

Prof. ANTONIO VITTORIA
Direttore inc. d' Istituto nell'Università di Napoli

RICERCHE E NOTE CRITICHE
intorno agli effetti dell'ECE sul pesce
e circa i concetti di analisi citochimica « semiquantitativa »,
di « schermatura » e di « idioblasti funzionali »

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

UNIVERSITY OF CHICAGO

LIBRARY

1850-1859

1850-1859

Prof. ANTONIO VITTORIA
Direttore inc. d'Istituto nell'Università di Napoli

RICERCHE E NOTE CRITICHE
intorno agli effetti dell'ECE sul pesce
e circa i concetti di analisi citochimica «semiquantitativa»,
di «schermatura» e di «idioblasti funzionali»

INDICE

Introduzione pagg. 9 - 11
1. Premessa. - 2. Osservazioni.	
I. Criteri di impostazione delle ricerche e svolgimento dei trattamenti	" 12 - 15
II. Metodi adottati	" 16 - 28
1. Descrizione dei metodi adottati da diversi Autori: <i>a)</i> Metodi chimici, <i>b)</i> Metodi istochimici, <i>c)</i> Metodi di colorazione delle cellule. - 2.) Metodi adottati: <i>a)</i> Metodo chimico, <i>b)</i> Metodi citochimici, <i>c)</i> Modalità e svolgimento delle indagini chimiche e citochimiche, <i>d)</i> Metodi di colorazione delle cellule.	
III. Risultati	" 29 - 46
1. Risultati degli esami chimici. - 2. Risultati degli esami citochimici: <i>a)</i> Risultati macroscopici, <i>b)</i> Risultati degli esami microscopici, <i>c)</i> Descrizione delle figure, <i>d)</i> Altri risultati non illustrati con figure. 3. - Colorazioni delle cellule.	
IV. Osservazioni	" 47 - 57
1. - Osservazioni. - 2. Il fenomeno di «schermatura». - 3. Introduzione al concetto di analisi citochimica «semiquantitativa» dell'acido ascorbico totale e gli "idioblasti funzionali",.	
Conclusioni	" 57 - 59
Riassunto	" 59 - 60
Summary	" 60 - 61

INTRODUZIONE

I - Premessa. - 2. Osservazioni.

1. PREMESSA.

L'estendersi, sempre più accentuato, di nuovi insetticidi nella lotta contro i parassiti delle Piante implica ovviamente, tra l'altro, un maggiore bisogno dello studio degli effetti causati nelle piante stesse da parte delle nuove sostanze impiegate. Così, per esempio, risulta interessante studiare i fenomeni che possono essere indotti dai nuovi insetticidi « sistemici » (1) i quali vengono assorbiti dalle piante per via radicale: in alcuni casi (2) è risultata non solo una difesa dagli insetti succhiatori ma anche un aumento di mole da parte di piante trattate con i suddetti insetticidi sistemici.

A proposito, inoltre, di insetticidi a base di isomero γ di esaclorocicloesano (ECE) sono notevoli gli effetti da siffatti insetticidi causati in numerose specie di piante, effetti consistenti, secondo DONTCHO KOSTOFF (3), in poliploidia ed in turbe o anomalie dell'accrescimento correlate a turbe delle mitosi cellulari.

Soffermandoci sui fenomeni indotti dall'ECE riteniamo opportuno illustrare brevemente la bibliografia direttamente o indirettamente relativa ad alcuni casi di poliploidia.

AVERY G. S. J., JOHNSON E. B., ADDOMS R. M. e THOMSON B. F. (4) ricordano il grado frequente con cui si realizzano, in seguito a trattamenti colchicini, le forme mixoploidi o ploidi chimerici (es. *Vaccinium Oxycoccus*, *Lolium perenne*, ecc.).

(1) CIFERRI R., Gli insetticidi sistemici, *Humus*, n. 10, ottobre 1950, pagg. 22-23.

(2) ROGGERO M., Prodigioso per le Piante, *la Tribuna Illustrata*, 1-8 giugno 1952, pag. 12.

(3) DONTCHO KOSTOFF, Atypical growth, abnormal mitosis, poliploidy and chromosome fragmentation induced by hexachlorocyclohexane, *Nature*, 162, 1948, pagg. 845-846.

(4) AVERY G. S. J., JOHNSON E. B., ADDOMS R. M., THOMSON B. F., Hormones and horticulture, Mc. Graw Hill, 1947, pagg. 289-291.

Inoltre la struttura asimmetrica dei meristemi apicali (1), la diffusione laterale della colchicina, almeno nel ricino (2), ed, infine, le differenze tra i valori della pressione osmotica delle cellule di uno stesso tessuto (3) costituiscono dati in base ai quali si può argomentare il perchè è altamente frequente un'irregolare diffusione della colchicina; possiamo così spiegare la frequenza delle forme mixoploidi o, più in generale, le turbe dello sviluppo causate dagli induttori di poliploidia.

BRACEWELL M. F., HOYLE E. e ZILVA S. S. (4) hanno stabilito, in ricerche condotte a rilevare il contenuto vitaminico C di mele inglesi, che la mela «Bramley's Seedling» ha il più alto contenuto vitaminico C delle mele saggiate.

HALDANE G. B. S. e BREGGER J. T. (5) hanno osservato, a seguito del lavoro degli AA. immediatamente sopra citati, che la mela «Bramley's» era la sola triploide fra quelle esaminate.

CRANE M. B. e ZILVA S. S. (6) hanno esteso le ricerche su diverse mele inglesi, diploidi e tetraploidi, ma hanno ottenuto risultati abbastanza contraddittori.

SANSOME F. W. e ZILVA S. S. (7), ricollegandosi alle ricerche degli Autori precedenti che avevano studiato lo stesso argomento, hanno ritenuto, allo scopo di studiare bene i rapporti intercorrenti fra poliploidia e contenuto in acido ascorbico, di ricorrere allo studio di patate tetraploidi ottenute sperimentalmente. E' risultato che le patate tetraploidi hanno un contenuto in acido ascorbico quasi doppio di quello delle patate diploidi.

KEY M. (8) ha studiato il contenuto vitaminico C di pomodori tetraploidi e diploidi: l'Autrice ha stabilito che non esiste alcuna differenza di contenuto vitaminico C tra le due dette forme di pomodori.

(1) CATALANO G., Teoria generale della foglia, *Annali della Facoltà Agraria di Portici della R. Università di Napoli*, serie III, 1941, vol. XII, con 68 disegni originali, pagg. 1-205.

(2) TONZIG S. e TRECCANI POMA C., Studi sull'azione delle sostanze di crescita sopra il plasma vegetale, *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, 1946, vol. LIII, pagg. 601-634.

(3) VITTORIA A., Effetti sulle piante dell'eruzione vesuviana del marzo 1944 con illustrazione del concetto di «idioblasto funzionale». *Rivista di Biologia*, vol. XL, 1948, pagg. 1-22.

(4) BRACEWELL M. F., HOYLE E. and ZILVA S. S., The antiscorbutic potency of apples, *Biochemical Journal*, 24, 1930, pagg. 82 - 90.

(5) HALDANE G. B. S. e BREGGER J. T. in: SANSOME F. W. and ZILVA S. S., Poliploidy and vitamin C, *Biochem. J.* 27, 1933, pagg. 1935-4941.

(6) CRANE M. B. and ZILVA S. S., The antiscorbutic potency of apples, V. T. *Biochem. J.*, 26, 1932, pagg. 2177-2181.

(7) SANSOME F. W. and ZILVA S. S., Poliploidy ecc., già citato.

(8) KEY M., The determination of vitamin C in diploid and tetraploid tomatoes, *Biochem. J.*, 27, 1933, I, pagg. 153-156.

2. OSSERVAZIONI.

Dovendo ora noi dare un giudizio critico dei lavori sopra ricordati osserviamo che occorre ritenere essere la poliploidia correlata con un maggior contenuto di acido ascorbico: e ciò almeno per quanto riguarda la patata. Infatti i lavori degli AA. sopraricordati nei quali la correlazione « poliploidia - maggior contenuto di acido ascorbico » non è risultata (BRACEWELL e COLL. RI, CRANE e COLL. RE, KEY) o sono condotti con un metodo biologico, meno preciso dei metodi chimici per quanto riguarda l'individuazione della vitamina C, oppure non tengono, tra l'altro, nel dovuto conto il fattore provenienza dei frutti, cresciuti in condizioni molto diverse (1).

Inoltre, sempre tenendo presente la bibliografia precedente, osserviamo che nel caso si abbiano turbe di accrescimento - evenienza che abbiamo ricordato essere più frequente di quanto si possa immaginare (AVERY e COLL. RI, CATALANO G., TONZIG S. e COLL. ICE, VITTORIA A.) - nel caso cioè si venga a costituire, in seguito all'azione di un induttore, una struttura chimerica, a settori diploidi e poliploidi, l'incremento del tasso di acido ascorbico della chimera dovrebbe essere, approssimativamente, intermedio fra quello del diploide e quello di un eventuale poliploide a normale accrescimento, proveniente dal precedente.

(1) Vedi, ad esempio: J. D. HENDRICK J. B., The influence of fertilizers on the carotene and vitamin C content of plants, *Biochem. J.*, 30, 1936, pagg. 2307-2312.

CAPITOLO I.

Criteri di impostazione delle ricerche e svolgimento dei trattamenti.

Mostrandosi dunque l'argomento dei rapporti « mixoploidia-contenuto in acido ascorbico » ricco di incognite abbiamo ritenuto opportuno sperimentare in merito.

Oltre all'uso della colchicina, da noi provata sul loglio, ci siamo orientati verso l'ECE, sostanza le cui proprietà induttrici sono di più recente scoperta.

Nei riguardi delle ricerche condotte mediante colchicina su loglio rendiamo subito noto che spiacevoli evenienze, relative ad alcuni improrogabili lavori che sono stati condotti nell'apezzamento in cui si sperimentava (Azienda Ascarelli in Carinola, Caserta) hanno implicato la forzata interruzione delle esperienze stesse.

Stabilito di continuare, almeno per il momento, a sperimentare soltanto sul pesco, ci siamo posti il quesito se fosse più opportuno sperimentare su un gruppo di piante la chioma di ognuna delle quali fosse divisa in più settori, riceventi ciascuno diverso trattamento; considerato, a questo proposito, l'insieme delle condizioni sperimentali quando si fa ricorso a trattamenti a dosi diverse su piante stimabili in condizioni affini (insicurezza circa la natura del portainnesto, circa la omogeneità dei caratteri funzionali individuali, circa la stratigrafia del terreno, ecc.), abbiamo deciso di ricorrere allo svolgimento dei vari «temi» sperimentali su diversi settori di una stessa pianta. Inoltre l'influenza eventuale espletata da parte del trattamento di un settore su un altro settore ci ha indotto a seguire contemporaneamente anche l'altro metodo, quello cioè su più di una pianta ciascuna delle quali riceventi una data dose; però difficoltà finanziarie ci hanno costretto a delimitare le prove, almeno per il momento, ad un'unica pianta.

Scelta, così, una pianta di pesco avente la chioma omogenea al massimo possibile abbiamo tratto dei compromessi, i più equilibrati che era possibile, fra le seguenti varianti: ampiezza dei settori della chioma, orientamento degli elementi dei settori, numero e qualità dei rami per ogni settore, quantità dei « temi » prescelti ossia diverse diluizioni di sostanza attiva.

La pianta prescelta, crescente in un appezzamento dell'Istituto di Zootechnia dell' Università di Napoli, gentilmente messa a disposizione dal Ch.mo Prof. D'Alfonso, è del « tipo » " Terzarola ", è cioè a maturazione tardiva dei frutti (2^a decade di settembre), è di media età, di medio vigore, sana, e non innestata.

Il cerchio della fig. 1 illustra una proiezione su di un piano della chioma della predetta pianta, vista dall'alto. La chioma è stata divisa in settori, risultati abbastanza regolari per costituzione e direzione dei rami, oltre che per quantità di foglie.

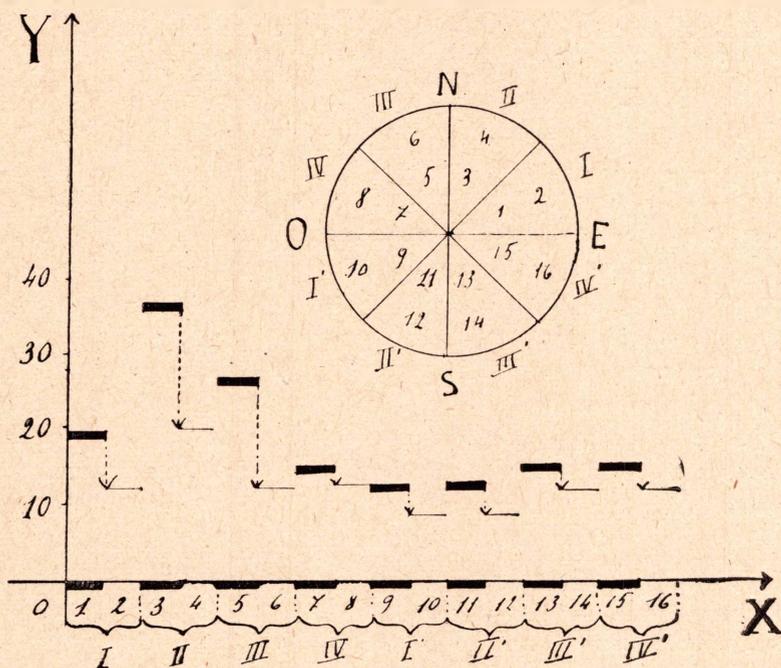


Fig. 1 - Risultati ottenuti col metodo Tillmans-Ott nei riguardi delle pesche trattate con ECE: sull'asse delle X, oltre che nei riguardi del cerchio raffigurante una proiezione, dall'alto, della chioma del pesco trattato, i numeri arabi indicano il numero d'ordine delle pesche (numeri dispari indicanti una terna di pesche ombreggiate, i pari una terna di pesche soleggiate); i numeri romani indicano il settore di chioma. Sull'asse delle Y valori, di 10 in 10, di vitamina C totale, espressi in mg. di vitamina per 100 g. di tessuto fresco.

Così, stimato di scegliere quattro temi, dei quali un controllo e tre diverse concentrazioni di isomero γ di ECE, ciascuno di detti temi è stato ripetuto due volte, in maniera cioè che lo stesso tema fosse ripetuto su settori diametralmente opposti ed i settori immediatamente vicini, godenti quindi di esposizioni praticamente uguali,

fossero trattati a dosi immediatamente successive. In tal maniera i settori I e I' (fig. 1) hanno funzionato da testimoni, ricevendo cioè solo irrorazione con acqua del Serino, nella stessa quantità, per ciascun settore, di soluzione di ECE data a ciascun altro settore della pianta. I settori II e II' hanno ricevuto il trattamento al 480 ‰ di isomero γ di ECE (g. per 100 l. di acqua); quelli III e III' il trattamento all'800 ‰ di sostanza predetta; IV e IV' al 1600 ‰.

Tali concentrazioni in sostanza attiva corrisponderebbero alle seguenti concentrazioni di Tiogamma SIPCAM del commercio, al 16 ‰ di sostanza attiva: per i settori II e II' 3 ‰ di Tiogamma (kg. per 100 l. di acqua); per III e III' 5 ‰; per IV e IV' 10 ‰.

L'isomero γ di ECE adoperato per le presenti ricerche è stato biologicamente saggiato, su piantine di granturco, a paragone di isomero di ECE purissimo, fornito dalla stessa Ditta (SIPCAM) ed è stato trovato rispondente alle indicazioni in principio attivo fornite dalla Casa.

Prima di iniziare i trattamenti intorno al pedale della pianta e per tutta l'estensione della proiezione della chioma è stato coperto uno strato spesso di erbe e foglie secche allo scopo di eliminare l'eventualità che la sostanza irrorata percolasse, in seguito a qualche pioggia, nel terreno.

I trattamenti con ECE sono stati attuati in numero di quattro, a partire da quello praticato l'8 luglio 1952 quando cioè i frutti raggiungevano quasi la grossezza di una noce. Poichè quindi il pesco scelto per le esperienze ha prodotto frutti di pezzatura media i trattamenti hanno coinciso con un periodo d'intenso accrescimento.

Il secondo trattamento è stato eseguito il 23 luglio; il terzo non più a 15 giorni di distanza dal secondo ma a sei giorni, cioè il 29 luglio, a causa del fatto che una forte pioggia aveva dilavato la sostanza irrorata; infine l'ultimo, cioè il quarto, è stato praticato a distanza di 18 giorni dal precedente, cioè il 16 agosto, in quanto, approssimandosi la maturazione, è stato giudicato che non vi sarebbe stata più la possibilità di praticarne altri due, distanziati di 15 giorni l'uno dall'altro.

Per ciascun settore sono stati irrorati tre quarti di l. di acqua di Serino nei riguardi dei due settori testimoni, oppure tre quarti di l. di soluzione ECE, alle diverse concentrazioni sopradette, per ciascuno degli altri settori.

Le irrorazioni sono state praticate con un nebulizzatore a getto finissimo e procurando, ovviamente, sia di bagnare bene tutte le superficie sia dei frutti che di foglie e rami, sia di evitare che il liquido destinato ad un settore bagnasse un settore vicino.

Il 30 agosto è stato possibile osservare gli inizi dell'invaiaura dei frutti. A tale epoca si è deciso di rilevare accuratamente come procedesse il detto fenomeno in quanto, essendo noto (1) che la vitamina C può variare di contenuto a seconda dello stato di maturità dei frutti, allo scopo di omogeneizzare al massimo possibile le condizioni sperimentali è stato tenuto ben presente il grado di maturazione dei frutti da sottoporre ad analisi.

Si è perciò rilevato accuratamente il numero dei frutti invaiati, in diverse epoche successive al 30 agosto, tenendo ovviamente i frutti stessi catalogati per settore. Per brevità non si citano i dati relativi a detto decorso dell'invaiaura in quanto i risultati delle presenti indagini, delimitatamente agli effetti dei trattamenti con ECE sul pesco, devono ritenersi solo preliminari e largamente indicativi a causa di un'infestione di « mosca della frutta » manifestatasi il 15 settembre. Posteriormente a tale epoca la caduta dei frutti parassitati è stata abbondante.

Comunque, si è stimato di continuare le ricerche ritenendosi interessante, così come poi è risultato, il condurre un paragone tra i metodi chimici e citochimici da noi adottati.

I criteri di scelta dei frutti da sottoporre ad analisi, sia chimica che citochimica, sono stati quelli di prelevare da ciascun settore sei frutti, sani, dei quali tre un pò ombreggiati e tre illuminati (vedi, rispettivamente, i numeri arabi dispari e pari della fig. 1 ciascuno dei quali indica una terna di frutti ombreggiati oppure illuminati). Altri otto frutti sono stati prelevati dai settori I e IV (quattro un pò ombreggiati e quattro al sole), frutti da servire per indagini complementari rispetto a quelle compiute con le prime sedici terne di frutti.

(1) GIROUD A., L'acide ascorbique dans la cellule et les tissus, *Protoplasma monographien*, G. Borntraeger, Berlin, 1938, pag. 173 et passim.

CAPITOLO II.

Metodi adottati.

1. - Descrizione dei metodi adottati da diversi Autori: *a)* Metodi chimici, *b)* Metodi istochimici, *c)* Metodi di colorazione delle cellule. - 2. Metodi adottati: *a)* Metodo chimico, *b)* Metodi citochimici, *c)* Modalità e svolgimento delle indagini chimiche e citochimiche, *d)* Metodi di colorazione delle cellule.

Abbiamo ritenuto opportuno adottare, oltre alle indispensabili indagini chimiche, anche dei saggi istochimici della vitamina C allo scopo di studiarne la distribuzione nell'ambito dei tessuti ed allo scopo, come già ricordato, di studiare paragoni tra metodi chimici e citochimici di individuazione dell'acido ascorbico.

1. - DESCRIZIONE DEI METODI ADOTTATI DA DIVERSI AUTORI.

a) METODI CHIMICI.

PETROSINI G. (1) ha modificato l'originario metodo di TILLMANS realizzando le modificazioni suggerite da OTT: l'estrazione della vitamina C dai tessuti è operata a mezzo di acidi forti, solforico e fosforico, mediante i quali si realizza una completa trasformazione dell'acido deidroascorbico in acido ascorbico.

Il detto metodo implica una doppia lettura alla microburetta: colla prima lettura si determina il potere riducente totale dell'estratto; colla seconda, operata dopo completa inattivazione dell'acido ascorbico nei riguardi dell'indicatore, il 2-6 di clorofenoloindofenolo, si determina « il potere riducente totale dell'estratto, non attribuibile ad acido ascorbico ». La differenza tra i valori delle due letture dà il contenuto reale in vitamina C totale.

LUND H., SPUR B. e SIGURD L. F. (2) suggeriscono una diluizione dell'indicatore, il 2-6, di clorofenoloindofenolo, dell'1% a ph 5.0.

(1) PETROSINI G., Sugli effetti della concimazione minerale sopra il contenuto vitaminico dei vegetali; ricerche sui peperoni: Nota I, *Annali di chimica applicata*, vol. 36, fasc. 4-5, Roma, pagg. 81-93

(2) LUND H., SPUR B., SIGURD L. F., The biological and titrimetric determination of Vitamin C, *Biochem. J.*, 28, 1934, 2, pagg. 1825-1828.

Il Chiar.mo Prof. FRANCESCHELLI, dell'Università di Napoli, ha suggerito allo scrivente una concentrazione dell'indicatore all'1,51‰ e dell'acido ascorbico all'1‰.

b) METODI ISTOCHIMICI.

BOURNE (1933) (1) ha realizzato un metodo di ricerca dell'acido ascorbico, contenuto nei tessuti, mediante nitrato d'argento acidificato con acido acetico.

GOUPH J. e ZILVA S. S. (1933) (2) hanno adottato un metodo di identificazione della vitamina C simile a quello di BOURNE; essi, inoltre, fanno ricorso ad un metodo rappresentativo così fatto: al segno — corrisponde assenza di reazione; al segno ± corrisponde reazione appena riconoscibile; al segno †- reazione riconoscibile distintamente, al segno ++ reazione decisa; al segno +++ reazione marcata ed infine al segno ++++ corrisponde una reazione estremamente scura.

GLICK D. (1935) (3) dispone le sezioni ricavate al microtomo in piccoli recipienti nei quali avviene sia l'estrazione dei succhi, mediante un agitatore elettromagnetico, sia la titolazione della vitamina C.

GIROUD e LEBLOND (1936) (4) allo scopo di mettere in evidenza la vitamina C nei tessuti animali operano nel seguente modo: il pezzo di tessuto viene dapprima lavato in una soluzione di levulosio al 5% allo scopo di allontanare i cloruri; poi si inietta nel pezzo — oppure si pone il pezzo a contatto di — una soluzione così composta: nitrato d'argento 100 g.; acido acetico glaciale 10 cc.; acqua distillata 1000 cc.; dopo 10 minuti i pezzi sono lavati in acqua distillata per 3-4 ore, cambiando l'acqua ogni 20 minuti; dopo di ciò i pezzi si trattano in una soluzione satura di iposolfito sodico; infine si lavano di nuovo in acqua. Dall'inizio dell'azione svolta dal nitrato sui pezzi sino al trattamento con iposolfito le operazioni devono essere condotte all'oscuro.

(1) BOURNE, in: GLICK D.: Techniques of histo-and cytochemistry, Interscience Publishers inc., N. Y., 1949, pag. 54.

(2) GOUPH J. and ZILVA S. S., The silver nitrate staining reaction for ascorbic acid in the adrenal, pituitary and ovary of various species of animals. *Biochem. J.*, 27, 1933, pagg. 1279-1286.

(3) GLICK D., The chemical determination of minute quantities of vitamin C, *Journal of biological chemistry*, 109, 1935, pagg. 433-436.

(4) GIROUD e LEBLOND, in: LISON L., *Histochimie animale*, Gauthiers-Villars Paris, 1936, pag. 300.

GIROUD A., LEBLOND C. P., RATSIMAMANGA R. e RABINOWICZ M. (1936) (1) osservano che la reazione argentica può essere, nelle cellule animali, diffusa, concentrata o golgiana, ed intermedia ossia golgiana e perigoliana; la predetta diversa intensità di reazione è messa in correlazione con i seguenti fattori: concentrazione della soluzione argentica, contenuto in acido ascorbico, presenza di sostanze inibitrici, tempo d'azione del reattivo, presenza o meno di dati supporti citologici ed, infine, le modalità di penetrazione del reattivo nei tessuti. Soltanto in merito al tempo d'azione del reattivo sui tessuti gli AA. riportano risultati di esperienze: annerimento di cellule, in presenza di cloridrato di cisteina e di glutathione, si ha o non si ha a seconda che il tempo d'azione vari da qualche secondo sino a 5, 7, 30 e 40 secondi.

In un lavoro dello stesso anno (1936) GIROUD e LEBLOND (2) riferiscono che esiste una serie di organi contenenti quantità medie di acido ascorbico - non già minime, come detto nel lavoro immediatamente sopra citato - che non dà reazione argentica. Gli AA. aggiungono che il fatto dipenderebbe da presenza di sostanze inibitrici.

In un altro lavoro (3), posteriore (1938) ai due precedenti, GIROUD a proposito del fatto che in un dato tessuto sottoposto al reattivo argentico date cellule presentano granulazioni ed altre no prospetta l'ipotesi che la variazione di comportamento di cellule -presumibilmente aventi uguali contenuti in acido ascorbico -rispetto al reattivo argentico, potrebbe dipendere dal fatto che sin dall'inizio della reazione alcune cellule si inescherebbero ed altre no: l'A. cioè postula l'esistenza di un'azione, non bene conosciuta, quale sarebbe questo inescamento (« amorçage »), quasi richiamando l'immagine, nella mente di chi legge, del paragone con un sifone che non funzioni se non è inescato.

CARUSO C. (4) che si è occupata (1938) di estendere ai Vegetali la reazione di GIROUD e LEBLOND, elenca numerose sostanze

(1) GIROUD A., LEBLOND C. P., RATSIMAMANGA R. et RABINOWICZ M., L'acide ascorbique ou vitamine C dans la cellule et sa détection, *Protoplasma*, 1936, 25 pagg. 115-123.

(2) GIROUD A. et LEBLOND C. P., L'acide ascorbique dans les tissus, Hermann e C., Paris, Rue de la Sorbonne 6, 1936, pagg. 1-47.

(3) GIROUD A., L'acide ascorbique dans la cellule ecc., già citato, pagg. 36 e 116.

(4) CARUSO C., Sul grado di specificità della reazione di Giroud-Leblond, per la ricerca istochimica della vitamina C, *Protoplasma*, 31, 1938, pagg. 285-288

inibitrici della reazione e conclude che la questione della specificità del reattivo di GIROUD-LLEBLOND per la vitamina C resta aperta.

In un lavoro successivo (1938) la CARUSO (1) continua la sperimentazione sulla reazione di GIROUD-LEBLOND sia in condizioni di luminosità che al buio, compie osservazioni sulle modalità di reazione dei nuclei e dei plastidi di varie specie ed ottiene riduzione del reattivo, da tannini, in *Lotus tetragonolobus*.

BOURNE (2) propone (1941) la seguente procedura allo scopo di aumentare la specificità per la vitamina C da parte del nitrato d'argento acidificato: i pezzi di tessuto si pongono per pochi minuti, all'oscuro, in una soluzione così composta: nitrato d'argento al 5‰, in acqua distillata, con aggiunta di 5 cc. di acido acetico glaciale. Si tratta, subito dopo, e sempre all'oscuro, con una soluzione di idrato ammonico al 5‰, per pochi minuti, poi si lava con acqua distillata.

Per quanto riguarda invece l'identificazione sia dell'acido ascorbico che del deidroascorbico GLICK riferisce che, secondo BOURNE, occorre operare così: il pezzo di tessuto viene esposto per parecchi minuti all'azione dei vapori di acido acetico glaciale; dopo aver tagliato in pezzi sottili il tessuto tali pezzi vengono tenuti, per 15 minuti, in un'atmosfera di acido solfidrico: ciò allo scopo di portare alla massima idrogenazione l'acido deidroascorbico; i pezzi poi sono sottoposti all'azione del vuoto, in un vacuum, per 10-30 minuti; in seguito i pezzi sono assoggettati ad una corrente di azoto per 15 minuti. Dopo di che si tratta colla soluzione di nitrato d'argento acidificata, come sopra, e poi con idrato d'ammonio come sopra.

Il GLICK infine nel suo Trattato, sempre riportando il metodo di BOURNE, riferisce che nel caso sia presente una quantità di glutazione tale da inibire la riduzione del nitrato d'argento da parte dell'acido ascorbico è opportuno lavare, rapidamente, il tessuto in acqua, dopo il trattamento con acido solfidrico, e quindi immergerlo per pochi minuti in una soluzione concentrata di acetato di mercurio; si lava di nuovo e si tratta poi con nitrato d'argento acidificato e quindi con ammoniaca.

DEANE H. W. e MORSE A. (1948) (3) operano così: i pezzi di tessuto si pongono in una soluzione costituita da alcool etilico 5 parti,

(1) CARUSO C., Nuove osservazioni sulla localizzazione di talune reazioni argentiche, *Protoplasma*, n. 31, 1938, pagg. 489-498.

(2) BOURNE, in: GLICK D., *Techniques ecc.*, già citato, pag. 54.

(3) DEANE H. W. and MORSE A., The cytological distribution of ascorbic acid in the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions, *The Anatomical Record*, 1948, 100, pagg. 127-136.

acqua distillata 4 parti, acido acetico glaciale 1 parte: il tutto contenente nitrato d'argento sino a saturazione. Detta soluzione costituisce il liquido di BARNETT e BOURNE. Dopo 30 minuti di permanenza dei pezzi, all'oscuro, in detta soluzione, DEANE e MORSE trasferiscono i pezzi, mediante pinze ricoperte con paraffina, in una soluzione così costituita: tiosolfato sodico, del comm., 5 g; bisolfito sodico, puro, 1 g; acqua distillata 100 cc.. In detta soluzione, sempre all'oscuro, i pezzi sono lasciati da 1 a 2 ore, a seconda dello spessore dei pezzi stessi. Dopo di ciò i pezzi sono lavati in acqua corrente, dalla sera al mattino.

c) METODI DI COLORAZIONE DELLE CELLULE.

Per quanto riguarda la colorazione del citoplasma e dei plastidi si possono eseguire colorazioni plasmatiche, ad esempio, con safranina, oltre che con rosso neutro; nei riguardi delle colorazioni plastidiali si può adoperare violetto di genziana: le dette colorazioni, attuate con la metodica indicata da JOHANSEN D. A. (1) si eseguono così: la colorazione con safranina è attuata in una miscela in parti eguali di safranina all'1% in alcool a 95° e di acqua distillata; dopo differenziamento con alcool a 95°, saturato con acido picrico, si attua la disidratazione.

La colorazione con violetto di genziana si attua con successo, secondo JOHANSEN, introducendo le sezioni in una miscela costituita da xilolo e 6-8 gocce di una soluzione di violetto di genziana, satura, in olio di garofani; di tanto in tanto, durante la colorazione, si aggiunge qualche goccia della soluzione satura del colorante in olio di garofani; dopo pochi secondi di differenziamento in una miscela in parti eguali di xilolo ed olio di garofani si lava in xilolo e poi si disidrata.

2. - METODI ADOTTATI.

a) METODO CHIMICO.

Le ragioni della preferenza da parte nostra per il metodo TILLMANS modificato da OTT sono dipese dal fatto che le modificazioni sopra accennate si manifestano come un metodo più preciso di altri.

Per quanto riguarda le modalità colle quali il suddetto metodo è stato da noi adottato rendiamo noto che le concentrazioni sia di

(1) JOHANSEN D. A., Plant microtechnique, 1940, Mc. Graw Hill, pag. 64 et passim.

indicatore che di acido ascorbico sono state quelle suggerite dal FRANCESCHELLI (vedi in precedenza); inoltre ci siamo serviti di un comparatore di HELLIGE, senza disco, in una delle provette del quale si sono fatte avvenire le reazioni e nell'altro si è lasciato in permanenza un testimone colorato allestito con opportune diluizioni di rosso e azzurro di anilina.

b) METODI CITOCHIMICI.

In merito poi ai saggi istochimici si è deciso di tralasciare il metodo di GLICK (1) non solo perchè non abbiamo potuto disporre dell'attrezzatura relativa necessaria (vaschette con agitatori elettromagnetici) ma anche perchè si è voluto studiare, anche e soprattutto, gli aspetti citochimici delle questioni inerenti all'identificazione dell'acido ascorbico nell'ambito delle singole cellule di un dato tessuto. Ci siamo quindi orientati verso la scelta della reazione argentica nonostante le ben note difficoltà presentate, in generale, dai saggi citochimici, ed, in particolare, da quelli al nitrato d'argento.

Prospettandosi quindi la necessità di dover dare un giudizio sulla scelta di uno dei tre metodi sopradescritti, cioè BOURNE, DEANE e MORSE, e GIROUD-LEBLOND, abbiamo ritenuto opportuno il provare tutti e tre i metodi suddetti perchè non ancora è stato attuato, a quanto ci risulta per la biologia vegetale, un paragone dei tre detti metodi.

I pezzi di tessuti sono stati sempre prelevati, contigui, per tutti e tre i gruppi di saggi citochimici, oltre che per quello chimico, da uno stesso frutto, oppure dai frutti di uno stesso settore di chioma, in pari condizioni di illuminazione e cresciuti su rami affini, oppure dai frutti di una stessa partita. (2)

I tempi d'azione durante i quali i pezzi di tessuto sono stati sottoposti ai vari reagenti sono stati i seguenti, per tutte le specie provate: nei riguardi del Bourne 15' (15 minuti primi) per la soluzione argentica, 10' per l'idrato ammonico, 12 ore per il lavaggio; nei riguardi del Deane e Morse 15' per la soluzione argentica, 2 ore per la soluzione di tiosolfato e bisolfito, 12 ore di lavaggio; nei riguardi del Giroud 3' in soluzione di levulosio, 10' per la soluzione argentica, 3 ore per il lavaggio in acqua con cambiamento ogni 20', 20' in soluzione satura di iposolfito, 30' in acqua corrente.

Inoltre i suddetti tre metodi citochimici sono stati attuati in due serie, una con ed una senza il previo trattamento di idroge-

(1) GLICK D., The chemical ecc., già citato.

(2) Quest'ultima espressione, cioè frutti di una stessa partita, si riferisce a frutti di specie diversa dal pesco (vedi in seguito).

nazione riportato da GLICK. Non avendo però potuto disporre dell'azoto il metodo è stato attuato con le modifiche che seguono ed adottando i tempi che seguono: vapori di acido acetico glaciale 15', vapori di acido solfidrico 15', vacuum a 45 mm. di depressione 20', corrente di anidride carbonica 15', soluzione di acetato di mercurio saturo 3', lavaggio 1'.

Segnalato che anche questo metodo di idrogenazione, e forse anche altri metodi affini, a quanto ci risulta, sono nuovi per la biologia vegetale, possiamo ad osservare che, eccettuata l'adozione da noi fatta dei suddetti tempi, l'unica variante qualitativa adottata rispetto alle indicazioni di GLICK è stata quella della sostituzione dell'azoto mediante anidride carbonica: e ciò in quanto la presumibile azione, non spiegata dal GLICK, esercitata dall'azoto esplicante la sua tipica funzione di gas inerte, è quella di allontanare completamente dai pezzi — azione peraltro già in parte realizzata mediante la depressione operata dal vacuum — ulteriori eventuali tracce di vapori degli acidi acetico e solfidrico, la permanenza di tracce dei quali avrebbe potuto implicare variazioni di acidità sul reattivo seguente, il nitrato d'argento acidificato.

In sostanza, dunque, sono stati predisposti, e poi attuati, i seguenti gruppi di prove:

Col reattivo di BOURNE (I):

Prove I a: 1) vapori di acido acetico glaciale, 2) vapori di acido solfidrico, 3) vacuum, 4) anidride carbonica, 5) lavaggio, breve, 6) acetato di mercurio, 7) lavaggio, breve, 8) nitrato d'argento, 9) ammoniaca, 10) acqua distillata, 11) lavaggio, prolungato.

Prove I b: come le precedenti ma senza 5) (allo scopo di provare la differenza con e senza lavaggio, tenendo presente la ben nota caratteristica della vitamina C di essere cioè idrosolubile).

Prove I c: come le I a ma senza i numeri 5), 6) e 7) (per provare la differenza con e senza allontanamento di eventuale glutazione).

Prove I d: come I a ma senza i numeri da 1) a 7) (al fine di provare le differenze di reazione con e senza eventuale trasformazione di acido deidroascorbico in ascorbico).

Col reattivo di DEANE e MORSE (II):

Prova II: quella consistente nel metodo indicato dagli AA. (vedi in precedenza).

Col reattivo di GIROUD (di GIROUD e LEBLOND) (III):

Prove III a: da 1) a 7) come in I a e poi col Giroud, come descritto precedentemente (pag. 17).

Prove III b: Giroud tipico, come descritto precedentemente, in bibliografia.

Prove III c: Giroud tipico, ma senza trattamento con levulosio.

Prove III d: Giroud ridotto cioè come in III b ma con liquido argenteo avente la quantità di nitrato d'argento dimezzata.

Prove di « Giroud-Bourne » (IV):

Prove IV a: Giroud tipico e poi idrato d'ammonio al 3%.

Prove IV b: come IV a ma con idrato d'ammonio allo 0,1%.

Prove IV c: » » » » » 0,08%.

Prove IV d: » » » » » 0,06%.

Le prove n. IV sono state istituite per tentare, se pure in maniera incompleta, una fusione di parti, e quindi un paragone, dei due metodi, quello di GIROUD e quello di BOURNE.

c) MODALITÀ E SVOLGIMENTO DELLE INDAGINI CHIMICHE E CITOCHIMICHE.

All'inizio delle presenti ricerche si era stabilito di attuare, oltre ai saggi chimici, anche saggi citochimici per l'acido ascorbico rivolti a stabilire eventuali differenze nell'ubicazione dell'acido ascorbico stesso nei tessuti: era stato cioè deciso di sottoporre ad indagini citochimiche tutti i frutti sottoposti ad indagini chimiche, seguendo il criterio di sottoporre ad indagine chimiche e citochimiche pezzi di ogni dato frutto oppure pezzi di frutti cresciuti su uno stesso settore e che avevano goduto pari condizioni (trattamenti, luminosità, formazioni su rami affini).

In realtà però nel periodo di giorni - periodo che si è cercato di ridurre al massimo possibile - intercorso fra il prelievo delle fette dalle pesche per il saggio chimico e quello del prelievo dei pezzi per i saggi istochimici si è verificata, nonostante la conservazione in frigorifero alla quale si era ricorso sin dopo poco tempo dalla raccolta, la marcescenza di un gran numero di frutti, a causa, come già detto, di un'infestione di « mosca della frutta » alla quale sono andate soggette una parte rilevante delle 56 pesche raccolte il 15 settembre, per le analisi; poco dopo tale epoca vi è stata cascola abbondante di frutti dall'albero, per la stessa ragione. Cosicché le indagini citochimiche hanno dovuto essere delimitate rispetto al previsto.

La predetta raccolta di 56 pesche è stata attuata, nei riguardi di 48 di esse, come già detto, in ragione di 6 pesche per ciascuno degli 8 settori della chioma (3 pesche un pò ombreggiate e 3 più soleggiate) e prevedendo sia che il numero di saggi chimici dovesse essere di 16, ciascun saggio interessando una data terna di frutti, sia che ogni pesca avrebbe dovuto fornire quattro tasselli di tes-

suto per i saggi citochimici, cioè per le prove I, II e III (vedi paragrafo precedente; la prova IV è stata decisa posteriormente e non ha interessato le pesche).

I saggi chimici, dunque, sono stati attuati colle modalità che seguono: per n. 48 pesche, tenute ovviamente distinte per terne e per settori (vedi fig. 1), si è rilevato da ciascun frutto una fetta, coll'esocarpo, dalla faccia meno invaiata; l'esocarpo con un pò di polpa ad esso connata, ossia ciò che chiamiamo buccia, ha rappresentato il 30% circa del peso totale di ogni fetta; le facce meno invaiate sono risultate, per tutti i frutti, di colorazione più omogenea, ovviamente, rispetto alle facce più invaiate ed inoltre non hanno presentato, almeno macroscopicamente, attacchi di «mosca». Le fette prelevate dalle pesche di ciascuna terna sono state poi tagliate in maniera tale da poter comporre una fetta, per così dire artificiale, ma di forma regolare, costituita di tre pezzi, ciascuno dei quali proveniente da una delle tre fette della terna relativa; il peso di tale fetta «artificiale» è stato portato a 25 g..

Nei riguardi di altre 4 delle 56 pesche suddette (una un pò ombreggiata ed una più soleggiata prelevate dal settore I, e similmente per il settore IV) l'analisi chimica ha riguardato la sola buccia; il prelievo di quest'ultima è stato sempre fatto dalle facce meno invaiate, anche in questo caso trovantesi in condizioni come sopra detto nei riguardi di eventuali attacchi di mosca. Infine per le altre 4, prelevate come le 4 precedenti, le fette, coll'esocarpo, anch'esse prelevate dalle facce meno invaiate e non parassitate, hanno comportato l'inclusione anche di parti profonde della polpa, ossia quasi in vicinanza immediata dell'endocarpo. Il rapporto in peso tra buccia e polpa, in quest'ultimo caso del terzo gruppo di 4 pesche, è stato regolato in modo che la buccia rappresentasse sempre, come cioè nel primo caso delle 16 terne di pesche detto sopra, il 30% circa del peso totale della sostanza fresca di ogni campione sottoposto ad analisi chimica.

Ma sia allo scopo di controllare bene l'applicazione dei metodi di analisi che allo scopo di paragonare meglio metodi chimici e citochimici di individuazione dell'acido ascorbico, si è fatto ricorso all'applicazione dei due gruppi di metodi suddetti su altre 6 specie, scelte in maniera che i relativi contenuti vitaminici C, accertati da Ricercatori precedenti, se pure con altri metodi, fossero sensibilmente diversi gli uni dagli altri: sono state così scelte mele «Annurca» provenienti dalla contrada «Laviniaio» (Melito), Kaki prelevati dal mercato di Napoli, talami di rosa «Gloria di Roma» prelevate dal mercato dei fiori di Napoli, pomodori «tipo» «da

serbo » (non meglio identificati) prelevati anche allo stesso mercato di Napoli, peperoni gialli « tipo » di Nocera (Napoli) e turioni di asparago provenienti dalla Riviera Ligure e già conservati in ghiacciaia da tempo all'atto in cui sono stati acquistati.

Riepilogando, dunque, le specie sottoposte ad esame chimico sono state: 1°) pesco, 48 frutti, dei quali 16 terne (fig. 1) riguardanti fette con esocarpo; 4 frutti solo buccia e 4 riguardanti anche polpa profonda; 2°) melo, 4 frutti, dai quali le fette sono state ricavate anche in corrispondenza delle facce meno invaiate, senza buccia; 3°) peperone, 3 frutti, gialli, da ciascuno dei quali il prelievo è stato attuato rilevando tessuti, senza esocarpo, da zone tutte gialle, senza includere cioè parti verdi, e senza includere nè settori interni del frutto nè semi; 4°) asparago, turioni, cioè le estremità apicali, senza parti libere; 5°) rosa, talami, senza nè epidermide, nè strati clorenchimatici, nè parti libere dei fillomi fiorali; 6°) pomodoro, solo polpa, senza nè buccia nè semi.

Sono state quindi attuate 34 determinazioni chimiche della vitamina C totale (senza computare alcune prove preliminari ed alcune altre integrative).

Durante le operazioni di estrazione dei succhi alla centrifuga i liquidi estratti sono stati protetti dalla luce mediante carta nera in relazione alla nota proprietà della vitamina C di inattivarsi alla luce e, ad operazioni quotidiane ultimate, conservati in frigorifero.

Nei riguardi delle prove citochimiche rendiamo noto che mediante una lametta sottile, a facce parallele e ben tagliente, dopo l'allontanamento di una fetta avente al centro uno spessore di circa 1 cm., per quanto concerne mele e pesche, si sono ricavati per ciascun frutto quattro parallelepipedi rettangolari di tessuto aventi l'asse maggiore parallelo all'asse peduncolo - rosetta (mele) oppure peduncolo - cicatrice stilare (pesche); detti pezzi avevano le dimensioni di cm. $2 \times 0,5 \times 0,5$; nei riguardi del pomodoro e peperone veniva rilevato, dopo allontanamento della buccia, un parallelepipedo rettangolare di lunghezza eguale a quella per le specie precedenti, cioè melo e pesco, ma lievemente meno spesso nei riguardi del peperone, in quanto per detta ultima specie non si sono incluse, anche per questi saggi citochimici, parti interne, ossia costole a contatto colla periferia del frutto, nè semi; nei riguardi della rosa il prelievo è stato attuato come per i suddetti saggi chimici, conducendo le indagini su pezzi di talamo risultanti ciascuno di circa mezzo cm. di lunghezza; infine, per il Kaki, i pezzi sono stati rilevati in sostanza come sopra detto per le mele e per le pesche, coll'unica variante consistente nel fatto che presentandosi i

frutti di detta specie con facce della stessa tonalità di invaiatura la scelta delle facce da cui fare il prelievo è stata indifferente.

Riepilogando, dunque, per quanto riguarda i saggi citochimici, dopo aver ricordato che i detti saggi sono stati condotti o sugli stessi frutti sottoposti ad analisi chimica o su frutti di una stessa partita, rendiamo noto che la ripartizione delle specie fra le varie prove citochimiche è stata la seguente: (vedi riepilogo delle prove a pagg. 22-23); prove I relative alle pesche delle terne n.° 1, 2, 7 ed 8 della fig. 1, mele, pomodori, peperoni ed asparagi; prova II relativa solo alle pesche delle terne n. 1 e 7; prove III relative alle pesche n. 1, 2, 7 ed 8 della figura 1, mele, pomodori, peperoni ed asparagi; prove IV relative a mele, pomodori e peperoni. Cosichè il numero di saggi citochimici eseguiti, senza computare le prove in bianco, è stato di 124, così ripartiti:

- 1°) *pesche*: 16 saggi alle prove I, dei quali 4 per ciascuna delle prove, a, b, c, e d;
4 saggi alla prova II;
12 saggi alle prove III, dei quali 4 per la prova a, 4 per la prova b e 4 per la prova c;
0 saggi alle prove IV;
- 2°) *mele*: 8 saggi alle prove I dei quali 2 per ciascuna delle prove a, b, c e d;
0 saggi alla prova II;
8 saggi alle prove III, dei quali 2 per ciascuna delle prove a, b, c, e d;
8 saggi alle prove IV;
- 3°) *pomodori*: 4 saggi alle prove I, dei quali 2 alla prova a e 2 alla prova d; (prove I b e c omesse per mancanza di materiale adatto);
0 saggi alla prova II;
8 saggi alle prove III, dei quali 2 per ciascuna prova a, b, c, d;
8 saggi alle prove IV, dei quali 2 per ciascuna prova a, b, c, d;
- 4°) *peperoni*: 8 saggi alle prove I dei quali 2 per ciascuna prova a, b, c e d;
0 saggi alla prova II;
8 saggi alle prove III, dei quali 2 per ciascuna prova a, b, c, d;
8 saggi per le prove IV, dei quali 2 per ciascuna delle prove a, b, c e d;
- 5°) *asparagi*: 8 saggi alle prove I dei quali 2 per ciascuna prova a, b, c e d;
0 saggi alla prova II;

8 saggi alle prova III, dei quali 2 per ciascuna prova a, b, c, d;
0 saggi alle prove IV;

6°) *rose*: 4 saggi alle prove I, dei quali 1 per ciascuna prova a, b, c, d;
0 saggi alle prove II, III e IV;

7°) *Kaki*: come per *rose*.

Negli intervalli fra una prova e le altre i frutti sono stati conservati in frigorifero; le facce dei tagli presentanti ossidazioni sono state scartate ed inoltre non si è fatto mai ricorso al prelievo di tessuti da frutti che avendone già forniti precedentemente fossero invecchiati di più che poche ore.

Riteniamo infine necessario aggiungere, ancora in rapporto alle modalità adottate nei riguardi delle prove citochimiche, che dopo l'individuazione dei pezzi, condotta cercando di esercitare colla lametta sui pezzi stessi la minore compressione possibile, questi venivano asciugati su carta bibula pulita e quindi introdotti in garza.

A prescindere dalla prova di DEANE e MORSE, che è stata delimitata soltanto, come sopra detto, alle pesche e che è stata eseguita con tutti gli accorgimenti suggeriti dagli AA. che l'hanno istituita per primi, rendiamo noto che nei riguardi delle prove citochimiche I e III mentre in un primo tempo abbiamo usato, per le pesche, dei piccoli cristallizzatori, nei quali, all'oscuro, venivano introdotti i pezzi, in un secondo tempo, per le pesche e per tutte le altre specie esaminate, si è ritenuto opportuno di adoperare inclusione, lassa, dei pezzi stessi in garza, tagliata in forma di rettangolini; mediante detto semplice accorgimento - per quanto l'innovazione ad un primo esame possa sembrare trascurabile - si sono realizzati i seguenti scopi: si è incominciato ad osservare che quando un pezzo di tessuto viene adagiato sul fondo di un recipiente e messo a contatto col reattivo argentario, e poi dei successivi liquidi, la faccia adagiata resta incolore o poco colorata; mentre quando il pezzo di tessuto è posto in garza e rimane sospeso nel liquido di reazione la colorazione di tutte le facce risulta perfettamente eguale, almeno macroscopicamente e per i casi rappresentati dalle specie da noi studiate. Basterebbe questa semplice osservazione per confermare quanto affermato da GIROUD e COLLRI (1) in merito all'intensità della reazione argenterica in funzione della concentrazione di nitrato adoperata. Inoltre, mediante l'uso d'inclusione in garza, ad un unico filo di sottile spago, pulito, può essere legata tutta una serie di diversi tessuti che debbano ricevere lo stesso tratta-

(1) GIROUD A., LEBLOND C. P., e COLLRI, L'acide ascorbique ecc., già citato

mento; così facendo si agevolano le operazioni di trasferimento di pezzi da un reattivo al seguente, operazioni che, come già detto, devono avvenire all'oscuro, si eliminano rischi di confusione di pezzi e si risparmia tempo. Durante il tempo d'azione dei vari liquidi, di tanto in tanto, è bene operare, come abbiamo fatto noi, una lieve agitazione del contenuto dei recipienti.

Si potrebbe obiettare, a questo punto, che la riunione di più pezzi appartenenti a specie diverse in un reattivo contenuto in unico recipiente possa implicare alterazioni dei risultati rispetto al caso in cui i tessuti di ogni specie vengano fatti reagire separatamente da quelli delle altre. Noi però abbiamo paragonato i risultati che si ottengono nei due casi non solo per il pesco ma anche per tutte le altre specie e combinazioni sperimentali, escluso rosa e Kaki, intendendo qui, per combinazioni sperimentali, le sole prove I d, II d, III d, e IV d. Per tutte e due le alternative i risultati sono invariati.

d) METODI DI COLORAZIONE DELLE CELLULE.

I pezzi sono stati previamente fissati in liquido di BOURNE (vedi pag. 19) coll'unica variante dell'assenza in esso di nitrato d'argento: in tale maniera ci si è posti nelle migliori condizioni di omogeneità nel paragonare strutture citologiche di tessuti fissati e colorati con tessuti sottoposti esclusivamente all'azione di un reattivo argentario, specie quello di Bourne; sempre a tale proposito il tempo di fissazione è stato delimitato a 30 ore.

I pezzi sottoposti al fissativo sono stati delle stesse dimensioni e sono stati prelevati colle stesse modalità di quelli adoperati per i saggi citochimici.

I metodi di colorazione sono stati quelli sopra descritti, seguendo JOHANSEN.

Melo, pesco, peperone e pomodoro sono state le specie sottoposte al presente esame. I tempi di colorazione e differenziamento, oltre che quelli di fissazione, sono stati eguali per tutte e quattro le specie qui accennate.

CAPITOLO III

Risultati.

1. - Risultati degli esami chimici. - 2. Risultati degli esami citochimici: a) Risultati macroscopici. b) Risultati degli esami microscopici, c) Descrizione delle figure. - 3. Colorazioni delle cellule.

1. - RISULTATI DEGLI ESAMI CHIMICI.

Nonostante l'attacco, già ricordato, di « mosca della frutta » siamo entrati nell'ordine di idee di continuare le presenti ricerche assumendo però come principale finalità del lavoro, secondo quanto già detto, il paragone tra i metodi citochimici e chimici di individuazione dell'acido ascorbico.

Sull'asse delle X (fig. 1) sono stati riportati sedici segmenti dei quali otto a spessore rilevante e scuri ed otto sottili, alternati, indicanti rispettivamente terne di pesche un pò ombreggiate e terne di pesche al sole: i numeri arabi sotto ciascun segmento, oltre che per il cerchio raffigurante la chioma, indicano il numero d'ordine assegnato ad una terna di frutti; i numeri romani, come già prima indicato per il cerchio ossia per la chioma, sono riportati sia per il cerchio stesso che sull'asse delle ascisse ed indicano, come anche già detto, le qualità di trattamento (I e I' testimoni, II e II' 480% di ECE, III e III' 800% di ECE, IV e IV' 1600% di ECE).

Sull'asse delle Y sono state riportate le quantità di vitamina C totale risultate alle analisi, indicate, di 10 in 10, come milligrammi di vitamina C totale per ogni 100 g. di tessuto fresco, con esocarpo.

Si può agevolmente rilevare che i valori di vitamina C totale, nell'ambito di ciascuno degli otto settori di chioma, sono indistintamente più alti per i frutti all'ombra (numeri dispari) rispetto a quelli illuminati (numeri pari) e dello stesso settore. Inoltre, la linea, ideale, che si può immaginare congiunga i valori alla luce, si avvicina di più ad una parallela all'asse delle X; l'altra, dei valori all'ombra, presenta maggiore divario. I punti di maggiore variazione della linea dei frutti illuminati si riducono essenzialmente ad uno, in corrispondenza del numero 4; i punti, invece, di maggiore variazione della linea dei frutti all'ombra sono due e cioè i numeri 3 e 5.

In sostanza, a questo punto, l'interpretazione dei risultati è agevola'ta dalla localizzazione del ragionamento intorno ai due seguenti rilievi: 1°) l'opportuna impostazione sperimentale, consistente nella ripetizione di ciascun tema per due volte, ci mette in grado di notare che mentre in un caso (I, II, III e IV) si sono avute, per i frutti all'ombra, due «punte» in alto, (3 e 5), nell'altro (I', II' III', e IV') i valori corrispondenti a 3 e 5, cioè i valori 11 e 13, si possono considerare come non rappresentati da punte in quanto l'incremento di 11 e 13 rispetto a 9 (testimonio) è bassissimo o nullo; d'altra parte poi, correlativamente a detto bassissimo incremento di 11 e 13 rispetto a 9 v'è da considerare un netto decremento di 7 rispetto a 5 e di 5 rispetto a 3; infine mentre da 1 si sale, con forte balzo, a 3, il passaggio da 9 a 11 avviene tra valori uguali; 2°) il secondo ordine di rilievi considera un paragone tra le diverse lunghezze (linee tratteggiate verticali) delle linee di caduta della concentrazione vitaminica all'atto del passaggio dei frutti da verdi a maturi; mentre in II e III dette linee sono abbastanza lunghe, in II' e III' sono abbastanza ridotte.

Siccome ora i punti di arrivo di questa caduta (4, 6, 12, e 14) sono quasi tutti ad uno stesso livello (6, 12 e 14), occorre desumere, tenendo presenti anche gli altri rilievi or ora fatti, che le punte in alto presentate dai frutti 3, 4 e 5 non sono, probabilmente, dovute al trattamento bensì sono dovute al fatto che il grado di maturità di detti ultimi frutti, all'atto della raccolta, era un pò più arretrato di quello di tutti gli altri, per quanto ciò all'apparenza non risultasse.

Per quanto riguarda i risultati alle prove chimiche forniti dalle sole bucce di quattro pesche (due, come detto, prelevate un pò ombreggiate, dai settori I e IV, ed altre due, soleggiate, prelevate dagli stessi settori, vedi paragrafo precedente) v'è da osservare che ciascuno di essi è stato maggiore, di alcune unità, (sempre espresse in mg.) rispetto ai relativi risultati indicati in fig. 1, cioè ai casi di pesche in identiche condizioni sperimentali ma aventi fornito all'analisi oltre che esocarpo anche tessuti polposi. Ciò vuol dire che, a parità di peso, nella buccia v'è una quantità di vitamina C superiore che nei tessuti polposi, in quanto, come detto nel paragrafo dei metodi, ogni fetta conteneva, in peso, circa il 30 % di buccia; inoltre, sempre tenendo presente il rapporto in peso tra buccia e polpa abbiamo calcolato che i valori indicati nella fig. 1, se immaginati diminuiti ciascuno di alcune unità, possono praticamente rappresentare anche valori di vitamina C relativi al caso in cui le 16 prime analisi fossero state condotte sulla sola polpa.

Nei riguardi poi dei risultati offerti dalle altre quattro pesche

aventi fornito all'analisi anche polpa profonda oltre che superficiale, così cioè come detto al paragrafo dei metodi, v'è da dire che essi sono tutti e quattro molto vicini a quelli delle pesche in pari condizioni sperimentali, delle quali ultime i risultati sono illustrati nella fig. 1. Detti ultimi risultati, quelli cioè relativi alle analisi di esocarpo più polpa, compresa la polpa profonda, come del resto quelli immediatamente precedenti concernenti la sola buccia, sono, dunque, in perfetta corrispondenza con i relativi risultati illustrati sopra a proposito del primo gruppo di 16 terne di pesche.

In conclusione, dunque, desumiamo che, probabilmente, i trattamenti con isomero γ di ECE non hanno avuto alcun effetto nell'incrementare il tasso vitaminico C e che le variazioni in contenuto vitaminico C sono dovute, come già detto, soprattutto al grado di illuminazione ed all'esposizione, e quindi al grado di maturazione dei frutti stessi.

Nei riguardi poi dei risultati chimici relativi alle altre specie non trattate con ECE ma introdotte nelle presenti ricerche, come detto, allo scopo di compiere osservazioni comparative sui metodi chimici e citochimici, rendiamo noto che i valori da noi ottenuti al Tillmans-Ott sono stati i seguenti (medie dei saggi attuati per ciascuna specie): mele 13 (mg. di vitamina C totale per 100 gr. di tessuto fresco), peperoni 84, rose 300, pomodori 42, asparago 48. Valori questi che si avvicinano a quelli di TILLMANS (1) se si eccettuano i casi dell'asparago e del peperone. Ma le condizioni sperimentali da noi realizzate (mancanza degli esocarpi, condizioni di conservazione e grado di maturazione o di invecchiamento dei frutti stessi ed, infine, metodo chimico diverso) possono senza dubbio giustificare il suddetto divario. (2)

(1) GIROUD A., L'acide ascorbique dans ecc., *Protoplasma* ecc., già citato, pagg. 134-135.

(2) HARRIS L. J. and RAY S. N., Specificity of hexuronic acid as an antiscorbutic factor, *Biochem. J.*, 27., 1933, pag. 580, in: GIROUD A., L'acide ascorbique ecc. *Protoplasma*, già citato. Vedi inoltre, ad esempio: SAHADES RAO e COLL, Contenuto di vitamina C nell'erba medica e fattori che controllano la sua stabilità (titolo in inglese), *Proceedings of Indian Academy of Sciences*, 1949, 30 B, 331, in: *Chemical Abstracts*, 1950, 44, 14, 6544.

2. - RISULTATI DEGLI ESAMI CITOCHIMICI.

a) RISULTATI MACROSCOPICI.

Al Deane e Morse l'annerimento dei pezzi di pesche, osservati « in toto », è completo.

Risultati simili si ottengono da tutte e quattro le prove di BOURNE, (pesche, mele, pomodori, peperoni, kaki, rose ed asparagi, ricordando che, nei riguardi del pomodoro, le prove I b e I c non sono state eseguite); i pezzi « in toto » di tutte queste specie si presentano, dopo il trattamento, a superficie uniformemente nera, quelli di rosa e kaki a superficie nerissima; fa eccezione l'asparago in cui la superficie è apparsa molto nera ma non uniformemente, cioè a chiazze abbastanza rade.

Alle prove di GIROUD, invece, è risultato quanto segue: nei riguardi delle prove III a, b, e c, (pesche n° 1, 2, 7 ed 8, fig. 1, mele, pomodori, peperoni ed asparagi) si è verificata, sempre nei riguardi di pezzi non ancora sezionati, un'assunzione di colore giallino da parte dei pezzi di tutte le specie precedenti, escluso il peperone che è risultato nero, come cioè nel caso delle prove n. I suddette; l'asparago, poi, oltre a presentare la superficie delle facce di colore fondamentale giallino, ha manifestato alcune macule scure irregolarmente distribuite; inoltre tutti i pezzi, ossia i pezzi di tutte le specie provate - con l'esclusione dei pezzi di peperone ed asparago - hanno presentato una specie di « nucleo » nero verso il centro dei pezzi stessi, nucleo esteso in media circa mezzo centimetro ed osservabile per trasparenza dall'esterno, senza cioè bisogno di sezionare i pezzi stessi. Alle prove III d (mele, pomodori, peperoni ed asparagi) i risultati sono stati sostanzialmente affini a quelli immediatamente sopra descritti riguardanti le prime tre prove di GIROUD, con l'unica variante che i pezzi di polpa di mela non hanno presentato il nucleo scuro centrale sopradetto.

Mele, pomodori e peperoni sottoposti alle prove IV hanno dato i seguenti risultati: per quanto riguarda le prove IV a si sono ottenuti risultati del tutto identici a quelli delle prove I, ossia annerimenti completi della superficie esterna dei pezzi; nei riguardi delle prove IV b, c e d mentre i pezzi di mele si sono presentati a superficie uniformemente chiara, i pezzi di pomodori sono risultati irregolarmente scuri, a chiazze, e quelli di peperone irregolarmente neri, anche a chiazze. Da notare, però, a proposito del presente ultimo gruppo di prove n° IV, che la descrizione della colorazione presentata dalle mele è relativa a tempi di pochissimo posteriori rispetto al termine dell'ottenimento delle reazioni stesse,

cioè rispetto al lavaggio finale; alcuni pezzi di mela cioè se lasciati perdurare a lungo alla luce, dopo il definitivo ultimo lavaggio, hanno manifestato oscurimenti: fatto, questo, che ha lasciato adito all'ipotesi che il fenomeno, come è stato poi confermato dagli esami microscopici, dipendesse dalla presenza di cloruri. Inoltre il predetto intensificarsi del colore alla luce non si è verificato per tutti i pezzi di mele trattati, ma solo nei riguardi di 1 su 6 pezzi (prove IV b, c e d) sottoposti al trattamento stesso.

b) RISULTATI DEGLI ESAMI MICROSCOPICI.

Mentre i Cultori di citologia animale hanno, almeno nella maggior parte dei casi noti allo scrivente, adottato metodi di imparafrinaggio dopo aver attuato una reazione argenticca, noi abbiamo invece preferito ricorrere ad osservazioni di tessuti a fresco, trattati con un reattivo argentico ma senza colorazione, oppure sottoposti a macerazione della lamella mediana dopo l'azione di un reattivo argentico e sempre senza colorazione. Siamo stati indotti a seguire la predetta tecnica dall'aver tenuto in conto l'osservazione, di larga veduta, fatta dal GIROUD (1), relativa alla maggiore abbondanza di sostanza plasmatica delle cellule animali rispetto alle vegetali, ossia alla relativa mancanza, nelle cellule animali, di vacuoli, contrapposta alla presenza di questi ultimi nelle cellule vegetali adulte. Pur senza condurre esperienze comparative in proposito abbiamo pensato che l'allontanamento per dilavamento delle granulazioni argenticche, o di altri prodotti di reazione, può avvenire più facilmente quando le granulazioni stesse si sono formate in cavità vacuolari che quando esse siano ottenute in seno al plasma.

Per le suddette ragioni, essendo partiti da pezzi da pochissimo tempo prelevati dal frutto, non fissati, asciugati del poco succo da essi gemente, abbiamo sottoposto questi ad uno dei metodi suddetti di reazione argentica, all'oscuro. Dopo lavaggio a lungo dei pezzi in acqua, facendo poi perdurare il minor tempo possibile alla luce i pezzi stessi, abbiamo ricavato da ciascun pezzo una sezione a mano, la più sottile possibile, interessante sempre gli strati più esterni di cellule del pezzo stesso: immessa la sezione in soluzione di cloralio idrato, dopo disintegrazione, operata con gli aghi, della lamella mediana relativa ad un certo numero di cellule della sezione stessa, si è eseguita l'osservazione.

(1) GIROUD A., L'acide ascorbique ecc., *Protoplasma* ecc., già citato, pagg. 104-105.

Allo scopo poi di ottenere un maggior numero di cellule adatte all'osservazione per ciascuno dei preparati da allestire, si è pensato di paragonare per ciascun pezzo di tessuto sezioni preparate come detto sopra con sezioni, come le precedenti sia per spessore che per modalità di prelievo dal pezzo stesso, ma bollite ciascuna in 5 cc. di idrato potassico al 7% per 24 secondi, poi lavate in acqua e quindi totalmente disintegrate a mezzo di aghi sottili ed elastici, cioè quelli adoperati dagli entomologi per i microlepidotteri.

Di diversi metodi (1) di disintegrazione del pectato di calcio della lamella mediana, quello di SCHULTZE, quello consistente nella macerazione con acido cromatico, quello di FISCHER e quello con idrato sodico, è stato scelto quest'ultimo - sostituendo l'idrato sodico con potassico - in quanto negli alcali forti anche a caldo, rispetto alle sostanze e modalità adoperate negli altri tre metodi precedenti, l'argento elementare non si scioglie.

c) DESCRIZIONE DELLE FIGURE.

Le cellule provenienti dalla predetta macerazione sembra non abbiano subito variazione per numero e ravvicinamento delle granulazioni argentiche. Di siffatte cellule provenienti da macerazione ci si è serviti come primo esame. Facendo ora riferimento,

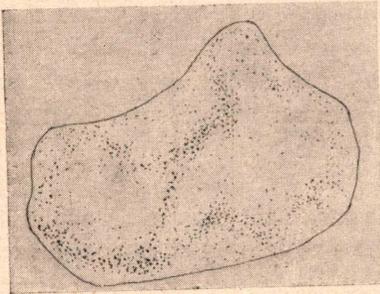


Fig. 2 - Cellula del parenchima di mela "Annurca", trattata al Bourne: granulazioni piccole e numerose.

come sopra detto, soltanto alle cellule degli strati più esterni di ciascun pezzo di tessuto e riferendoci inoltre alle cellule più scure ossia a più intensa reazione si riportano i seguenti risultati relativi ad osservazioni fatte col metodo a fresco, in cloralio, e senza aggiunta di coloranti.

Le figg. da 2 a 5 riguardano risultati alle prove di BOURNE offerti rispettivamente da pesche, mele, pomodori e peperoni; dette

figure possono essere rappresentative di tutte e quattro le prove I, cioè a, b, c, e d, in quanto all'osservazione microscopica non si rilevano, nell'ambito di ciascuna specie, differenze salienti, pur variando cioè le modalità della prova di BOURNE stessa (a, b, c, e d); v'è però da avvertire che, nei riguardi del pomodoro, le prove

(1) DOP. P. et GAUTIER' A., Manuel de technique botanique, Paris, 1928, p. 47.

I b e I c non sono state eseguite, come prima detto, a causa di mancanza di materiale adatto; inoltre, nei riguardi non solo dello stesso pomodoro ma anche del peperone, le modalità manifestate dalle due dette specie alla prova I a sono diverse da quelle manifestate alle altre prove.

La fig. 2 rappresenta una cellula dello strato cellulare esterno di parenchima di mela «Annurca»: il numero di granulazioni argentiche è alto ma le granulazioni sono molte piccole, di qualche μ di diametro, e scure; sono distribuite in strati situati a diverse profondità nei riguardi dello spessore della cellula; per quest'ultima ragione, dato che il fatto si ripete, se pure con intensità minore nei riguardi delle altre specie, è stato preferito il metodo di rappresentazione con disegni alla camera lucida invece che con microfotografie; il nucleo non si distingue, come del resto avviene nella quasi totalità dei casi, cioè delle specie studiate. Il colore di fondo, o generale, della cellula è scuro.

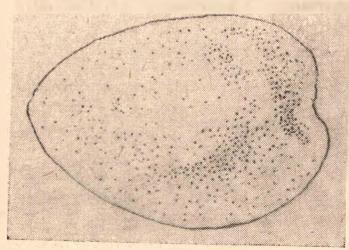


Fig. 3 - Cellula di polpa di pesca "Terzarola", trattata al Bourne: granulazioni come in fig. 2.

Fatti analoghi a quelli ora ora descritti si osservano nei riguardi della pesca, fig. 3, per quanto concerne dimensioni, colorazione, quantità e distribuzione delle granulazioni argentiche; la colorazione di fondo delle cellule è affine a quella precedente.

Nei riguardi invece del pomodoro, fig. 4, è stato osservato (prova I d, di BOURNE) quel tipo di reazione che si può definire « concentrata » o « ad ammassi » e che potrebbe corrispondere, verosimilmente, alle reazioni che GIROUD e COLL. RI (1) chiamano « golgiana » e « perigolgiana », coll'ovvia variante che qui, cioè per i Vegetali, non esiste apparato di Golgi. L'impressione dell'osservatore è di intravedere delle granulazioni elementari, in realtà non bene distinguibili, riunite o imbrigliate da sostanza plasmatica. Il colore fondamentale della cellula è giallino-rossastro, in correlazione anche col colore che hanno le cellule testimoni non colorate; gli ammassi sono di una tonalità più chiara delle granulazioni sia della mela che della pesca precedente. Le dimensioni medie degli ammassi sono sensibilmente maggiori delle granula-

(1) GIROUD A. e COLL. RI, L'acide ascorbique ecc., già citato.

zioni delle cellule precedenti, risultando, gli ammassi più grossi, di circa una quindicina di μ in media, come diametro approssimativo.

La fig. 5 rappresenta una cellula di peperone: qui si hanno granulazioni, molto scure, di due dimensioni; le maggiori sono più piccole degli ammassi precedenti del pomodoro e più grosse sia delle granulazioni delle pesche che delle mele. Tali granulazioni maggiori misurano circa 5μ di diametro. La colorazione di fondo delle cellule è anche in questo caso scura (prove I b, c e d).

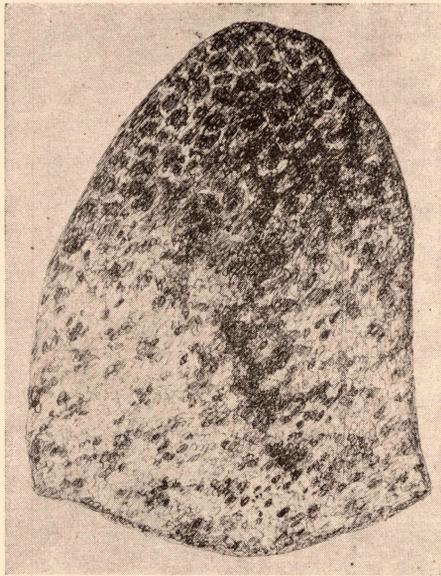


Fig. 4 - Cellula di polpa di pomodoro al Bourne: reazione "ad ammassi,,.

La fig. 6 a rappresenta una cellula di turione di asparago appartenente ad una sezione ricavata da tessuto perivasale di parte apicale di turione; solo quindi per il presente caso dell'asparago il prelievo delle cellule, come unica eccezione, è stato fatto da strati interni; gli strati esterni, sono, come già detto, irregolarmente anneriti, irregolarità, del resto, che si verifica anche nei riguardi dei tessuti interni dei pezzi. Si tratta, dunque, come detto, di una cellula perivasale, la quale si presenta molto scura; qui ci troviamo di fronte a granulazioni molto scure, di grandezza un pò maggiore di quella delle granulazioni della mela; dette granulazioni sono ravvicinate e non sono « ammassi ». Il colore nero, infatti, si risolve,

focettando, in parti elementari, non tutte ben distinguibili, le quali sono, ripetiamo, granulazioni e non ammassi. Del resto, un paragone con le figg. 6 b e 6 c, rispettivamente rappresentanti, la prima, una cellula della polpa di frutto di kaki e la seconda una cellula del parenchima profondo di parti laterali del talamo di rosa, mette in grado facilmente l'osservatore di poter rilevare le seguenti differenze: mentre il colore nero della cellula di asparago si risolve, se pure parzialmente cioè per non tutta la massa, in granulazioni, il colore nero, sia del kaki che della rosa, appare per così dire piatto, cioè uniforme, per quanto si fochetti, ossia non risolvibile in parti elementari.

Le figg. da 7 a 10 riguardano preparati al Giroud e precisamente sono relative sia alle prove III a che III b e III c. Le prime tre, cioè, mela, (fig. 7), pesca (fig. 8), e pomodoro (fig. 9) sono caratterizzate unicamente da colore giallino diffuso e dall'assenza di qualsiasi granulazione argentea.

Comunque, granulazioni, poche e chiare, vi sono, ma si può facilmente constatare, mediante paragone con cellule a fresco e con cellule colorate, che esse sono proprie del citoplasma e non sono quindi prodotti di reazione: alcune di tali formazioni sono bastonciniiformi o irregolari e rifrangono la luce.

Il peperone, invece (fig. 10), presenta, a tutte e tre le prime prove di GIROUD, aspetti affini al peperone della fig. 5, quello al Bourne. Diciamo « affini » in quanto in alcune altre cellule di peperone sottoposto alle stesse prove le granulazioni si sono presentate un pò più addensate in dati punti della cellula e sono apparse di tonalità un pò più scura, quasi nera, di quelle al Bourne.

Da quanto detto sopra nel presente paragrafo risaltano subito, dunque, le seguenti differenze comparative: mentre cioè mela, pesca, pomodoro e peperone sono tutti positivi al Bourne - e positivi con diverse intensità e modalità - al Giroud (prime tre prove) solo il peperone è positivo: i due grafici rappresentati dalle figg. 11 e 12 mettono in evidenza questi fatti. In detti grafici i numeri 1, 2, 3 e 4 indicano, rispettivamente, mela, pesca, pomodoro e

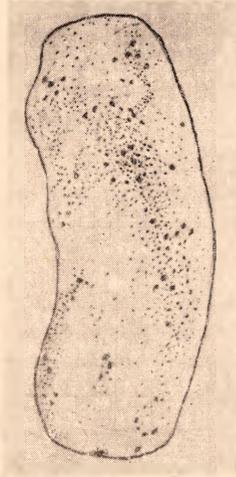


Fig 5 - Cellula della parete del frutto di peperone 'di Nocera,, al Bourne: granulazioni di due classi di grandezza.

peperone ; sugli assi delle ordinate sono riportati i quantitativi di vitamina C totale risultati alle analisi chimiche dei frutti delle quattro specie, analisi condotte, come detto, su pezzi contigui di uno stesso frutto o di frutti trovantisi in pari condizioni ; le quantità di

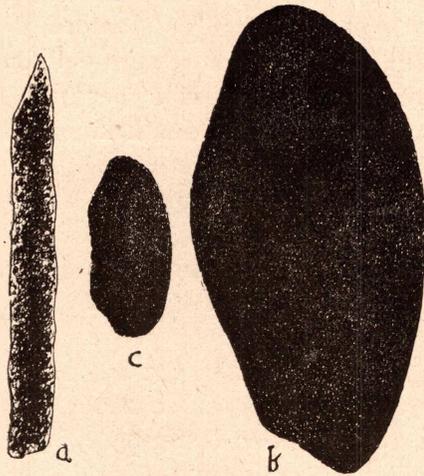


Fig. 6. *a*) Cellula perivasale di turione di asparago al Bourne: tipo di reazione a granulazioni ravvicinate, *b*) Cellula di polpa di k ki al Bourne: reazione diffusa ed uniformemente nera, dovuta a tannini, *c*) Cellula del parenchiua del talamo di rosa "Gloria di Roma,, : reazione come in *b*).

vitamina C, espresse in mg. di acido ascorbico totale per 100 g. di tessuto fresco, sono riportate di 10 in 10.

Le figg. da 13 a 15 illustrano i risultati delle prove IV d, cioè quelle al « Giroud-Bourne », ossia al Giroud tipico e successivo

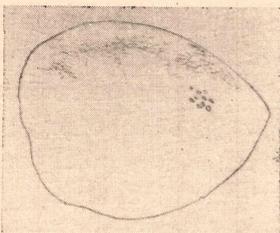


Fig. 7 - Cellula di mela al Giroud: assenza di granulazioni argentiche.

trattamento con idrato ammonico allo 0,06%. Nei riguardi del pomodoro i prelievi delle sezioni, attuati sempre in corrispondenza degli strati cellulari esterni, hanno interessato solo le macule scure presentate, come detto, dai pezzi. Sia nella mela, fig. 13, che nel pomodoro, fig. 14, i prodotti di reazione sono poco vistosi in quanto la mela mostra pochissimi granuletti, meno scuri, ma delle stesse dimensioni di quelli della mela infig 2; il pomodoro, non mostrando ammassi, rivela un numero di granulazioni della stessa tonalità ma più numerosi che per la mela (fig. 13). Nei riguardi del peperone invece, fig. 15, la reazione si presenta come al solito, cioè

come per il Bourne (prove I b, c, e d) ed il Giroud (prime tre prove). Le osservazioni or ora illustrate cioè tutte quelle al Giroud-Bourne sono state condotte su cellule provenienti da tessuti, come detto, che non hanno soggiornato a lungo alla luce dopo il termine delle ultime operazioni di reazione, ed inoltre, nei riguardi del peperone come detto per il pomodoro, i prelievi sono stati fatti solo in corrispondenza delle macule nere, esterne, dei pezzi.

La fig. 16 rappresenta un grafico riassuntivo dei fatti or ora illustrati, cioè dei trattamenti al Giroud-Bourne.

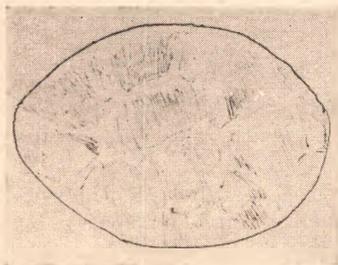


Fig. 8 - Cellula di pesca al Giroud: assenza di granulazioni argentiche.

d) ALTRI RISULTATI NON ILLUSTRATI CON FIGURE.

E' necessario illustrare a questo punto qualche altro risultato non raffigurato.

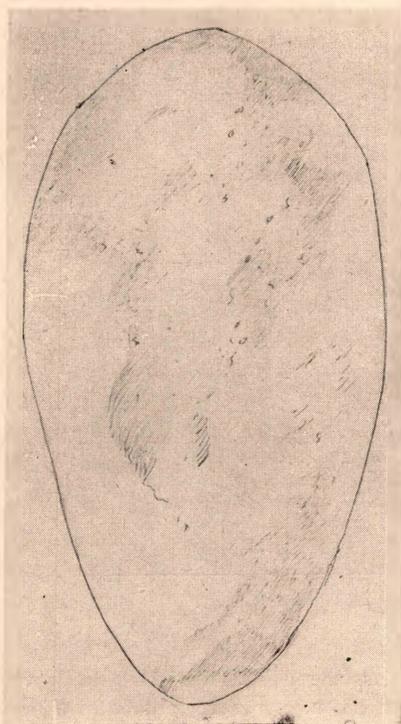


Fig. 9 - Cellula di pomodoro al Giroud mostrante reazione negativa.

Il pomodoro, alla prova I a, quella attuata cioè sia mediante idrogenazione che con tentativo di allontanamento di eventuale glu-

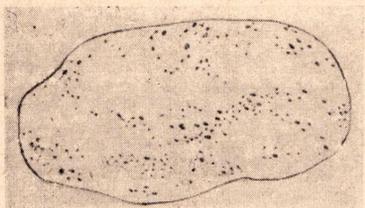


Fig. 10 - Cellula di peperone al Giroud: granulazioni come in fig. 5

tatione, ha rivelato l'interessante risultato consistente nella presenza di reazione a granulazioni, non già ad ammassi, come invece è accaduto nel caso in cui nè idrogenazione nè tentativo di allontanamento di eventuale glu-

tatione sono stati attuati (prova I d). Le granulazioni presentate in questo caso dal pomodoro sono piccole, come quelle della mela (fig. 2) o poco meno, sono ugualmente o forse poco più numerose

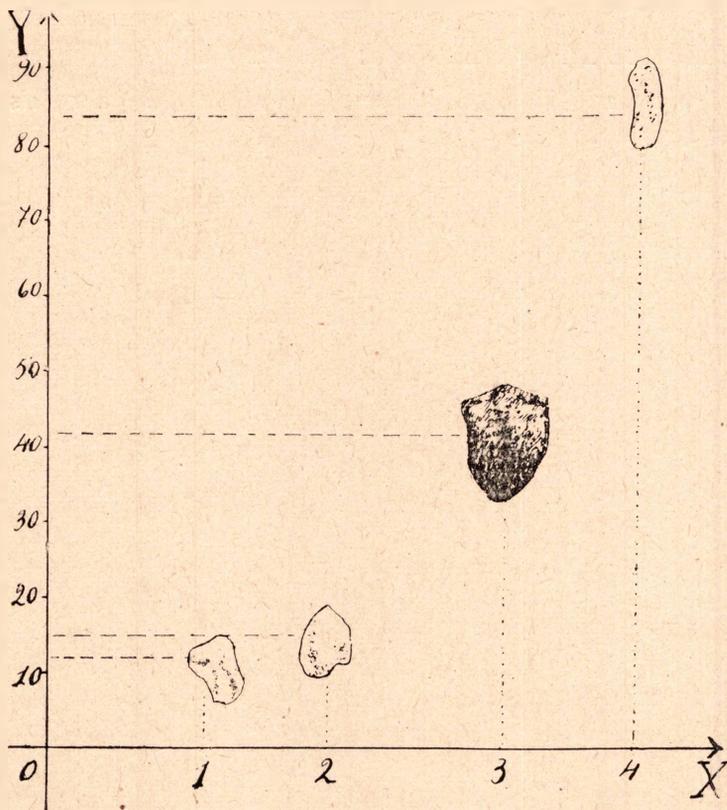


Fig. 11 - Grafico riassuntivo i risultati sia alle prove chimiche che citochimiche di BOURNE offerti da mele, pesche, pomodori e peperoni (rispettivamente numeri 1, 2, 3 e 4). Sull'asse delle Y quantità di Vitamina C totale risultate ai saggi chimici, espresse in mg. (di 10 in 10) di vitamina per 100 gr. di tessuto fresco.

ehe nella mela stessa ma sono certamente un pò più chiare: tale ultima caratteristica forse dipende soltanto dalla minor mole delle granulazioni stesse.

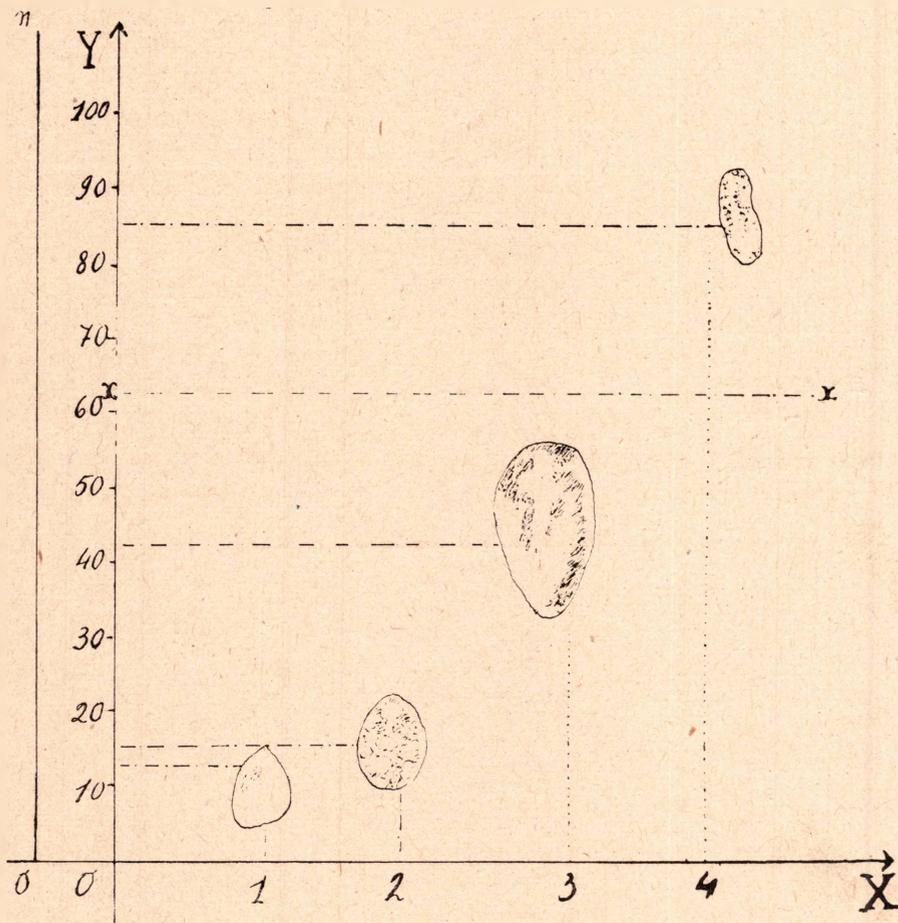


Fig. 12 - Grafico riassuntivo dei risultati sia alle prove chimiche che citochimiche di GIROUD-LEBLOND; numeri come in fig. prec. La linea x-x rappresenta una quota, incognita, al di sotto della quale le reazioni di GIROUD sono negative, cioè per valori di vitamina C compresi tra 0 e x; al di sopra di x-x reazioni positive, cioè per valori varianti da x ad n.

Alla stessa prova I a or ora detta a proposito del pomodoro è risultato, nei riguardi del peperone, un tipo di reazione un pò più intensa di quella manifestata dallo stesso peperone alle prove avanti descritte e raffigurate (fig. 5): le granulazioni sono un pò più scure, più numerose e un pò più ravvicinate.

La prova al Deane e Morse (II) dà risultati, nei riguardi delle pesche, uguali a quelli forniti dalle cellule degli strati esterni delle pesche stesse alle prove di BOURNE.

Alle prove di GIROUD, e cioè alle prove III, a, b, e c, l'asparago reagisce come alle prove

di BOURNE, cioè presenta cellule nere come in fig. 6 a se tali cellule sono state prelevate da zone macroscopicamente nere ed interne; manifesta invece cellule gialline e senza granulazioni se il prelievo è stato attuato da parti macroscopicamente gialline. Alle prove n. III d (Giroud ridotto) le cellule sia di mele che di pomodori, peperoni ed asparagi presentano

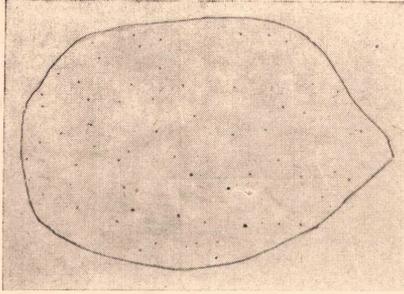


Fig. 13 - Cellula di mela al " Giroud - Bourne „ : reazione scarsa,

tano modalità affini a quelle manifestate alle prove III, a, b, e c. Nei riguardi delle prove IV («Giroud-Bourne»), e precisamente

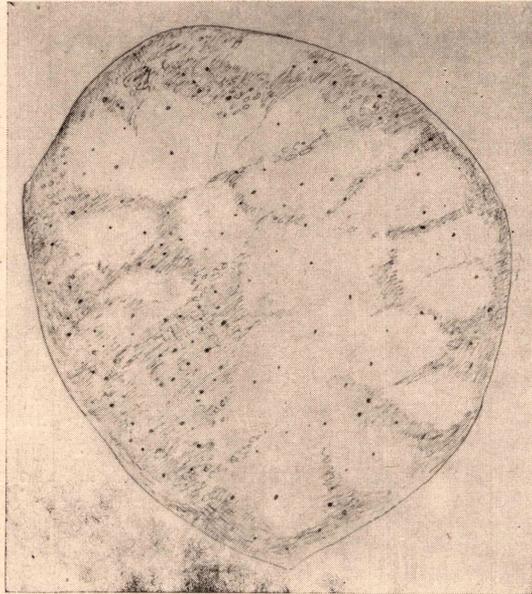


Fig. 14 - Cellula di pomodoro al " Giroud-Bourne „ : reazione scarsa.

alle prove IV a, rendiamo noto che i risultati relativi a cellule di mele, pomodori e peperoni sono perfettamente simili, per quanto si

riferisce a numero, grandezza e colore delle granulazioni argentiche o degli ammassi (pomodoro), a quelli che si hanno nelle prove di BOURNE (figg. 2, 4 e 5, rispettivamente). Le prove IV b e c hanno messo in evidenza, nei riguardi delle mele, cellule incolori e senza nessuna granulazione oppure con granulazioni chiare e poco numerose (fig. 13): ciò è risultato in 5 casi sui 6 esaminati (prove IV b, c, e d, per le mele, vedi pag. 33); nell'altro caso (uno solo dei due pezzi trattati alla prova IV d) le cellule hanno mostrato presenza di una sorta di efflorescenza biancastra che, alla luce, gradualmente, scurisce: con ogni probabilità si è trattato di cloruro d'argento, o, comunque, di cloruri; nei riguardi del pomodoro e del peperone i risultati sono analoghi a quelli della prova IV d quando il prelievo delle sezioni è stato attuato in corrispondenza delle macule scure (pomodoro) o nere (peperone).

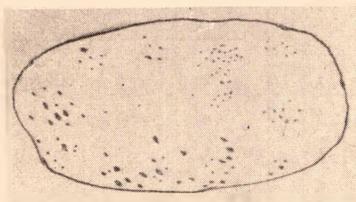


Fig. 15 - Cellula di peperone al "Giroud-Bourne": reaz. intensa.

In sostanza, dunque, a questo punto della presente esposizione riteniamo opportuno riassumere brevemente i risultati obbiettivi di ciascun gruppo di prove citochimiche descritte sopra: nei riguardi delle prove di BOURNE tutte le specie mostrano reazione positiva; più in particolare, il pomodoro mentre senza nè idrogenazione nè trattamento di allontanamento di eventuale glutatione presenta reazione ad ammassi, con idrogenazione e trattamento all'acetato di mercurio manifesta reazione a granulazioni; le reazioni manifestate da kaki, rosa ed asparago sono intensissime: nei riguardi di kaki e rosa la colorazione nera è uniformemente diffusa, in ogni cellula, ed, in ciascun pezzo, gli strati esterni mostrano cellule a reazioni ugualmente intense; nei riguardi dell'asparago, invece, le cellule, localizzate, manifestanti reazione mostrano un tipo di reazione anche molto intenso ma risolvendosi in addensamenti di numerose granulazioni elementari. Sia le prove condotte (vedi pag. 22) senza interporre lavaggio fra operazioni di idrogenazione ed operazioni successive che quelle attuate senza interporre trattamento con acetato di mercurio fra le suddette operazioni di idrogenazione e le successive non comportano differenze rispetto alle prove inerenti alle sole operazioni con reattivi argentiche e successivo.

Nei riguardi delle prove di GIROUD, mele, pesche e pomodori presentano reazioni negative, nel senso di mancanza di granulazioni

nelle cellule, sempre degli strati più esterni; il peperone invece presenta reazione positiva; l'asparago dà reazione positiva ma sempre localizzata. Le prove III b, c e d non comportano differenze sensibili rispetto alle prove III a.

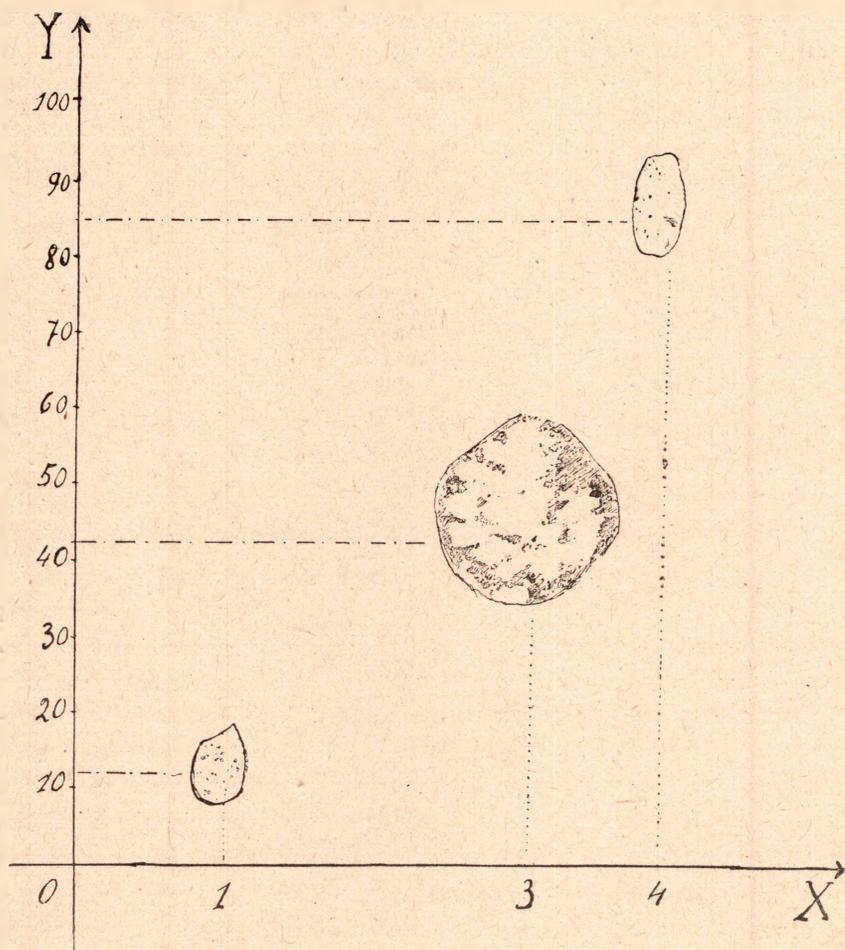


Fig. 16 - Grafico delle reazioni chimiche e citochimiche al "Giroud-Bourne"; dati come nei grafici delle figg. 13 e 14 (manca il n. 2 cioè il caso della pesca): reazioni negative per mela e pomodoro (granulazioni chiare), intensa per il peperone.

Nei riguardi, infine, delle prove al Giroud-Bourne, mela e pomodoro presentano lievi reazioni, a granulazioni chiare, essendo più numerose quelle del pomodoro; il peperone presenta reazione a granulazioni nere; le reazioni presentate dai pezzi di pomodoro e peperone sono localizzate.

3. - COLORAZIONI DELLE CELLULE.

Ricordato che si è ritenuto opportuno di fare ricorso a colorazioni riguardanti tessuti prelevati in condizioni al massimo possibile identiche ai tasselli di tessuto sottoposti ai vari metodi di reazione argentica, rendiamo noto che, nei riguardi delle colorazioni sia con rosso neutro che con safranina, il plasma dei tessuti più esterni di ogni singolo pezzo, com'era del resto da prevedersi, è risultato, per tutte e quattro le specie i frutti delle quali sono stati sottoposti a colorazione, e cioè melo, pesco, pomodoro e peperone, abbastanza vacuolizzato. Le cellule di pomodoro, però, almeno rispetto a quelle di melo e forse anche - ma, in ogni caso, in minor grado - rispetto a quelle di pesco e peperone, sono risultate fornite di plasma più abbondante.

Le granulazioni plasmatiche, quando sono risultate (mela e peperone) bastonciniiformi, sono state sempre ben distinguibili, grazie alla forma, dalle granulazioni argentiche, le quali sono sempre, come detto, subrotondegianti.

Nei riguardi delle colorazioni con violetto di genziana, attuate come detto, allo scopo di mettere in evidenza la presenza di eventuali plastidi, v'è da dire che, com'era del resto anche in questo caso prevedibile dato il grado di profondità al quale sono stati rilevati i tessuti, non si è constatata presenza di plastidi, almeno di quelli grossi; la detta constatazione riguarda tutte e quattro le specie suddette. Osserviamo qui, inoltre ed incidentalmente, che, specie per quanto riguarda il peperone, la presente colorazione oltre a quella con safranina dà ottimi risultati nei riguardi della colorazione della cromatina nucleare, del nucleo in riposo.

In conclusione, dunque, v'è da dire che le previste e confermate caratteristiche sia di alto grado di vacuolizzazione del plasma che di assenza, almeno di grossi plastidi, nei tessuti esaminati delle specie sopradette, devono ritenersi quali condizioni sperimentali fra le più adatte a condurre prove comparative con reattivi argentici: sono state cioè in tal modo ridotte al massimo possibile le influenze date, in generale, da supporti plasmatici molto conclamati sui risultati dell'azione di reattivi fornenti come prodotti di reazione dei corpuscoli più o meno grossi come nel caso delle reazioni argentiche. Alla presente scelta, cioè alla scelta delle specie ed organi di specie da sottoporre ai reattivi argentici, siamo stati guidati non solo dalla preziosa osservazione, già sopra ricordata, fatta dal GIROUD in merito all'opportunità di provare più largamente i reattivi argentici in cellule vegetali, aventi, rispetto a quelle animali, una

maggiore vacuolizzazione, ma anche dall'esperienza personale che abbiamo avuto occasione di fare, alcuni anni fa, in merito a prove di ricerca degli zuccheri, in meristemi apicali di susino « S. Rosa », mediante fenilidrazina: prove, quelle, tendenti a conseguire - ma restate con esito, in quell'occasione, negativo - eventuali risultati per l'identificazione degli zuccheri nei meristemi apicali. Ottenemmo sempre, dunque, in quell'occasione, assenza dei caratteristici corpuscoli di osazoni quando la reazione interessava sezioni apicali di meristema mentre il plasma assumeva una diffusa colorazione giallina forse dovuta a legami plasmatici che probabilmente si venivano ad istituire fra elementi del reattivo e «catene» (FRY-WISSLING) del citoplasma; formazioni corpuscolari, invece, incominciavano ad apparire man mano che le sezioni interessavano livelli meristemati più bassi, cioè cellule meno giovani.

CAPITOLO IV.

Osservazioni.

1. - Osservazioni. - 2. Il fenomeno di « schermatura ». - 3. Introduzione al concetto di analisi citochimica « semiquantitativa » dell'acido ascorbico totale e gli « idioblasti funzionali ».

1. - OSSERVAZIONI.

Allo scopo di poter studiare, come preannunciato nella premessa del presente lavoro, i rapporti intercorrenti fra l'eventuale mixoploidia ed il contenuto in acido ascorbico delle pesche trattate avevamo predisposto il seguente piano di studi: compiere indagini cariologiche delle pesche, attuare rilievi statistici sul progredire dell'invaiaura ed attuare ricerche sul contenuto idrico oltre che saggi chimici e citochimici della vitamina C.

Poichè, però, le indagini cariologiche non hanno potuto essere completate a causa del sopraggiungere della fine dell'accrescimento dei frutti, si è stimato di attuare, al compimento della maturazione, rilievi statistici sulla grossezza e forma dei frutti stessi. Detti ultimi rilievi però sono stati poi omessi a causa del fatto che le indagini chimiche sono state inficiate dall'attacco, come ricordato, di mosca della frutta.

In conclusione, quindi, i rilievi da noi condotti sull'andamento dell'invaiaura, rilievi che, per brevità, non sono stati riportati, unitamente sia ai risultati forniti dalle analisi chimiche che ai dati, se pure sommari, inerenti a forma e grossezza dei frutti, possono permettere di formulare l'ipotesi che i trattamenti non abbiano causato nè mixoploidia nè aumento di vitamina C; è invece opinabile che il maggior contenuto vitaminico C risultato per alcuni frutti abbia coinciso col loro minor grado di maturazione. Dato, questo, che è in accordo con i risultati di ricerche di numerosi Autori (VON EULER e KLUSMANN, BESSEY e KING, EGGLETON e HARRIS, HELLER, MATSUOKA (1)) condotte su una quarantina di specie.

(1) in: GIROUD A., L'acide ascorbique ecc., *Protoplasma* ecc., già citato, pag. 122.

Abbiamo già detto innanzi che, essendo venuto meno lo scopo prefissoci nell'impostazione iniziale del presente lavoro, abbiamo compiuto ricerche sui metodi citochimici, le quali sono risultate di grande interesse e delle quali si dà conto qui di seguito.

Relativamente alla reazione « ad ammassi » offerta dal pomodoro (prova I d) osserviamo che probabilmente la ragione del detto comportamento è in rapporto alla relativa maggiore abbondanza di plasma presente nelle cellule di pomodoro rispetto a quella delle altre specie; a meno che la ragione di tale comportamento non sia di tutt'altra natura cioè dipenda dall'esistenza nei detti frutti, all'atto dell'esame, di una parte di vitamina C allo stato di acido deidroascorbico: l'idrogenazione mediante acido acetico ed idrogeno solforato comporterebbe idrogenazione dell'acido deidroascorbico ad ascorbico e, correlativamente, forse, uno stato diverso di vischiosità del plasma (1), oltre che comportare reazione a granulazioni invece che ad ammassi.

Per quanto riguarda le prove che abbiamo chiamato di « Giroud-Bourne » osserviamo che esse hanno consistito in esperienze condotte con liquido di GIROUD e soluzione ammoniacale di BOURNE; inoltre, come detto, sono state attuate quattro sottoprove di detta nuova combinazione. Il rinvenimento, dunque, come detto precedentemente nei riguardi della mela, di tracce di efflorescenze biancastre che alla luce sono annerite ci ha indotto facilmente a pensare che dette formazioni siano state rappresentate da cloruri; a tale conclusione siamo pervenuti sia in relazione all'aspetto dalle dette formazioni presentate al microscopio, sia per il fatto che esse alla luce sono annerite, sia per il fatto che esse sono comparse solo in corrispondenza della diluizione più spinta di ammoniaca, in corrispondenza cioè di quella tra le soluzioni di ammoniaca che proprio per la scarsa concentrazione in sostanza solubilizzante i cloruri è meno adatta al detto scopo. Ancora a proposito delle prove citochimiche al Giroud-Bourne notiamo che, a differenza di tutte le altre prove, per quanto riguarda pomodoro e peperone ossia nei casi in cui le superficie dei pezzi sono apparse colorate a chiazze, il fatto richiama la primadetta evenienza ricordata dal GIROUD a proposito della mancata reazione argentea in date cellule di un tessuto animale; per la spiegazione di tale fatto il GIROUD invoca l'esistenza di un mancato inescamento da parte delle cellule

(1) TONZIG S., Ricerche sulla fisiologia dell'acido ascorbico, I. L'acido ascorbico come equilibratore degli stimoli nella cellula vegetale, Introduzione, *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, Vol. LVII, N. 3, 1950, pagg. 468-497.

che non reagiscono. Di casi siffatti si sono verificati, nelle presenti ricerche, oltre che per le ora ricordate specie, cioè pomodoro e peperone al Giroud-Bourne, anche nei riguardi dell'asparago e per tutte le prove alle quali l'asparago è stato sottoposto. Per quanto concerne i detti casi del pomodoro e del peperone alle prove di GIROUD-BOURNE è forse probabile che la causa di detto comportamento debba risiedere nel fatto che date cellule, per quanto tutte appartenenti ad uno stesso tessuto, si siano trovate in condizioni diverse di pressione osmotica; variazione, questa, forse dovuta a diverso contenuto di ioni i quali, probabilmente, sarebbero stati rappresentati da acido deidroascorbico nel caso di reazione negativa e invece da acido ascorbico nel caso delle cellule a reazione positiva. Comunque, tale ragionamento rappresenta solo un'ipotesi, la quale, peraltro, potrà trovare, in seguito ad ulteriori ricerche, eventuale sicura interpretazione in base al concetto di « membrana protoplasmatica » elaborato dal BOOIJ H. L. (1).

Ben diversamente invece vanno le cose, ossia sulla base di una sicura interpretazione, a proposito della reazione localizzata manifestata dall'asparago: in tale ultima specie, infatti, le cellule che non reagiscono al reattivo argentario, ossia la maggior parte di quelle costituenti il pezzo, sono certamente sfornite di acido ascorbico: a tale affermazione si perviene sicuramente in base ad un esame di paragone fra il dato fornito dalle prove chimiche e quelli forniti dalle prove citochimiche a proposito dell'asparago: ricordiamo, cioè, che accanto ad un risultato di 48 mg. circa di vitamina C totale per la detta specie, a paragone cioè di una quantità relativamente esigua di acido ascorbico, abbiamo riscontrato citochimicamente l'alto contenuto in acido ascorbico da parte solo di poche cellule, cioè di cellule perivasali: cosichè il risultato della compensazione tra forte contenuto in acido ascorbico delle file di cellule perivasali e scarsità del numero di tali cellule stesse rispetto all'intero pezzo si concreta nel valore tanto basso di 48 mg. di vitamina C: risultati, questi, perciò completamente verosimili ed al tempo stesso implicanti la constatazione dell'opportunità di quella parte dell'impostazione delle presenti esperienze consistente nel paragone fra dati chimici e citochimici, condotti su più specie.

Inoltre notiamo quanto segue nei riguardi dei saggi citochimici offerti da rosa e kaki: poichè i valori agli esami chimici nei riguardi della rosa sono risultati relativamente alti il correlativo aspetto pre-

(1) BOOIJ H. L., The protoplasmic membrane regarded as a complex system, *Recueil des travaux Nèerl.*, Vol. XXXVII, Liv., 1, 1940, pagg. 1-77.

sentato ai saggi citochimici dalla stessa rosa, aspetto cioè di intensa colorazione scura, piatta o diffusa, potrebbe, ad un primo esame, essere ritenuto quale un risultato in perfetta concordanza col precedente, cioè con quello scaturente al saggio chimico: viceversa ciò non è in quanto se detto aspetto delle cellule di rosa rispecchiasse veramente il contenuto vitaminico C risultato alla prova chimica, anche nel caso del Kaki l'aspetto delle cellule, altrettanto simile a quello della rosa, dovrebbe implicare un alto contenuto vitaminico; poichè ciò non è in quanto risulta dai dati bibliografici relativi a prove condotte da diversi Autori (1) che il contenuto vitaminico C del Kaki si aggira intorno a 20 mg. di acido ascorbico per 100 g. di tessuto fresco è facile desumere che in rosa ed in kaki hanno agito sostanze inibitrici della reazione argentea. Tali sostanze inibitrici sono, come già accennato, certamente tannini nei riguardi del Kaki e probabilmente anche tannini nei riguardi della rosa.

Riteniamo ora opportuno mettere qui in evidenza alcuni altri risultati, per quanto essi possano desumersi, implicitamente, dal sottocapitolo " Risultato alle prove citochimiche,,: sia il lavaggio successivo alle prove di idrogenazione (prove di BOURNE) che il trattamento con acetato di mercurio non hanno causato variazioni di risultati; nei riguardi poi delle prove di GIROUD sia l'omissione di previo trattamento con levulosio che mancata idrogenazione previa o reattivo argenteo ridotto non hanno causato variazioni di risultati.

2. - IL FENOMENO DI « SCHERMATURA ».

Partendo dall'esterno di un qualsiasi pezzo di pesca o mela trattati al Bourne e procedendo verso l'interno si notano al microscopio prima uno strato, o due, di cellule molto scure e con molte granulazioni: solo alcune cellule del primo strato, ed un numero forse più grande di cellule del secondo strato, sono meno scure e contengono minor numero di granulazioni; man mano che si procede verso l'interno del pezzo, in corrispondenza del terzo - quinto strato, al colore scuro delle cellule succede, molto gradualmente, un colore giallino, il quale, quando si è affermato, cioè in strati più interni, comporta l'assenza quasi assoluta di granulazioni. Questa gradualità è a tal punto conclamata che è possibile rinvenire qualche cellula, verso il terzo-quinto strato, per una quota parte della sua estensione colorata in scuro e per la restante parte di colore giallino.

Questo fenomeno ora ora descritto può ben definirsi col nome di « schermatura »; infatti, o lo strato esterno di un pezzo trattato rispetto al secondo strato di cellule, oppure il primo e secondo

(1) Vedi, ad esempio: GIROUD A., L'acide ascorbique ecc. *Protoplasma*, già citato, pag. 135.

strato insieme rispetto al terzo, e così via, rappresentano la causa « prima » del diverso comportamento delle cellule dei diversi strati rispetto al reattivo; ciò in quanto una volta iniziata la reazione, ad esempio, nello strato esterno, il passaggio di ulteriore reattivo nel secondo strato deve avvenire necessariamente attraverso quello schermo rappresentato dal primo strato in modo tale che o detto secondo strato sarebbe assoggettato ad una qualità di reattivo influenzata da prodotti della reazione avvenuta nel primo strato oppure in detto secondo strato stesso la quantità di reattivo verrebbe ad essere ridotta da parte del primo strato: non si può infatti pensare all'ipotesi che la causa del suddetto diverso comportamento delle cellule sia rappresentata da variazioni di contenuto in acido ascorbico dei diversi strati cellulari di un pezzo nel senso che strati più interni sarebbero meno ricchi in vitamina degli strati esterni di un dato pezzo: tale dubbio si risolve in base alla semplice considerazione del fatto che se la distribuzione della vitamina C, per ognuno dei pezzi esaminati, fosse tale quale supposta sopra per ipotesi, detta distribuzione sarebbe sommamente innaturale.

Dunque, il fenomeno di schermatura, inteso come sopra detto, è un fatto reale il quale, peraltro, presenta aspetti particolari a seconda della qualità della prova citochimica considerata. Così un pezzo di pesca al Giroud presenta una disposizione delle colorazioni sostanzialmente invertita rispetto alle modalità presentate al Bourne, or ora esaminate: infatti alle prove n. III (pesche, prove III a, b e c) mentre gli strati esterni risultano gialli quelli interni sono neri. Sta di fatto che la causa prima di detto diverso comportamento dei pezzi di pesche di fronte a due diversi reattivi è rappresentata sempre dalla schermatura: infatti così come nelle prove di BOURNE gli strati esterni che anneriscono costituiscono uno schermo nei riguardi degli strati interni che assumono colore giallino, nel Giroud sono sempre gli strati esterni, che in questo secondo caso restano gialli, a fare probabilmente da schermo nei riguardi dei più interni, che anneriscono.

Ricordato incidentalmente, a questo punto, che un interessante esame critico del concetto di causa in biologia fu esaurientemente condotto dal CUBONI (1) in un lavoro che, per quanto di un cinquantennio fa, conserva ancora, nelle sue linee generali, un rilevante carattere di aggiornamento, passiamo a tentare l'interpreta-

(1) CUBONI G., La teratologia vegetale e i problemi della biologia moderna. *Annuario della R. Stazione di Patologia Vegetale di Roma*, vol. 1^o, pagg. 165-217, Modena, 1901.

zione delle cause prossime del suddetto diverso comportamento da parte di tessuti di una stessa specie di fronte ai due suddetti reattivi, di BOURNE e di GIROUD.

Il fatto, dunque, della differenza di comportamento e di aspetto mostrata al Giroud dai pezzi, ad esempio di pesca, rispetto alle prove di BOURNE, si può spiegare supponendo che il liquido di GIROUD all'atto in cui non è ancora pervenuto nella zona centrale del pezzo non ha raggiunto una concentrazione tale da dare reazione; invece la confluenza verso il centro di ben sei correnti penetranti - una per ogni faccia del parallelepipedo rappresentato dal pezzo di tessuto - è tale da permettere il raggiungimento, nel punto di confluenza, cioè verso il centro del pezzo, delle condizioni di concentrazione comportanti reazione positiva.

Ma dobbiamo subito dire che un'altra ipotesi, forse più vicina al vero della precedente, si profila nei riguardi dell'interpretazione delle cause "prossime" del diverso comportamento dei pezzi di tessuto al Bourne ed al Giroud: il SAVELLI (1), a proposito dei risultati ottenuti in foglie di *Arum* adoperando il liquido di GIROUD, avendo constatato che l'iposolfito di sodio allontana le granulazioni argentiche formatesi, conclude opportunamente emettendo l'ipotesi che le granulazioni formatesi in seguito all'azione del liquido argentico non sarebbero rappresentate da argento elementare; infatti la detta ultima forma - aggiungiamo noi a chiarimento, per quanto non necessario, del pensiero dell'Autore - non avrebbe potuto mai dializzare attraverso membrane cellulari cellulose a meno che non si sia ammesso o che l'argento elementare sia solubile in iposolfito o che le membrane cellulari siano elastiche. Comunque, se le granulazioni argentiche formatesi al Giroud nei casi da noi provati sono solubili in iposolfito sarebbe legittimo prospettare una seconda ipotesi, come sopra preannunciato, cioè che il « nucleo » nero centrale dei pezzi al Giroud rappresenterebbe il supero o l'avanzo delle granulazioni che l'iposolfito non è riuscito a sciogliere.

A questo punto ci piace ribadire i concetti informativi delle presenti ricerche, per quanto riguarda il metodo generale da noi adottato: abbiamo già ricordato che GIROUD e COLLARI, molto opportunamente, hanno enumerato le cause influenzanti l'intensità della reazione argentica; le ricordiamo, per chiarezza, brevemente: tempo d'azione, concentrazione del reattivo, densità plasmatica, sostanze inibitrici,

(1) SAVELLI R. e CARUSO C., Ulteriori ricerche su taluni processi riduttivi in rapporto con la localizzazione e l'azione della vitamina C nei tessuti, *Protoplasma*, 32, 1939, pagg. 397-415.

quantità di acido ascorbico ed infine « condizioni nelle quali avviene la penetrazione » (GIROUD). Abbiamo già prima osservato che detta ultima condizione è soltanto genericamente enunciata dai predetti Autori: noi invece ne abbiamo fornito dimostrazione sperimentale e relativa interpretazione, se pure solo di carattere generale: è il fenomeno di schermatura cioè che deve essere inteso, tra l'altro, come causa - anche se non immediata - di diversa - qualitativa o quantitativa - penetrazione e quindi di diversa intensità di reazione. A tale proposito è opportuno sottolineare il seguente interessante fatto: se, com'è molto probabile, le cellule animali sono soggette allo stesso fenomeno di schermatura che abbiamo dimostrato verificarsi nei riguardi delle cellule vegetali, molti risultati di ricerche condotte da alcuni Cultori di citologia animale in merito alla reazione argentea, ricerche condotte cioè senza tener conto, come invece abbiamo potuto fare noi, della schermatura, vanno completamente riveduti.

Noi pertanto nella presente sperimentazione avendo voluto ricercare soltanto gli effetti della variante « concentrazione in acido ascorbico » abbiamo potuto trovarci, grazie ai chiarimenti da noi raggiunti, nella condizione di poter attuare il vecchio, ben noto, diffuso principio del « coeteris paribus »: abbiamo cioè mantenuto costanti, per dati gruppi di prove, tutte le condizioni, per quanto ovviamente è consentito dallo stato attuale delle nostre possibilità: così, tempo d'azione e concentrazione del reattivo, sostanze inibitrici, oltre che schermatura, sono state tenute ben presenti e « omogeneizzate » al massimo possibile: ossia, per quanto riguarda le sostanze inibitrici, si è cercato di allontanarle (glutazione - acetato di mercurio) oppure non si è tenuto conto dei risultati avuti quando tale allontanamento non è stato neppure tentato (tannini nei riguardi di Kaki ed anche, probabilmente, nei riguardi della rosa); per quanto riguarda invece la variante « densità plasmatica » abbiamo cercato di tenerne presente l'influenza sia mediante opportuna scelta di specie ed organi di specie su cui operare che mediante il paragone di cellule sottoposte ad un dato liquido argenteo con testimoni, plasmatici e plastidiali, colorati e non colorati.

3. - INTRODUZIONE AL CONCETTO DI ANALISI CITOCHIMICA «SEMIQUANTITATIVA» DELL'ACIDO ASCORBICO TOTALE.

La corrispondenza sopra tratteggiata fra risultati chimici e citochimici non è soltanto di carattere qualitativo bensì è anche, almeno entro dati limiti, di carattere quantitativo o proporzionale

diretto, nel senso che a maggiori valori risultati alle prove chimiche, ossia a valori crescenti di milligrammi di vitamina C, corrispondono reazioni citochimiche gradatamente più intense. Risultati perciò, questi, di tanto maggiore rilievo specie se si pone mente al fatto che non sempre, com'è ben noto, esiste corrispondenza, neppure solo qualitativa, tra risultati chimici e citochimici condotti su tessuti anche se godenti condizioni di massima omogeneità.

Sotto gli aspetti perciò or ora accennati passiamo ad esporre le seguenti osservazioni: il diagramma presentato in fig. 11, come già detto prima, in corrispondenza dell'asse delle X porta contrassegnati i numeri 1, 2, 3 e 4, cioè rispettivamente, le reazioni presentate da mela, pesca, pomodoro e peperone alle prove di BOURNE (figg. 2, 3, 4 e 5); sull'asse delle Y sono riportati, di 10 in 10, i mg. di vitamina C totale risultati alle prove chimiche; detto grafico, dunque, e, meglio ancora, le figg. da 2 a 5 relative alle stesse prove, ci mettono in grado di rilevare che in correlazione di diversità di contenuto in acido ascorbico alle prove chimiche le cellule mostrano diversità di quello che si può chiamare « spettro cellulare ».

Gli spettri cellulari suddetti, ossia l'insieme di grandezza, quantità e colore più o meno scuro delle granulazioni argentiche di ogni cellula, dunque, sono tali da lasciare legittimamente intravedere che una volta fatta la titolazione chimica parallela con quella citochimica ed una volta arricchita, tutta una serie, di « casi », si potrebbe approssimativamente giudicare, solo in base alle caratteristiche dello spettro cellulare, la quantità di acido ascorbico contenuta nelle cellule.

Tentativi lontanamente simili sono stati attuati, ad esempio, da GOUPH e ZILVA, Autori da noi precedentemente ricordati: però i detti Autori non avendo compiuto, fra l'altro, prove chimiche parallele alle citochimiche non hanno potuto fare riferimento ad un'unità di misura come la nostra, cioè i risultati alle prove chimiche, e le indicazioni « reazione scarsa » oppure « reazione intensa », raffigurate con una o più crocette, pur indubbiamente costituendo un mezzo certo di comparabilità dei risultati ottenuti con quelli di altri Autori, non mette in grado di poter dare una misura assoluta, se pure in via approssimativa, della quantità di acido ascorbico contenuta nei tessuti.

Ad un esame però più approfondito del metodo da noi qui appena delineato sembrerebbe che debbano sorgere dubbi a proposito della proporzionalità diretta da noi rilevata come intercorrente fra i dati chimici e citochimici del grafico della fig. 11: infatti la fig. 4, corrispondente al n. 3 della fig. 11, cioè il caso del pomodoro al

Bourne (prova I d), rivela l'esistenza di casi di reazione ad ammassi e non a granulazioni: occorre cioè porci il quesito se esista comparabilità, sotto gli aspetti sopra delineati, fra tipi di reazione ad ammassi e tipi di reazione a granulazioni. Ma qui subito interviene in aiuto il risultato offerto dal pomodoro alla prova I a, di BOURNE, (risultato non raffigurato), risultato, come detto, consistente in un'abbondante reazione a piccole e numerose granulazioni, non molto scure. Cosichè tutta la serie del grafico della fig. I diventa costituita da spettri cellulari tra loro perfettamente paragonabili, nel senso che a valori maggiori di vitamina C espressi in mg. (prove chimiche) corrispondono spettri cellulari caratterizzati o da granulazioni più numerose oppure più grosse e più scure.

Ma interesse ancora maggiore è suscitato dalle ulteriori seguenti osservazioni: posto ancora che i quattro spettri cellulari dei quali or ora detto non fossero ritenuti tali da comportare un agevole loro differenziamento sotto l'aspetto della quantità di vitamina da essi rappresentata, i risultati ottenuti al Giroud (figg. da 7 a 10, corrispondenti, rispettivamente, ai numeri da 1 a 4 della fig. 12 nella quale ultima è presentato un grafico elaborato in maniera analoga a quello della fig. 11) ci dicono che sono negativi al Giroud tutte le cellule a contenuto vitaminico C rappresentabili da «spettri» che vanno situati ad una quota inferiore alla linea x · x della fig. 12. Quest'ultima linea rappresenta, almeno per ora, cioè rispetto ai risultati conseguiti colle presenti indagini, un'incognita: ma arricchendo di dati la serie relativa sarà probabile individuare di detta incognita una quota, se pure approssimativa.

Ancora poi ulteriore controllo si può avere mediante le prove al Giroud-Bourne (figg. da 13 a 16, nella quale ultima figura manca il n. 2, cioè la reazione relativa alla pesca, perchè, come detto, all'epoca in cui le dette prove sono state fatte le pesche erano fissate in alcool) colle quali si stabilisce l'esistenza di reazioni debolissime per la mela e meno deboli per il pomodoro, oltre che reazione decisamente positiva per il peperone.

In siffatta maniera, dunque, cioè coll'applicazione di particolari ed originali modificazioni di metodi secondo quanto da noi sopra è stato fatto, mentre colle prove di BOURNE si procede ad un primo esame quantitativo, colle prove successive, cioè con quelle di GIROUD e poi ancora con quelle di «GIROUD-BOURNE», si attuano integrazioni gradualmente successive delle prove precedenti.

A questo punto vien fatto naturale il domandarci quali possano essere le finalità della metodica elaborata nel presente lavoro, metodo che, nel titolo del presente scritto, abbiamo ritenuto di in-

dicare come « concetto » e non come « metodo » di analisi citochimica « semiquantitativa »: ciò solo in via prudenziale, in quanto ulteriori ricerche, ovviamente, si mostrano necessarie allo scopo di poter permettere di parlare di metodo vero e proprio: comunque, questi primi risultati, indubbiamente tali da lasciare almeno intravedere ulteriori possibili sviluppi ad esito positivo, necessitano di qualche altra considerazione.

Si potrebbe cioè obiettare che, in realtà, i metodi istochimici quantitativi di determinazione della vitamina C, quali ad esempio il metodo di GLICK, consistente, come detto, nella determinazione del tasso vitaminico operata su un'intera sezione di tessuto, siano già sufficienti ad indicare, esaurientemente, la quantità di vitamina C di un dato tessuto e che, perciò stesso, non occorra fare ricorso ad altri metodi. Questa obiezione, però, — una volta riconosciuta da parte nostra al suddetto metodo di GLICK: tutto il suo valore intrinseco — cade, in quanto il metodo prospettato nelle presenti ricerche non deve ritenersi esclusivamente istochimico ma è soprattutto citochimico: le differenze, infatti, intercorrenti, in generale, com'è del resto agevolmente argomentabile, fra metodi istochimici e citochimici possono essere stimate come consistenti in questo, essere cioè i metodi citochimici di carattere analitico ed al tempo stesso sintetico, nel senso che i risultati desunti in base all'esame dei prodotti di reazione in una data cellula possono essere estesi, se pure con date riserve, all'intero tessuto al quale appartiene la cellula stessa sottoposta ad indagine; viceversa, metodi istochimici come quello suddetto di GLICK sono esclusivamente sintetici nel senso che danno un risultato « in toto » cioè per tutte le cellule individuanti un dato tessuto: il fatto che la detta differenza, in realtà, non sia soltanto formale ma sostanziale, lo si desume tenendo presente un altro originale concetto da noi introdotto in occasione di un passato lavoro (1): accenniamo al concetto di « idioblasto funzionale »; col che abbiamo indicato particolari cellule di un tessuto distinte dalle circosvicine soltanto per uno o più caratteri funzionali, uno dei quali, fondamentale e comune a tutti i detti idioblasti funzionali, è il valore della pressione osmotica posseduta dai detti idioblasti funzionali, valore diverso da quello proprio delle cellule circosvicine a tali idioblasti stessi.

Orbene, nei riguardi di tali « idioblasti funzionali » si comprende agevolmente che l'unico mezzo di analisi quantitativa

(1) VITTORIA A., Effetti ecc., già citato.

potrà essere rappresentato, ovviamente, soltanto da ulteriori sviluppi, ad esito eventualmente positivo, del metodo citochimico da noi introdotto colle presenti ricerche.

Conclusioni.

Trattamenti di una pianta di pesco « tipo » « Terzarola » condotti a mezzo di isomero γ di ECE (esaclorocicloesano) non hanno, probabilmente, causato variazione di contenuto vitaminico C nei frutti. Diciamo « probabilmente » in quanto i risultati delle esperienze condotte sono stati forse alterati da un attacco di « mosca della frutta ». Probabilmente i maggiori contenuti vitaminici C si sono avuti in corrispondenza degli stadi di maturazione più arretrata delle pesche.

Venuto così a mancare lo scopo inizialmente prefissoci si è ritenuto di condurre prove comparative fra metodi citochimici e chimici di determinazione dell'acido ascorbico totale.

Le prove chimiche, attuate complessivamente in numero di 34 e col metodo Tillmans - Ott, hanno riguardato, oltre che pesche, anche mele « Annurca », Kaki, pomodori « da serbo », peperoni « di Nocera » asparagi e rose « Gloria di Roma »; l'estensione delle prove chimiche a più specie è servita, tra l'altro, come mezzo di riprova della corretta esecuzione, da parte nostra, del metodo chimico predetto. Alcuni risultati, quelli cioè relativi a peperoni ad asparagi, sensibilmente differenti dai risultati ottenuti da altri Autori, sono stati causati specialmente dall'invecchiamento dei frutti stessi, comportante, com'è noto, sensibile riduzione del contenuto vitaminico C.

Le prove citochimiche, condotte in numero di 124, parallelamente, nel tempo, colle prove chimiche e su tessuti in condizioni di massima omogeneità sia nei riguardi di tutte le prove citochimiche che chimiche, hanno interessato tutte le specie predette; tali prove citochimiche hanno rivelato che la distribuzione della vitamina C totale può ritenersi omogenea nelle facce delle pesche studiate.

L'idrogenazione, attuata mediante vapori di idrogeno solforato ed acido acetico, dei tessuti di frutti delle specie predette, è stata la causa, probabilmente, nei riguardi del pomodoro, di reazione « a granulazioni » invece che « ad ammassi »; tale secondo tipo di reazione invece si è avuto quando nè idrogenazione nè tentativo di allontanamento di eventuale glutazione sono stati attuati (Bourne).

Nè introduzione di lavaggio, successivo alle prove di idrogenazione, nè trattamento con acetato di mercurio hanno avuto influenza sui risultati (prove di BOURNE); nei riguardi delle prove di GIROUD-LEBLOND nè omissione di previo trattamento con levulosio,

nè idrogenazione precedente all'azione del reattivo argentario, nè reattivo argentario ridotto hanno causato variazioni di risultati.

Un'innovazione fondamentale, oltre all'estensione fatta ai Vegetali delle prove di idrogenazione attuate da altri Autori nei riguardi di tessuti animali, è stata quella di tener conto del fenomeno di «schermatura»; col detto nome si deve intendere l'influenza esplicita, in un qualsiasi tessuto vegetale sottoposto ad un reattivo argentario, da strati cellulari su strati più o meno contigui; l'intensità di tale fenomeno è a tal punto rilevante che tessuti di frutti di una data specie, aventi uguale contenuto vitaminico C, quando sono sottoposti ad un dato reattivo argentario presentano reazione positiva di diversa intensità, oppure addirittura negativa, solo che le cellule sulle quali si conduce l'osservazione appartengano ad uno strato oppure ad un altro; tale diversità di reazione si verifica anche se i detti strati sono situati, nel senso della profondità del pezzo di tessuto, a distanze relativamente poco diverse rispetto al reattivo ambiente.

La causa «prima», quindi, di diversa intensità di reazione presentata dalle cellule di un dato pezzo di tessuto considerate nel senso della profondità del pezzo stesso è la «schermatura»; le cause «prossime», invece, del detto comportamento delle cellule rispetto ad un dato liquido argentario dipendono, probabilmente, o dalla concentrazione del reattivo (Bourne e Giroud) che viene ad essere variata nei vari strati cellulari, oppure da modificazioni qualitative indotte nel liquido argentario stesso (Bourne) da parte di prodotti di reazione, oppure, infine, da azioni svolte da sostanze (iposolfito) agenti susseguentemente al reattivo argentario (Giroud).

Se il detto fenomeno di schermatura è presente, com'è molto probabile, anche nei riguardi di tessuti animali sottoposti a reattivi argentici forse numerosi tra i risultati ottenuti da Cultori di citologia animale in merito alla reazione argentica stessa vanno completamente riveduti.

Molto significativa è la risultanza di perfetta coincidenza tra prove chimiche e citochimiche nei riguardi di tutte le specie studiate, se si eccettuano i casi relativi al Kaki ed alla rosa, casi nei quali le divergenze dipendono da sostanze, cioè da tannini, inibitrici della reazione argentica.

Il caso dell'asparago, nei riguardi del quale il valore relativamente basso risultato alle prove chimiche è in accordo con l'intensa reazione argentica presentata solo da poche cellule perivasali, è significativo nel senso che non esiste nel detto caso dell'asparago necessità di invocare, come prospetta il GIROUD in via di ipotesi, ed in ge

nerale, differenza di inescamento delle cellule nei riguardi dell'assunzione del reattivo.

Tenendo quindi da parte i suddetti casi di eccezioni, cioè oltre a quelli relativi a rosa e Kaki anche il caso dell'asparago, nei riguardi di tutte le altre specie studiate esiste perfetta corrispondenza tra risultati alle prove chimiche e quelli alle diverse prove citochimiche.

Detta corrispondenza inoltre non è solo di carattere qualitativo ma, almeno entro dati limiti, è anche di carattere quantitativo: ossia a maggiori valori risultati alle prove chimiche corrispondono « spettri cellulari » di dato tipo. Colla denominazione « spettro cellulare » viene da noi indicato l'insieme dei caratteri manifestati da una cellula assoggettata ad un reattivo argentario: viene cioè indicato numero, grandezza ed intensità di colorazione scura delle granulazioni argentiche.

E' anche interessante infine notare che mediante i metodi di GIROUD e mediante quelli che abbiamo chiamato di « GIROUD-BOURNE » i dati semiquantitativi ottenuti colle prove di BOURNE vengono a ricevere ulteriori integrazioni.

Ulteriori eventuali sviluppi positivi della metodica elaborata nel presente lavoro potranno essere applicati allo studio citochimico quantitativo dell'acido ascorbico contenuto negli « idioblasti funzionali »; col detto nome indichiamo date cellule di un tessuto contraddistinte dalle circonvicine soltanto per dati requisiti funzionali e nei riguardi delle quali cellule - fatto da tenere ben presente - non esiste alcun altro metodo d'analisi quantitativa, nè chimica, nè citochimica, nè istochimica.

Riassunto.

L'A., condotta un'illustrazione della bibliografia riguardante effetti quali turbe dell'accrescimento ed aumento del contenuto in acido ascorbico causati da induttori di poliploidia, si sofferma a prospettare i rapporti che possono intravedersi fra mixoploidia, o ploidia a settori, e contenuto in acido ascorbico.

L'A. è passato quindi ad illustrare l'impostazione sperimentale e lo svolgimento di esperienze condotte mediante convenienti irrazioni con isomero μ di esaclorocicloesano (ECE) su una pianta di pesco « Terzarola » presentante, nei riguardi di tutti i settori assunti per la sperimentazione, opportuni requisiti di omogeneità.

Illustrata la bibliografia inerente a metodi chimici e, specialmente, istochimici di determinazione dell'acido ascorbico, l'A. ha delineato le condizioni sperimentali da lui realizzate allo scopo di

ottenere risultati, corretti al massimo possibile, nei riguardi dell'individuazione citochimica dell'acido ascorbico sia delle pesche che di mele « Annurca », di Kaki, pomodori « da serbo », peperoni « di Nocera », rose « Gloria di Roma » ed asparagi.

Il tenere nel debito conto il fenomeno di « schermatura », nome col quale deve intendersi l'influenza spiegata da alcuni strati di tessuti sottoposti a reazione argentea su altri strati del tessuto stesso, rappresenta una delle condizioni necessarie affinché le osservazioni delle cellule che hanno reagito con un qualsiasi liquido argenteo siano condotte in maniera corretta.

L'A., quindi, accennato all'interpretazione dei risultati alle prove chimiche delle irrorazioni con ECE condotte sul pesco e dei risultati chimici e citochimici relativi alle altre specie suddette, si è soffermato sull'interpretazione di alcuni casi citochimici aberranti; ha fatto poi rilevare la corrispondenza perfetta intercedente fra risultati chimici e citochimici ed ha prospettato che la detta corrispondenza non è solo di natura qualitativa ma può essere stimata, almeno entro dati limiti, di valore quantitativo.

Ha quindi, infine, segnalato che eventuali ulteriori successi nello sviluppo di un metodo citochimico quale quello elaborato dall'A. stesso rappresentano l'unico mezzo possibile di analisi quantitativa nei riguardi degli « idioblasti funzionali ».

Summary.

The A, after an illustration of the bibliography concerning altered growings and increased vitamin C content in plants subjected to the action of polyploidical inductors and after having outlined the relations of mixoploidy with ascorbic acid content, illustrates the experimental plans and the development of experiments actuated by means of adapted treatments with hexachlorocyclohexane μ isomer on a « Terzarola » peach-tree having its sectors possessing opportune omogeneity degrees.

After an illustration of the bibliography regarding chemical and especially hystochemical methods of ascorbic acid determination, the A. outlines the experimental conditions actuated by him in order to obtain the maximum result exactitude concerning not only the treated peaches but also « Annurca » apples, Kaki, « da serbo » tomatoes, peppers, « Gloria di Roma » roses and asparaguses.

The « schermatura » phenomenon, i. e. the influence exercised on some cellular layers by other ones, constitutes one of the experimental conditions which is to be necessarily realised in order to obtain, in a silver-staining reaction, correct results.

Afterwards, the A., interpreted the chemical results in the treatment of peaches with ECE and those one, chemical and cytochemical, regarding the other overmentioned species, established by evidence the perfect correspondence of chemical results with the cytochemical ones, elucidated some exceptional cases, indicates that the overmentioned correspondence is not only a qualitative one but also quantitative, in a certain limit.

The A., at last, signalises that eventual and further successes in the development of a cytochemical and quantitative method like that one outlined by the A. himself constitute the only possible method of quantitative analysis as concerning the « functional idioblastes ».