

EDMONDO HONSELL

**RICERCHE SULLA DIGESTIONE
NEGLI ASCIDI DELL' *UTRICULARIA VULGARIS* L.**

SOMMARIO

- I. Storia critica dell' argomento.
- II. Materiale e metodo.
- III. Genesi e struttura delle ghiandole dell' ascidio.
- IV. Ricerche sulla fisiologia dell' ascidio
 - a) Destino delle prede
 - b) Natura della digestione
 - c) Gli enzimi che determinano la digestione
- V. Discussione sui risultati e conclusioni.
Bibliografia.
Riassunto.

EDMONDO HONSELL

**RICERCHE SULLA DIGESTIONE
NEGLI ASCIDI DELL' *UTRICULARIA VULGARIS* L.**

Fino ad oggi sono stati pubblicati molti lavori concernenti l' *Utricularia vulgaris* L. e le numerose specie congeneri, ma la quasi totalità di essi è di carattere morfologico, mentre ben poco nota è la fisiologia di queste piante, soprattutto rispetto al loro adattamento carnivoro. Numerosi infatti sono i problemi insoluti sulla fisiologia della cattura delle prede ma in special modo su quella della loro digestione e dell'assorbimento dei prodotti digeriti.

Col presente lavoro ho cercato di contribuire, almeno in parte, ad una migliore conoscenza di alcuni di questi quesiti, soffermandomi specialmente sulla natura della digestione e sulla secrezione enzimatica della pianta.

1) STORIA CRITICA DELL' ARGOMENTO.

Lo studio delle diverse specie del genere *Utricularia* si è sempre presentato molto difficoltoso e numerosi sono stati gli errori di interpretazione. Basti pensare che solo recentemente è stata detta l'ultima parola sul funzionamento meccanico dell'apparecchio di cattura, e che gli ascidi vennero ritenuti, per quasi cinquant'anni, come organi di galleggiamento (DE CANDOLLE, 1832). Soltanto negli ultimi decenni del secolo scorso, ad opera principalmente di KOHN (1875), DARWIN (1875) e GOEBEL (1891), l' *Utricularia* venne riconosciuta come una vera e propria pianta carnivora, e in seguito, per gradi (BROCHER 1911, CZAJA 1924 e LLOYD 1929), si giunse a chiarire la modalità della cattura delle prede. E' questo un fenomeno puramente meccanico ed idrodinamico, i cui fattori principali sono una « *pressione negativa* » nell'interno dell'ascidio e un « *equilibrio instabile* » al quale è sottoposta la valvola.

La rottura di quest' ultimo viene provocata da un qualsiasi movimento impresso ad una delle quattro setole della valvola (sia questo prodotto da un animaletto che si aggiri intorno all'imboccatura, o in qualunque altro modo) e determina l'apertura della valvola stessa con la conseguente formazione di una corrente di acqua verso l'interno dell'ascidio, corrente che succhia in quel momento tutto ciò che si trova davanti all'imboccatura. Dato che ciò può avvenire un numero indefinito di volte, deve esistere un meccanismo capace di ristabilire in breve tempo, dopo ogni cattura, le condizioni necessarie alla funzionalità dell'ascidio. Essendo queste condizioni, come si è detto sopra, la *chiusura ermetica della valvola* e la *pressione negativa interna*, la conoscenza del modo nel quale esse si attuano ci spiegherà chiaramente il funzionamento dell'ascidio. Gli studi morfologici di LLOYD (1929) sulla valvola e la sua scoperta del « *velum* » ci hanno permesso di capire perchè la valvola riprende la sua posizione di riposo subito dopo la cattura e perchè la sua chiusura è ermetica.

Molto più complesso si presenta invece il problema della *pressione negativa interna*. Essa non può essere dovuta che all'espulsione di gran parte dell'acqua contenuta nell'ascidio, espulsione che deve avvenire necessariamente attraverso le sue pareti. NOLD (1934) tentò di spiegare questo fenomeno e cercò di localizzare le parti della parete dell'ascidio nelle quali esso avviene: si valse del principio secondo il quale, se ha luogo una corrente di acqua attraverso una membrana, si noteranno delle diverse differenze di potenziale sulle due superfici interna ed esterna. Nel caso della parete dell'ascidio dell'*Utricularia*, dopo aver fatte numerose misurazioni, constatò che si aveva differenza di potenziale soltanto fra le parti prive di cuticola, cioè fra le superfici delle ghiandole interne e di quelle esterne. Egli inoltre mise in rapporto le differenze di potenziale osservate, con le differenze del pH sulle superfici in questione ed ammise che a queste potrebbe essere dovuta la formazione di una corrente di acqua. A ciò dobbiamo fare però delle obiezioni, e cioè che non si può paragonare la parete dell'ascidio ad una membrana semipermeabile, e di conseguenza non si possono applicare ad essa le relative leggi fisiche e chimico-fisiche. Noi ci troviamo di fronte ad una parete viva e vitale, formata da due strati di cellule, con numerosi elementi ghiandolari che indubbiamente sono la sede di tutti i fenomeni fisiologici riguardanti la digestione e l'assorbimento, ma che presentano dei complessi meccanismi chimici, chimico-fisici e fisici gli uni collegati agli altri, e in rapporto con l'attività vitale di tutta la pianta.

KRUCK (1931), a conclusione delle sue ricerche coi coloranti vitali affermò, d'accordo con NOLD, che il passaggio dell'acqua ha luogo attraverso le ghiandole dell'ascidio, interne ed esterne. Dichiarò pure di aver potuto seguire questo passaggio, ma dato che nel suo lavoro non dà sufficienti particolari nè sulla tecnica usata, nè sulle singole osservazioni fatte, sono piuttosto restio ad accettare quest'ultima affermazione, tanto più che in esperienze da me fatte, non ho mai potuto seguire il percorso del colorante, in quanto esso si concentra dapprima soltanto nelle cellule delle ghiandole, e poi, in seguito ad un trattamento prolungato, tutte le cellule si colorano uniformemente.

Per quanto concerne infine la digestione delle prede e l'assorbimento dei prodotti derivati dalla loro idrolisi, pochi e discordanti nei risultati, sono i lavori pubblicati fino ad oggi. Le prime osservazioni in questo campo sono di DARWIN (1875), COHN (1875) e TREAT (1875). Essi constatarono che le prede catturate vengono disciolte, ma in seguito ad alcune esperienze di DARWIN, si ritenne che la digestione fosse soltanto di natura batterica, fatto del resto, noto anche per altre piante carnivore. Lo stesso Autore fece pure delle osservazioni sull'azione assorbente delle ghiandole, ma non approfondì queste ricerche.

SCHIMPER (1882) notò nelle « braccia » delle ghiandole interne degli ascidi dell'*Utricularia cornuta* caratteri particolari del citoplasma, in rapporto allo stato di digiuno o di nutrizione della pianta e paragonò questo fenomeno con l'*aggregazione citoplasmatica* vista da DARWIN nella ghiandole della *Drosera*.

GOEBEL (1891) fece presenti le difficoltà sperimentali per lo studio dell'azione digestiva degli ascidi, dovute soprattutto alle piccole dimensioni dei medesimi e all'ambiente acquatico in cui vive la pianta e, in base agli stretti rapporti genetici esistenti tra l'*Utricularia* e la *Pinguicula* e le altre *Lentibulariaceae*, ritenne di dover includere la pianta in questione tra quelle capaci di secernere enzimi digestivi. Nella *Pinguicula* (COLLA 1937), in seguito, fu dimostrata l'esistenza di un'attiva secrezione di enzimi, non soltanto proteolitici, ma anche amilolitici e lipolitici.

GOEBEL constatò ancora, che nell'interno delle ghiandole sono presenti goccioline di grasso.

Un allievo del GOEBEL, il LUETZELBURG (1910) cercò di chiarire la natura della digestione, analizzando l'estratto in glicerina di un gran numero di ascidi, dopo averli spappolati con sabbia di quarzo pulita. Questo estratto aveva una debolissima azione enzimatica sulle proteine, specialmente in mezzo alcalino, e conteneva una

piccola percentuale di acido benzoico. Esso inibiva, inoltre, lo sviluppo dei batteri. Ricerche analoghe, ma più complete, vennero fatte da ADOWA (1925), il quale concluse che, sia negli estratti di ascidi, sia in quelli di tutte le altre parti della pianta, sono sempre presenti enzimi proteolitici.

Queste ultime ricerche non risolvono però la natura della digestione: questa infatti ha luogo nell'interno degli ascidi e la tecnica usata non permette di stabilire se l'azione idrolitica degli estratti è dovuta ad enzimi endocellulari presenti nelle cavità dell'ascidio e prodotti dalla pianta o ad enzimi di origine esterna (batteri, ghiandole digestive degli animalletti catturati, ecc.).

Altri Autori, e precisamente KIESEL (1924) e STUTZER (1926), negano che negli ascidi abbia luogo una secrezione di enzimi: le prede verrebbero disciolte dalla flora batterica sempre presente nell'ascidio. Infatti, afferma KIESEL, raccogliendo con una pipetta il fluido contenuto nell'ascidio e conservandolo sotto toluolo, si può constatare facilmente che esso ha azione digestiva sulle proteine. STUTZER studiò i batteri presenti nell'interno dell'ascidio, e per far ciò, dopo aver lavato con soluzioni sterili, spappò gli ascidi e seminò su agar il prodotto ottenuto. Si formarono numerose colonie di batteri, fra le quali dominanti quelle del *Bacterium coli*: in genere le specie osservate furono le stesse normalmente presenti nell'intestino degli insetti catturati.

Per quanto mi consta, non esiste alcun altro lavoro su questo argomento. Le discordanze dei risultati ottenuti dipendono soprattutto dalle difficoltà sperimentali, che sono notevoli, essendo necessario operare sempre su piccolissime quantità di materiale e in difficili condizioni di ambiente, dato che tutte le specie di *Utricularia* a noi più accessibili sono piante acquatiche.

2. MATERIALE E METODO.

Le piante sulle quali ho sperimentato appartengono tutte alla specie *Utricularia vulgaris* L. e provengono dal laghetto craterico degli Astroni (Campi Flegrei), stazione scoperta recentemente da MEROLA (1948). In precedenza, era stata indicata un'altra stazione, sempre nei dintorni di Napoli, lungo il corso del Sebeto in località Pascone, ma pare che da qui questa entità sia completamente scomparsa, forse a causa delle profonde modificazioni subite negli ultimi decenni da questa regione, in seguito all'estendersi della zona industriale. Ricorderò ancora che il laghetto degli Astroni è, per l'*U. vulgaris*, la stazione più meridionale della Penisola.

Nella primavera del 1948 introdussi un certo numero di tali piante nell'Orto Botanico di Napoli, coltivandole sia in vasche, associate con altre piante acquatiche, sia in recipienti di vetro. Nell'estate lo sviluppo fu molto stentato, tanto che disperai della sopravvivenza delle piante raccolte. Quelle coltivate nei vasi di vetro lentamente degenerarono e pure gli individui delle vasche scomparvero alla fine dell'estate, dopo aver sviluppato però un certo numero di gemme ibernanti, che, nella primavera successiva, germogliarono: le piante raggiunsero uno sviluppo rigoglioso e fiorirono abbondantemente. Lo stesso si ripeté negli anni successivi a conferma di un loro perfetto adattamento a questo nuovo ambiente, di certo molto diverso da quello originario.

Dalle vasche prelevai man mano il materiale necessario alle mie ricerche, trasferendo le singole piante in recipienti di vetro, dove continuavano, almeno per un certo tempo, a svilupparsi regolarmente. Mi fu così più facile osservare la funzionalità dell'ascidio, ma dovetti adottare dei metodi particolari di studio, dato che i fenomeni digestivi e di assorbimento, oggetto del presente lavoro, avvengono nell'interno degli ascidi che, se funzionanti, sono ermeticamente chiusi.

Dovetti quindi, prima di tutto, trovare un metodo per introdurre in essi, senza produrre loro alcuna lesione, le sostanze che mi avrebbero permesso di indagare su questi fenomeni.

Per le sostanze solide usai il seguente sistema: le ridussi a piccole dimensioni, in forma di filamenti lunghi da 5 a 10 mm, con una sezione trasversale tale che potessero entrare facilmente nell'ascidio attraverso la sua imboccatura e cercai di ripetere ad arte le condizioni necessarie affinché venissero *catturate* come una qualunque altra preda. Strette ad una estremità da una pinzetta a punte molte sottili, agitavo queste sostanze nell'acqua, davanti all'ascidio, facendo in modo che con l'estremità libera urtassero una delle quattro setole della valvola: lo scatto così provocato era sufficiente a farne penetrare almeno una parte. Dopo di ciò tagliavo con un piccolo bisturi la porzione ancora sporgente e con un ago ne spingevo la parte catturata nell'interno, in modo che la valvola potesse nuovamente richiudersi. Naturalmente, per le piccole dimensioni del materiale, dovetti usare sempre un microscopio binoculare con ingrandimenti da 10 x a 30 x.

Per introdurre dei liquidi facevo catturare l'estremità molto sottile di una pipetta contenente la sostanza, la quale veniva iniettata subito dopo.

Per osservare quindi le ghiandole della parete interna staccavo gli ascidi dalla pianta, tagliavo il loro peduncolo e, dopo averli asciugati esternamente su carta da filtro, li appoggiavo su di un vetrino portaoggetti con l'imboccatura verso il basso, sostenendoli in questa posizione per mezzo di una pinzetta con le punte leggermente divaricate; quindi, con una lama molto tagliente, li sezionavo in senso longitudinale in due parti uguali. Data la forma dell'ascidio, le due metà così ottenute sono press'a poco emisferiche, per cui, ponendo una di esse sopra un vetrino, con la parte convessa, esterna, verso il basso e ricoprendola con un coprioggetti, facendo attenzione a non schiacciarla, è possibile vedere le ghiandole interne in posizioni diverse, e cioè quelle della porzione centrale, dall'alto, quelle marginali di lato.

Per raccogliere il fluido interno degli ascidi, li staccavo dalla pianta, li asciugavo esternamente con carta da filtro e quindi, o li sezionavo come sopra in un vetrino di orologio, o con una sottile pipetta ne foravo la parete aspirandone il contenuto.

Nelle mie ricerche ho usato i seguenti metodi analitici e relativi reagenti:

Ninidrina (trichetoindrindene idrato) - facendone bollire una soluzione al 0,2% con aminoacidi, polipeptidi e protidi si ha una colorazione che varia dal roseo-violetto al bleu, a seconda della sostanza in esame.

Metodo della capillarizzazione di GRUSS - Serve per la determinazione qualitativa degli enzimi. Su cartine imbevute di reagenti specifici si pone una goccia della sostanza in esame; dopo una permanenza in camera umida per 24 ore, in presenza di qualche cristallino di timolo, trattando con determinati reagenti si ottengono colorazioni particolari. Usai le seguenti cartine:

a) cartina all'albumina. Trattata con NaCl al 5% e successivamente immersa in nigrosina, si colora in nero intenso nei punti in cui l'albumina non è stata idrolizzata. Le porzioni scolorate dimostrano la presenza di proteasi.

b) cartina al peptone: Trattata con acido fosfowolframico al 1% e immersa in metilorange, si colora nei punti dove il peptone non è stato idrolizzato. Aree scolorate dimostrano la presenza di polipeptidasi.

c) cartina all'olio di mandorle. Se la reazione è positiva si deve formare un alone intorno alla goccia di liquido in esame. Rivela la presenza di lipasi.

d) cartina all'amido. Trattata con iodo-ioduro potassico si colora in bleu: aree scolorate dimostrano la presenza di amilasi.

Colorazione vitale col rosso neutro: iniettando negli ascidi soluzioni di rosso neutro in acqua al 0,1% e osservando dopo una ventina di minuti si nota che il colore si è concentrato nei vacuoli delle ghiandole.

Infine, per studiare l'anatomia delle ghiandole, il loro sviluppo e la loro formazione, eseguii sezioni in serie di apici vegetativi fissati sotto vuoto (1) col liquido di Karpetschenko e imparaffinati con normali metodi di tecnica microscopica. Colorai le sezioni con ematossilina Delafield.

3. GENESI E STRUTTURA DELLE GHIANDOLE DELL'ASCIDIO.

L'ascidio dell' *Utricularia* è omologo, come è noto, ad una lacinia fogliare. Esso ha origine da un abbozzo che presenta un'invasinazione alla sua estremità distale, leggermente spostata in senso ventrale, che diviene sempre più profonda col progredire dello sviluppo. L'ascidio, molto precocemente è ben caratterizzato nella sua costituzione. La sua parete, salvo che intorno alla imboccatura, è costituita da due soli strati di cellule, omologhi e con eguale struttura. Entrambi portano ghiandole, molto numerose, ma di aspetto leggermente diverso (figg. 1-2-3-4), quantunque le prime fasi della loro formazione siano identiche (fig 5).

In origine, le cellule dei due strati, molto piccole, cilindriche, sono indifferenziate (fig. 5, a). Successivamente, un certo numero di esse, di solito una ogni tre-cinque, si allunga e la sua parte distale fuoriesce dalla superficie dello strato, formando una lieve protuberanza (fig. 5, b). Ognuna di queste cellule si divide quindi trasversalmente, in modo tale che la nuova parete divisoria si trovi a livello della superficie dello strato (fig. 5, c-d). La cellula inferiore diventerà la *cellula basale* (fig. 3-4, a) della ghiandola, mentre l'altra, suddividendosi a sua volta, sempre trasversalmente, darà origine alla *cellula intermedia* (fig 3-4, b) e ad un'altra cellula da cui si formeranno, in seguito a due divisioni longitudinali, le quattro braccia (fig. 4, c) presenti in tutte le ghiandole della superficie interna dell'ascidio. Di queste, due sono più lunghe, rivolte in un senso, le altre due più corte, rivolte nel senso opposto. La

(1) Dato che i tessuti dell' *Utricularia* sono ricchi di spazi aeriferi (fatto comune a tutte le piante acquatiche) è necessario adottare questo procedimento, per eliminare del tutto l'aria contenuta in essi, e per permettere una rapida ed efficace fissazione.

porzione prossimale di queste quattro cellule forma un breve, sottile peduncolo, che poggia sulla superficie superiore della *cellula intermedia* della ghiandola. Queste quattro cellule sono prive di cuticola.

Nelle ghiandole dello strato esterno, la cellula superiore, non si divide in quattro cellule, ma solo in due, che assumono una forma quasi emisferica (fig. 3, c). Pure queste non hanno cuticola.

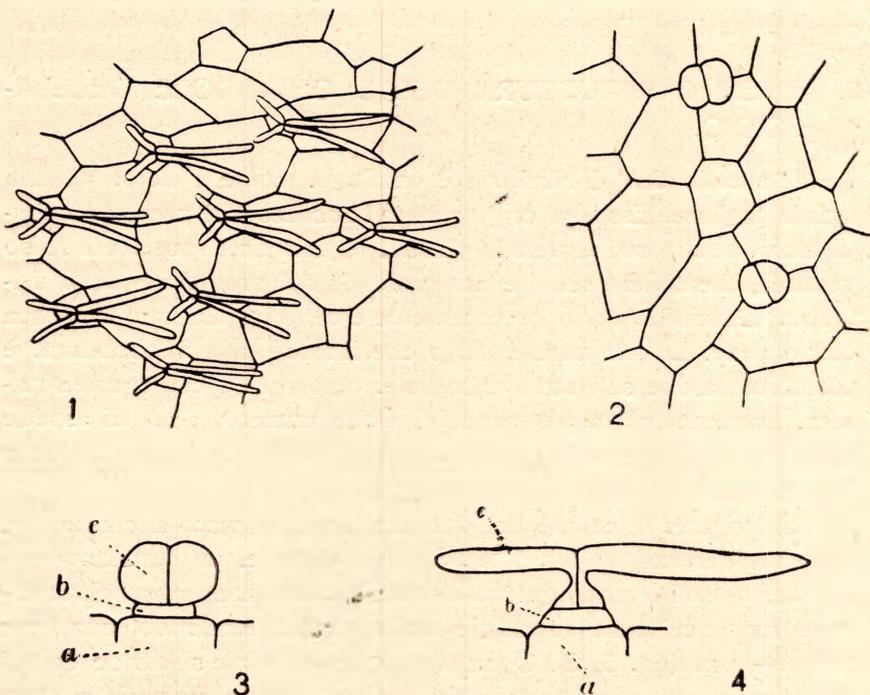


Fig. 1-4. — Fig. 1. Superficie interna dell'ascidio con ghiandole assorbenti-secermenti. — Fig. 2. Superficie esterna dell'ascidio con le ghiandole secermenti acqua. — Fig. 3. Ghiandola della superficie esterna. — Fig. 4. Ghiandola della superficie interna. a) cellula basale, b) cellula intermedia, c) cellule distali.

4. RICERCHE SULLA FIOLOGIA DELL' ASCIDIO.

Le scarse conoscenze che oggi abbiamo su alcuni problemi di fisiologia dell'ascidio e le contraddizioni esistenti fra i punti di vista espressi su identici argomenti da Autori diversi, mi hanno indotto a studiare questa pianta, rivolgendo la mia ricerca particolarmente su tre problemi, e cioè sul *destino delle prede catturate*, sulla *natura della digestione* e sugli *enzimi che la determinano*. In un successivo lavoro, raccoglierò le osservazioni, ancora incom-

plete, sulla *fsiologia delle ghiandole interne degli ascidi*, e precisamente sulle modificazioni del sistema vacuolare delle loro cellule distali durante la digestione.

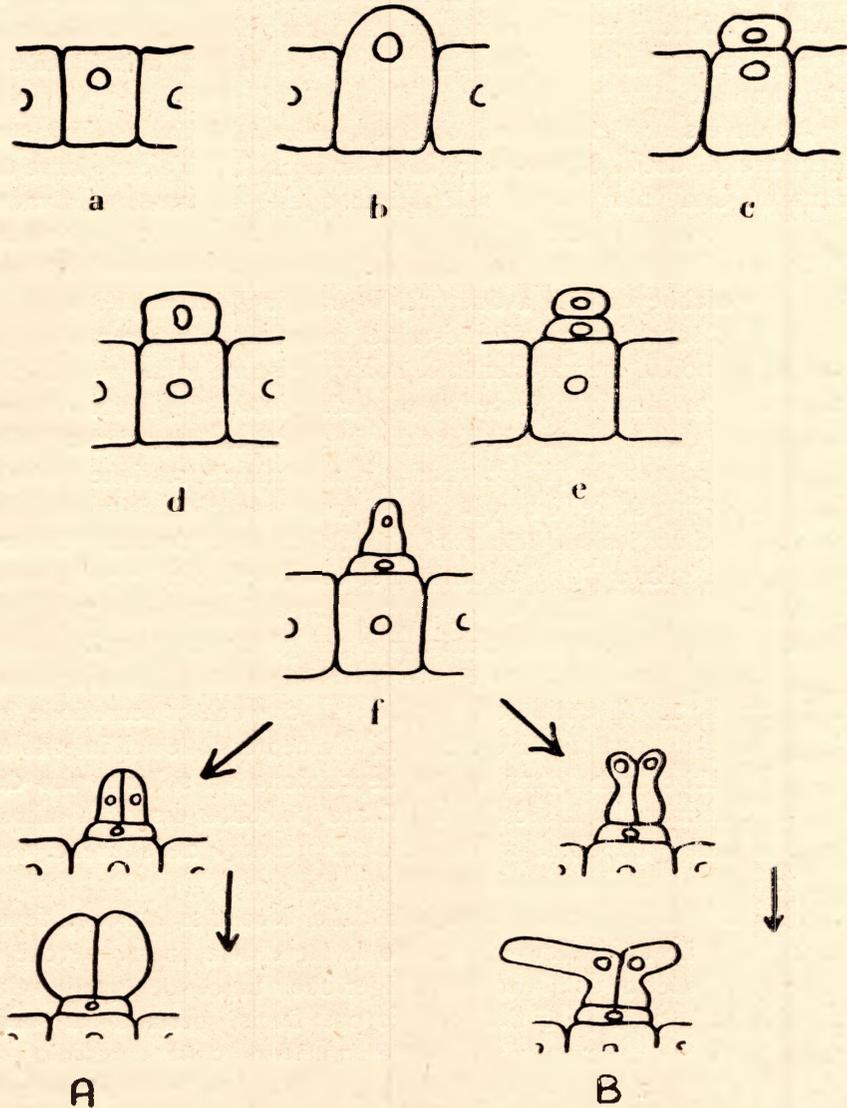


Fig. 5. - Ontogenesi delle ghiandole della superficie interna ed esterna dell'ascidio; *a, b, c, d, e, f*, stadi comuni di due tipi di ghiandole; *A* ghiandola esterna, *B* ghiandola interna.

a) DESTINO DELLE PREDE.

Esaminando numerose piante di *Utricularia* è facile vedere che i loro ascidi contengono quasi sempre i resti di animaletti acquatici, per lo più larve di zanzara o minuscoli crostacei, e che

i più ricchi di prede sono sempre i più vecchi, cioè quelli più lontani dall'apice vegetativo, mentre i giovanissimi ne sono sempre privi. Ciò dimostra che l'unico limite alla capacità di cattura è posto nel fattore tempo; infatti, in certi casi, è stato possibile contare in un ascidio le spoglie di un numero elevato di animali catturati, fino ad oltre venti.

Non essendo riuscito ad osservare animaletti vivi nell'interno degli ascidi, decisi di provocare io stesso la cattura di alcune larve di zanzara. Una volta entrate nell'ascidio queste si muovono vivacemente cercando di liberarsi, ma poi, man mano, i loro movimenti decrescono d'ampiezza, fino a cessare completamente. Dopo un tempo variabile da una a due ore, sopraggiunge la morte. Ho considerato il sopravvenire di questa nel momento in cui le prede, anche se stimolate meccanicamente, non reagiscono più. In qualche caso esse continuano a vivere per parecchi giorni dopo la cattura, ma un attento esame rivela che l'ascidio in questi casi non è funzionale, cioè che esso non ha più ricostituita la normale depressione interna. Tale fatto, in genere, è dovuto, o ad una incompleta chiusura della valvola o ad una lesione della parete. Infatti, forando l'ascidio con un ago sottile, subito dopo la cattura, si constaterà che le prede continuano a vivere nell'interno per un tempo di gran lunga superiore a quello osservato normalmente per gli ascidi integri.

Da ciò si può dedurre che le ghiandole dell'ascidio secernono sostanze capaci di uccidere le prede, ma che questa secrezione ha luogo soltanto quando si è ricostituita la depressione nell'interno di essi. Potrebbe anche darsi che la depressione sia soltanto uno dei fattori determinanti la secrezione: l'altro potrebbe essere la stimolazione delle ghiandole, provocata dalla presenza delle prede. Comunque il primo è certamente indispensabile.

La morte delle prede è seguita dalla loro dissoluzione, fenomeno difficile ad osservare, usando le larve di zanzara, perchè il loro esoscheletro chitinoso, non digeribile, nasconde quello che avviene nelle altre parti del loro corpo. Decisi pertanto di sostituirle con dei pezzettini di carne cruda o cotta (muscolo di vitello) e di ovalbumina coagulata. La loro dissoluzione avviene rapidamente e di essi scompare ogni traccia dopo 12-48 ore dalla cattura, in rapporto alle rispettive dimensioni dei singoli pezzi. Essendo gli ascidi un pò trasparenti, si può vedere direttamente se ha avuto luogo la digestione, o no. Comunque, per controllare meglio il fenomeno, sezionai i diversi ascidi e potei constatare sempre che, delle sostanze introdotte, dopo un sufficiente periodo di tempo, non rimaneva più alcuna traccia.

Infine, analizzai il contenuto degli ascidi, per riconoscere la presenza in essi di aminoacidi, per mezzo della ninidrina, in diversi momenti della loro funzionalità. Potei fare così le seguenti osservazioni:

a) nel fluido di ascidi vergini o che comunque siano rimasti digiuni per un sufficiente periodo di tempo, non sono mai presenti aminoacidi o polipeptidi disciolti.

b) il fluido contenuto in ascidi che abbiano catturate prede da mezz'ora fino a due ore, dà sempre, con la ninidrina, reazione positiva.

c) la stessa reazione positiva si ha dopo un giorno dalla cattura, e in certi casi, pure dopo due giorni.

d) quando la dissoluzione delle prede è stata completata, si ha ancora per breve tempo reazione positiva, questa diviene poi negativa. Ciò significa che non solo ha luogo una dissoluzione delle prede, ma anche un assorbimento dei prodotti così ottenuti.

Possiamo pertanto da questi fatti trarre le seguenti conclusioni:

1) le prede catturate dagli ascidi muoiono dopo breve tempo; la loro morte non è naturale ma è provocata dalla pianta. Infatti, quando l'apparecchio di cattura non è in grado di funzionare, per l'esistenza di lesioni sulla sua parete, o per altri motivi, l'animaletto catturato vive a lungo nel suo interno. Questa mancanza di funzionalità dell'ascidio è un fatto piuttosto comune, particolarmente negli ascidi vecchi, che hanno già iniziato la loro degenerazione.

2) Delle sostanze costituenti le prede, le proteine vengono completamente disciolte, dopo un periodo di tempo più o meno lungo, comunque non eccedente i due giorni, e di esse non rimane traccia alcuna. Gli esoscheletri chitinosi, invece, non vengono intaccati e permangono nell'interno degli ascidi.

3) Le sostanze derivate dalla dissoluzione delle proteine vengono rapidamente assorbite dall'ascidio. Infatti, nel fluido interno, dopo un periodo di tempo sufficientemente lungo, non se ne trova più alcuna traccia.

b) NATURA DELLA DIGESTIONE.

Tutti considerano oggi l'*Utricularia* una pianta carnivora, ma esistono ancora punti di vista discordanti per quanto concerne la natura della digestione delle prede: mentre infatti alcuni Autori, come ho ricordato nel primo capitolo, sostengono che si tratti di una digestione essenzialmente batterica, senza alcuna azione da parte della pianta, altri ritengono che sia provocata dalla secrezione di enzimi; e altri ancora pensano che alla digestione contribuiscano sia i batteri che la pianta stessa.

Per orientarmi sulla questione, preparai un certo numero di strisci del contenuto di ascidi, fissando in alcool e colorando con violetto di genziana fenicato. Scelsi un gruppo di ascidi vergini, che non avevano mai catturato prede, un gruppo di ascidi in fase digestiva, un gruppo non in fase digestiva, ma che avevano già catturate prede e un gruppo di ascidi vecchi, pieni di resti di prede e probabilmente nella maggior parte non funzionali.

Constatai quanto segue :

a) gli ascidi vergini non contengono batteri.

b) gli ascidi in fase digestiva contengono batteri, ma in numero molto limitato.

c) gli ascidi che hanno già digerito contengono anch'essi batteri, ma sempre in numero esiguo.

d) gli ascidi vecchi, non più funzionali, contengono numerosi batteri e infusori: in un caso vi ho notato anche un rotifero.

Osservai quindi un pezzetto di albumina coagulata, dopo un' ora circa dalla cattura. Su di esso non esistevano batteri.

Feci infine ancora un' esperienza che si rivelò molta indicativa: dopo aver fatto catturare ad un ascidio un pezzetto di carne, posi in vicinanza di esso un altro pezzetto, circa delle stesse dimensioni, e osservai a distanza di tempo ciò che avveniva dell' uno e dell' altro. Dopo due giorni la carne nell'ascidio era stata completamente disciolta, quella immersa nell'acqua era invece ancora integra e presentava soltanto un colore più pallido. Dopo tre giorni staccai l'ascidio dalla pianta e lo trattai con la ninidrina: ebbi reazione negativa. Dopo una settimana, l'altro pezzetto di carne, pur presentando un inizio di putrefazione, aveva ancora le dimensioni originarie: si osservavano su di esso numerosissimi batteri. Ripetuta l'esperienza, invece che analizzare con la ninidrina il contenuto dell' ascidio, ne feci uno striscio e osservai al microscopico se c'erano batteri: il loro numero era insignificante.

Mi sembrano sufficienti i fatti osservati per affermare che la digestione nell' interno degli ascidi non è di natura batterica: deve pertanto essere necessariamente provocata dalla pianta stessa per mezzo della secrezione di enzimi.

Lo scarso sviluppo dei batteri nell' interno degli ascidi può senz' altro ascriversi all' azione inibitrice dell'acido benzoico, la cui presenza è stata segnalata dal LUETZELBURG. L'acido benzoico è pure presente sulle foglie della *Pinguicula*, dove pare abbia la stessa funzione.

La presenza di numerosi batteri e altri animalletti acquatici negli ascidi vecchi sta a dimostrare la loro assoluta mancanza di fun-

zionalità: infatti questa è la prima fase della loro degenerazione, che termina col loro distacco dalla pianta.

Concludendo, l'*Utricularia vulgaris* è una pianta carnivora capace di secernere, nell'interno degli ascidi, un certo numero di enzimi che hanno un ruolo determinante nella digestione delle prede.

c) GLI ENZIMI CHE DETERMINANO LA DIGESTIONE.

Stabilito che gli ascidi sono capaci di digerire le prede catturate, è evidente che nel loro interno avrà luogo una secrezione di enzimi. Gli enzimi digestivi non possono essere altro che delle idrolasi, appartenendo ad esse gli enzimi proteolitici, lipolitici e glicolitici, presenti in tutti i fenomeni digestivi.

In una prima serie di esperienze tentai di stabilire a quali di questi gruppi appartenessero gli enzimi secreti dall'ascidio. Pertanto feci catturare ad alcuni ascidi sostanze, la cui dissoluzione mi rivelasse l'esistenza di qualcuno di essi e precisamente provcai la cattura di albumina coagulata, di grasso di bue, olio di oliva e di amido.

L'*albumina coagulata*, come si è visto nelle precedenti esperienze, viene rapidamente disciolta, quindi nell'interno dell'ascidio deve essere presente una proteasi. Oltre a questa sono pure presenti polipeptidasi. Infatti con la reazione della ninidrina, si hanno colorazioni diverse a seconda del grado di idrolisi dei protidi analizzati: per le proteine si ha una intensa colorazione bleu, che passa gradatamente al rosa per i polipeptidi e gli aminoacidi. Le analisi effettuate su ascidi che avevano appena terminato di sciogliere completamente l'albumina rivelarono una colorazione rosea, dimostrando che in quel momento nell'ascidio erano contenuti soltanto aminoacidi.

Feci quindi una serie di esperienze per rivelare analiticamente le proteasi e le polipeptidasi, utilizzando il metodo della capillarizzazione di GRUSS. Usai cartine all'albumina e al peptone. Una prima serie di prove consistette nel prelevare da ascidi giovani, che presumibilmente non avevano mai catturato, il fluido interno e nell'analizzarlo. Ottenni sempre risultati negativi, sia per l'albumina che per il peptone: in essi quindi, non erano contenuti enzimi. Un'altra serie di prove fatte con ascidi vecchi che avevano già catturato mi diede risultati positivi e negativi. Infine analizzando ascidi in piena attività digestiva, dopo un giorno dalla cattura, ottenni sempre reazione positiva.

Potei quindi trarre le seguenti conclusioni:

a) nell'interno dell'ascidio sono presenti enzimi proteolitici soltanto quando questo sta digerendo una preda.

b) gli enzimi presenti sono, sia proteasi che polipeptidasi.

c) quando la digestione è terminata essi scompaiono: probabilmente debbono essere riassorbiti dall'ascidio.

Per quanto concerne il *grasso di bue e l'olio di oliva*, piccole quantità di queste sostanze, immesse nell'interno di ascidi, vi rimangono tali per lungo tempo senza presentare alcuna apparente alterazione. Le ghiandole che si trovano a contatto con esse, presentano invece modificazioni citologiche consistenti nella comparsa nel loro interno, di piccole sferette rifrangenti, che si colorano intensamente sia col rosso neutro che col Sudan III. Queste sferette non s'osservano nelle ghiandole degli ascidi vergini e il loro numero è direttamente proporzionale a quello delle prede catturate, essendo tanto più numerose quanto più numerosi sono i resti di animali presenti nell'ascidio. Esse inoltre non sono uniformemente distribuite nell'ascidio, ma concentrate in zone limitate di esso.

Tali sferette, per le reazioni che presentano, possono considerarsi di natura lipidica. Volli cercare di vedere la loro origine e, scelti una decina di ascidi giovani, probabilmente vergini, ne sezionai cinque e li immersi per qualche minuto in una soluzione alcolica di Sudan III: esaminati al microscopico, non rivelarono, all'interno delle ghiandole, colorazione alcuna. Agli altri cinque feci catturare invece qualche gocciolina per ciascuno di olio di oliva. Sezionati dopo due giorni, mostravano ancora goccioline di olio presenti pure nelle ghiandole di una zona limitata della loro superficie interna, le quali non potevano che provenire dal grasso introdotto nell'ascidio.

Sezionai quindi ascidi con molti resti di prede, cercando di non spostarne il contenuto. Trattati col Sudan III, vidi sferette colorate in rosso, sia in alcune parti delle prede, sia nelle ghiandole a contatto con esse.

Analizzai ancora il fluido contenuto in ascidi in fase digestiva, col metodo della capillarizzazione di GRUSS, usando delle cartine all'olio di mandorle. La reazione fu negativa.

Le osservazioni sopra esposte mi portarono a concludere che l'ascidio non secerne enzimi lipolitici e che i grassi delle prede a contatto con le ghiandole, passano in esse sotto forma di goccioline. Questo passaggio, dato che non ha luogo un'idrolisi delle sostanze grasse, può essere dovuto soltanto a fenomeni di natura chimico-fisica, quali imbizione, variazioni di tensione superficiale, ecc.

Per vedere infine se il fluido degli ascidi contenesse enzimi glicolitici, iniettai nell'interno di alcuni di essi, per mezzo di una sottile pipetta di vetro, una sospensione in acqua di granelli di

amido. Osservai per parecchi giorni (sempre sezionando gli ascidi e controllando il contenuto), se i singoli granelli di amido presentassero un principio di idrolisi, ma essi, anche dopo una settimana, conservavano la loro integrità. Ripetei le stesse ricerche usando le cartine all'amido e ottenni sempre reazione negativa. Nell'interno degli ascidi quindi, non sono mai presenti enzimi amilolitici.

5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI.

Le numerose osservazioni da me fatte e sopra descritte definiscono, a mio avviso, la questione ancora controversa della natura della digestione delle prede negli ascidi di *Utricularia vulgaris* L.

Questa pianta infatti, considerata dal GOEBEL *sarcofaga*, cioè capace di digerire le prede per la secrezione di enzimi nell'interno degli ascidi, solo per i rapporti genetici con le altre *Lentibulariaceae* in cui era stata dimostrata tale secrezione, fu dal KIESEL e dallo STUTZER considerata *necrofaga* in quanto la sostanza organica delle prede sarebbe idrolizzata dalla flora batterica presente nell'ascidio e quindi assorbita dalle ghiandole interne dell'ascidio stesso.

L'*Utricularia vulgaris* si presenta come uno stolone accrescentesi continuamente all'apice, mentre degenera all'estremità opposta: gli ascidi di questa parte hanno perduto la capacità di funzionare. Le prede che in essi penetrano, vi vivono a lungo, spesso tornano libere con la degenerazione dell'ascidio, e se muoiono per inedia prima di tale degenerazione, può darsi si verifichi una putrefazione batterica del loro contenuto, ma l'ascidio in degenerazione sarà anche incapace di assorbire i prodotti di idrolisi così ottenuti. Oltre a questi ascidi incapaci di funzionare, diciamo pure, per vecchiaia, si possono trovare anche ascidi giovani non funzionali per piccole lesioni alla delicatissima parete della valvola e anche in essi le prede potranno essere attaccate dai batteri.

Tutte le mie esperienze sono state compiute su ascidi capaci di funzionare e precisamente su ascidi giovani che non avevano mai catturato prede, su ascidi in cui provocavo io per la prima volta la cattura di pezzettini di albumina e di grasso di bue, di gocce di olio di oliva, di granuli di amido e che osservavo durante la digestione e l'assorbimento e infine su ascidi adulti che più volte avevano funzionato.

Nei primi non ho mai trovato batteri, negli altri questi erano sempre presenti, penetrati, senza dubbio, ad ogni cattura, con l'acqua aspirata, ma il loro numero era sempre scarsissimo, data forse la presenza, negli ascidi, di acido benzoico. Tale scarsità e l'osservazione da me fatta che, di due pezzetti di carne perfetta-

menti eguali, uno catturato e uno posto esternamente, nelle immediate vicinanze dell'ascidio, il primo è completamente digerito quando il secondo è ancora integro, portano ad escludere la natura batterica della digestione delle prede. Questa *è dovuta agli enzimi* che la pianta inizia a secernere solo dopo una mezz'ora dalla cattura, quando cioè si è ricostituita, nell'ascidio, la normale depressione interna e solo dopo la cattura di sostanze digeribili. Le reazioni da me fatte sugli enzimi idrolitici sono risultate infatti sempre negative per il fluido interno, sia degli ascidi che non avevano mai catturato, sia di quelli in cui erano ultimati i processi della digestione e dell'assorbimento. Esse invece risultarono positive per il fluido degli ascidi in piena attività digestiva. Questa reazione positiva riguardò però sempre soltanto gli enzimi proteolitici, proteasi e polipeptidasi, mentre le reazioni degli enzimi lipolitici e amilolitici sono state sempre negative; i grassi, però, pur non avvenendo l'idrolisi, vengono assorbiti dalle ghiandole a contatto con essi.

Concludendo, l'*Utricularia vulgaris* è una pianta carnivora, capace di uccidere e digerire le prede catturate. Le ghiandole della parete interna dell'ascidio secernono, se stimolate, un gruppo di enzimi proteolitici comprendenti sia proteasi che polipeptidasi. Le sostanze grasse non vengono idrolizzate, ma vengono assorbite dalle ghiandole con le quali stanno a contatto. Gli altri prodotti della digestione vengono pure assorbiti e di essi non rimane alcuna traccia nell'interno dell'ascidio dopo un certo tempo dalla cattura (da uno a due giorni).

RIASSUNTO

Negli ascidi capaci di funzionare dell'*Utricularia vulgaris*, le prede catturate muoiono rapidamente. La loro morte è provocata dalla pianta, probabilmente in seguito alla secrezione di particolari sostanze. La digestione non è di natura batterica, ma è determinata dagli enzimi prodotti dalle ghiandole interne dell'ascidio.

Per analizzare qualitativamente questi enzimi vennero fatte numerose esperienze, sia introducendo negli ascidi delle sostanze la cui dissoluzione avrebbe dimostrato l'esistenza di enzimi specifici, sia col metodo della capillarizzazione di Gruss. I risultati ottenuti dimostrarono soltanto l'esistenza di enzimi proteolitici, sia proteasi che polipeptidasi. Negative risultarono le reazioni degli enzimi lipolitici e amilolitici.

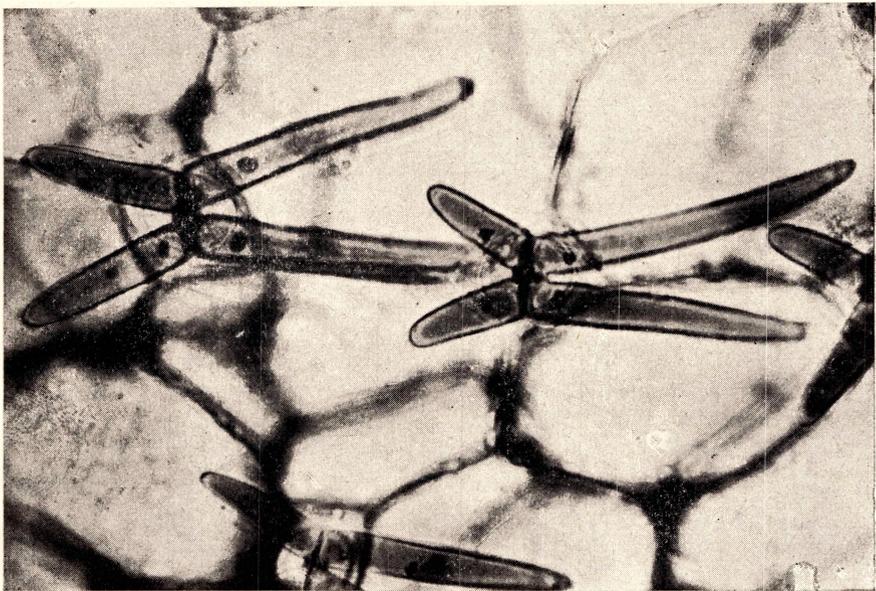
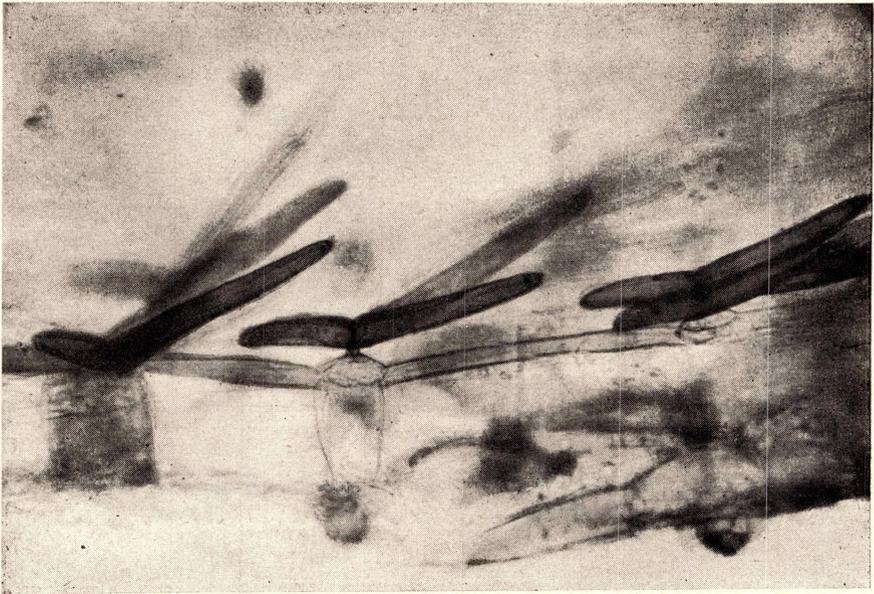
S U M M A R Y

The preys captured by the active traps of *Utricularia vulgaris* succumb quickly. Their death is caused by the plant, probably because of the secretion of some substances. The digestive activity is not of bacterial nature, but she is the work of the enzymes produced by the interior glands of the trap.

Many experiences were made to analyze the quality of these enzymes. There were introduced in the traps some substances, whose dissolution shows the existence of specific enzymes, and it was used the method of the capillarization of Gruss. The results obtained showed the existence of proteolytic enzymes, proteasis and polipeptidasis.

BIBLIOGRAFIA

- ADOWA A. N. — Zur Frage nach den Fermenten von *Utricularia vulgaris* L.; *Bioch. Z.* I, 150, 1924; II, 153, 1924.
- BROCHER F. — Le problème de l'*Utriculaire*; *Ann. de Biol. lacustre* 5, 33-46, 1911.
- COLLA S. — Sui fermenti secreti da *Pinguicula alpina*; *Ann. Chanousia*, 8 (144) 1937.
- CZAJA A. — Ein allseitig geschlossenes, selektivpermeables System; *Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch.*, 40, 381-385, 1923.
- DARWIN CH. — *Insectivorous Plant*; New York, 1875.
- GOEBEL K. — *Pflanzenbiologische Schilderungen*; II, Marburg 1891.
- GUILLIERMOND A. — *Le système vacuolaire ou vacuome*; Paris, 1934.
- KIESEL A. — Études sur la nutrition de l'*Utricularia vulgaris*; *Ann. Inst. Pasteur*, 38, 879-891, 1924.
- KRUCK M. — Physiologische und Citologische Studien über die *Utricularia* blase; *Bot. Arch.*, 33, 257-309, 1931.
- LLOYD F. E. — *The carnivorous plants*; Waltham, 1942.
- LUETZELBURG P. von — Beitrage zur Kenntniss der *Utricularia*; *Flora*, 100, 145-212, 1910.
- MEROLA A. — Osservazioni su piante del Napoletano. Nota I; *Delpinoa* (Ns. del *Bullettino dell'Orto Botanico dell'Università di Napoli*), II (T. XIX), 23, 1949.
- NOLD R. H. — Die Funktion der Blase von *Utricularia vulgaris*; *Beihefte Bot. Centralbl.*, 52, 415-448, 1934.
- SCHIMPER A. — Notizen über insectenfressenden Pflanzen; *Bot. Zeitung*, 40, 225-234, 1882.
- STUTZER M. — Zur Biologie der *Utricularia vulgaris*; *Arch. Hydrobiol.*, 17, 730-735, 1926.



Microfotografie in vivo di ghiandole digestive ed assorbenti della parete interna dell'ascidio, viste di lato (in alto) e viste di fronte (in basso).

E. HONSELL — Ricerche sulla digestione negli ascidi dell' *Utricularia vulgaris* L.

