di acido picrico.

All'incontro, se con ripetuti trattamenti con  $\text{NH}_3$  si cerca di estrarre i composti di ferro, rimane sempre nel tessuto vegetale, un residuo insolubile negli alcali diluiti, che reagisce intensamente con i perossidi e ricco di ferro.

Io ho altresì cercato di incinerare delle sezioni o delle intere piantine di *Lemna*, o delle sezioni di rami di *Sorbus Aucuparia*, con la maggiore delicatezza, in modo che il residuo minerale rimanesse così poco alterato da riprodurre ancora la primitiva struttura del tessuto vivente. Ponendo poi tali residui su un portaoggetti in una soluzione diluita di celloidina, che poi si fa indurire, si ha, dopo evaporazione dei solventi, un materiale che sopporta abbastanza bene l'azione di una soluzione diluita di HCl e di ferrocianuro di potassio. Ripetendo molte volte i saggi, si può cogliere la localizzazione del ferro almeno delle maggiori concentrazioni ferrifere, e, tenendo presente la localizzazione delle perossidasi, si può constatare l'identità dello due localizzazioni.

A mio avviso è perciò da ritenere che nelle piante la funzione perossidica sia nel maggior numero dei casi sostenuta, oltre che da veri e propri enzimi, anche da combinazioni svariate di ferro, probabilmente prodotti di catabolismo dei composti più elevati e complessi, quali quelli ematoidi, combinazioni per la maggior parte incrostanti le membrane cellulari, e che per il loro stato fisico, sono atte ad agire tra le sostanze ossidabili ed i perossidi (1).

Che lo stato fisico debba avere importanza in ciò, lo dimostra la perdita delle proprietà perossidasiche che ha luogo con l'essiccamento; oltre i fatti già citati, posso ricordare che il tannato di ferro della *Trapa natans*, di fresco ottenuto, è attivo, mentre perde ogni attività dopo qualche anno di essiccamento.

(1) Il comportamento di tali composti ferriferi rispetto agli acidi forti, l'aumento della capacità a reagire quanto meno il ferro è ionizzato, e specialmente l'aumentare in quei composti nei quali non sostituisce più nella molecola organica i ioni H, fanno rientrare questi nel gruppo dei composti che si possono denominare pseudoperossidasi considerate da Colin e Senechal (Rev. Gen. de Bot. 1912, T. XXIV, pag. 49).