

Edmondo Honsell

**Modificazioni indotte dalla caffeina nello stato
colloidale del plasma di *Bryopsis* e *Derbesia*
e sua azione sui fenomeni di accumulo di alcuni
coloranti basici e neutri.**

Il plasma di *Bryopsis* e *Derbesia* presenta una grande affinità per il colorante neutro rodamina B (HÖFLER, URL e DISKUS, 1956) ma anche, come risulta dalle mie recenti ricerche (HONSELL, 1957, 1961), per i coloranti basici rosso neutro, bleu creosile brillante e arancio di acridina, i quali, contrariamente alla regola generale, vengono accumulati soltanto di rado e a bassa concentrazione nei succhi vacuolari « vuoti » (HÖFLER, 1949, 1953) di queste interessanti alghe marine. Il fenomeno, del tutto singolare, fino ad oggi mai osservato in altre cellule vegetali, è di grande interesse citofisiologico e indicherebbe, oltre all'esistenza di una vera e propria concorrenza di accumulo tra le varie strutture cellulari, anche una particolare costituzione del plasma stesso: la sua elevata capacità di concentrare questi coloranti e le successive modificazioni che si osservano nel quadro dell'accumulo, probabilmente sono da mettere in rapporto con la presenza di una fase lipidica plasmatica molto abbondante e con l'esistenza in essa di determinate sostanze, per le quali soprattutto i coloranti basici avrebbero una notevole affinità. Infatti, mentre l'elevata concentrazione della rodamina B

nel citoplasma è da attribuire ad una semplice ripartizione delle sue molecole indissociate tra la fase acquosa esterna e quella lipidica plasmatica (HONSELL, 1961), non altrettanto si può dire per i coloranti basici i quali, pur concentrandosi in un primo momento con questo meccanismo, grazie anche alla scarsa azione di accumulo esercitata dal succo vacuolare, successivamente presentano una metacromasia negativa. Il fenomeno, consistente nella modificazione del tono della colorazione o della fluorescenza, dimostra che il colorante non si trova più allo stato di semplice soluzione, ma che si è legato chimicamente a determinati costituenti plasmatici (KINZEL, 1958). Questo fatto è ulteriormente confermato dai fenomeni di smescolamento nel citoplasma che spesso intervengono dopo la prima fase di colorazione diffusa a metacromasia positiva e che possono essere interpretati in base alle ricerche di BOOLJ e BUNGENBERG DE JONG (1956) come il risultato della combinazione tra i gruppi negativi di un costituente colloidale della cellula con i cationi colorati.

Da ciò si potrebbe dedurre che tra le varie possibilità di accumulo dei coloranti neutri e basici nel citoplasma (DRAWERT, 1956), nel caso in esame, la colorazione avvenga ad opera di due meccanismi diversi, dei quali, il primo, valido per i coloranti neutri come la rodamina B e per la prima fase di accumulo di quelli basici, consisterebbe in un fenomeno chimico-fisico di soluzione delle molecole indissociate dei coloranti nella fase lipofila plasmatica, mentre il secondo, corrispondente al secondo stadio dell'accumulo dei coloranti basici, sarebbe dovuto alla formazione di veri e propri legami chimici tra i coloranti e particolari sostanze presenti nel plasma.

Un interessante metodo per lo studio in vivo di questi fenomeni è rappresentato dalla reazione della caffeina, sostanza che presenta la caratteristica di permeare facilmente nella cellula viva, passando nel succo vacuolare, senza produrre alcun danno alla vitalità della cellula stessa e di esercitare sui coloranti basici e neutri eventualmente presenti, un'azione che tende a modificare il loro stato chimico fisico. Le prime osservazioni sull'azione della caffeina risalgono a OVERTON (1899) e, successivamente, RÜTER e BORNSTEIN (1925) e WASSILJEWA (1938) hanno

messo in rilievo l'influenza che questa sostanza (come pure gli altri alcaloidi) esercita sul coefficiente di ripartizione dei coloranti a favore di una loro maggiore affinità per la fase idrofila. Le recenti ricerche di FLASCH (1955) hanno infine dimostrato che la caffeina determina anche un'azione metacromatica sulla rodamina B e sull'arancio di acridina, nel senso di trasformare la colorazione metacromatica positiva di questi coloranti in negativa. Questi fatti starebbero a dimostrare che tra caffeina e coloranti abbia luogo la formazione di un composto chimico a carattere decisamente idrofilo.

PARTE SPERIMENTALE

1) *Materiale e metodo.*

Le presenti ricerche sono state eseguite sulle stesse alghe marine dell'ordine delle *Siphonales* da me già studiate in precedenza (HONSELL, 1957, 1960) e cioè su *Bryopsis plumosa* (Huds.) C. Ag., *B. disticha* Kütz., *B. cupressoides* Kütz. e *Derbesia tenuissima* (De Not.) Crouan. Il materiale è stato raccolto in alcune stazioni del Golfo di Napoli (scogliere di protezione al porticciolo di Portici, zone circostanti alla Grotta del Tuono a Capo Posillipo) e coltivato più o meno a lungo nell'Istituto Botanico di Portici in capsule di vetro (Boveri) in acqua marina pura o con l'aggiunta di estratto di terra. Dato che l'accumulo dei coloranti usati nelle presenti ricerche è di solito in rapporto diretto con l'attività vitale di queste alghe, ho cercato di utilizzare materiale in via di accrescimento e, sotto questo punto di vista, il più possibile omogeneo. Il periodo più favorevole per lo studio di questi fenomeni corrisponde a quello nel quale le alghe in questione sono in piena attività vegetativa: esso varia leggermente per le singole specie, ma in linea di massima, va dall'inizio della primavera alla fine dell'autunno. Il materiale coltivato, tuttavia, se tenuto a temperature non troppo basse (sopra i 15°-18°) si accresce uniformemente durante tutto l'anno.

Ho usato i seguenti coloranti, disciolti in acqua marina, nella concentrazione 1:10000: rodamina B Bayer, Rosso neutro Riedel de Haen e Bleu cresile brillante Merck. La caffeina è stata impiegata in soluzioni in acqua di mare a concentrazioni da 0,1 a 0,01 molari a 18°-20°. L'acqua di mare, raccolta ad una certa distanza dalla costa, ha dato alle misure con un potenziometro Beckman con elettrodo di vetro, un valore di pH intorno a 7,8, con piccole variazioni in più o in meno.

Le osservazioni sono state fatte, sia in campo chiaro che in fluorescenza (eccitazione con radiazioni bleu ottenute con un filtro BG12) con un microscopio Leitz Dialux accoppiato ad una lampada allo xenon.

2) Azione della caffeina su materiale non colorato.

Le prime ricerche orientative sull'azione della caffeina sui protoplasti di *Bryopsis* e *Derbesia* mi hanno indicato che tutto il materiale, indipendentemente dal suo stato di attività, presenta un comportamento piuttosto uniforme. La caffeina a basse concentrazioni (soluzioni in acqua di mare da 0,1 M a 0,01 M) non è tossica e viene ben sopportata, non ostante che la sua permeazione avvenga molto rapidamente. Essa determina notevoli variazioni della struttura plasmatica, consistenti principalmente in un fenomeno di imbibizione, paragonabile a quello della contrazione vacuolare e, sotto certi aspetti, anche a quello dell'aggregazione (KÜSTER, 1956, pp. 536-539), e in uno smescolamento reso evidente dalla comparsa di numerose sferette di separazione.

Queste modificazioni della struttura plasmatica hanno carattere dinamico e una durata limitata, in quanto, dopo un certo tempo (da poco meno di un'ora a non più di quattro) il plasma riprende il suo aspetto normale.

Dato che la caffeina esplica un'azione uniforme su tutte le specie esaminate, mi limiterò a descrivere le osservazioni fatte su *Bryopsis cupressoides*, nel novembre 1960.

Il materiale esaminato proviene da colture in capsule di vetro in acqua marina semplice alla temperatura di 18°. L'accrescimento è relativamente lento e in certi filamenti, nella

porzione apicale si stanno formando, in qualche caso, i gameti. Gli apici sono abbastanza ricchi di citoplasma e all'osservazione microscopica presentano un aspetto finemente granulare non meglio definibile nè con ingrandimenti elevati nè col contrasto di fase.

Singoli filamenti vengono posti nel loro stesso liquido di coltura su un vetrino e, dopo essere stati ricoperti col coprioggetto, osservati al microscopio. Qui l'acqua di coltura viene sostituita con una soluzione di caffeina in acqua di mare alla concentrazione 0,05 M. Già dopo qualche minuto compaiono le prime modificazioni del plasma, consistenti nell'aumento del suo volume dovuto alla contrazione vacuolare. Il fenomeno è molto ben visibile, in particolare lungo le pareti laterali dei filamenti, in quanto aumenta la distanza fra la membrana esterna e lo strato dei plastidi che si trovano addossati al tonoplasto. Subito dopo compaiono nel plasma imbibito numerose sferette di separazione (Tav. I, fig. 1), che all'inizio sono molto piccole, ma lentamente aumentano di volume e confluiscono fra di loro fino a formare un certo numero di vacuoli di maggiori dimensioni (Tav. I, fig. 2), particolarmente grandi nel plasma apicale. Lungo le pareti laterali dei filamenti, invece, le sferette, dato anche il limitato spessore del plasma, rimangono sempre piccole e, soltanto di rado superano le dimensioni dei plastidi (Tav. I, fig. 3). Le sferette di separazione appaiono otticamente omogenee e il plasma circostante è sempre fortemente granulare.

A questo punto ha luogo un periodo di stasi nel quale non avvengono più altre modificazioni nell'aspetto del citoplasma e la cui durata può essere variabile (da una a più ore): infine, molto lentamente, le sferette, per la rottura della sottile membrana citoplasmatica che le isola dai vacuoli, confluiscono in essi e scompaiono.

La presenza della caffeina non influisce sulla vitalità dei filamenti e il materiale coltivato, dopo il trattamento, si comporta allo stesso modo di quello non trattato e si accresce normalmente.

3) *Fenomeni di accumulo dei coloranti neutri e basici durante la prima fase della reazione alla caffeina (fase di imbibizione plasmatica e di smescolamento) (*)*.

a) Rodamina B. — Questo colorante ha un carattere neutro, cioè si trova allo stato indissociato sia in ambiente basico che in ambiente acido ed è ben solubile, non soltanto in acqua, ma anche in solventi lipofili. Al microscopio UV dà una fluorescenza molto forte color giallo oro e, in certi casi, quando si lega chimicamente a determinate sostanze cellulari, essa vira al violetto (metacromasia negativa).

Nei filamenti di *Bryopsis* e *Derbesia* la rodamina B viene fortemente accumulata nel plasma, soprattutto in quello apicale, e talora nel succo vacuolare, in forma di sferette di separazione, sempre dando fluorescenza giallo oro (metacromasia positiva). L'accumulo plasmatico, come ho dimostrato in alcune mie recenti ricerche (HONSELL, 1961), è dovuto semplicemente alla soluzione del colorante nella fase lipofila del plasma, particolarmente abbondante in queste alghe: infatti, la colorazione è perfettamente reversibile ed è dovuta alla ripartizione della rodamina B tra fase lipofila plasmatica e fase idrofila della soluzione esterna.

Nel primo stadio della reazione alla caffeina, quando il plasma è imbibito e si sono formate le gocce di separazione, l'accumulo avviene normalmente e in modo abbastanza uniforme, tanto che l'intensità della fluorescenza (color giallo oro) è la stessa per tutto il protoplasma e si distinguono con difficoltà le sferette derivate dallo smescolamento (Tav. II, fig. 1). Tuttavia, ponendo il materiale per alcuni minuti in acqua pura, soltanto una parte del colorante viene dilavata: le sferette di separazione conservano la loro fluorescenza e il plasma rimanente diviene oscuro.

Talora si osservano nel succo vacuolare sferette di separazione più o meno grandi con debole fluorescenza giallo oro.

(*) Per la bibliografia relativa ai metodi e all'interpretazione dei fenomeni di accumulo di questi coloranti vedi STRUGGER (1949), DRAWERT (1956), HONSELL (1956, 57, 60).

Osservazioni in epoche diverse su esemplari delle quattro specie studiate hanno dimostrato una perfetta identità di comportamento.

b) Rosso neutro. — Il rosso neutro è un colorante basico il quale, disciolto in acqua marina, si trova esclusivamente sotto forma indissociata fortemente lipofila, con la tendenza, anche in soluzioni diluite, a precipitare in forma cristallina. La molecola indissociata e il catione colorato danno una colorazione rosso fragola o rosso aranciato: il tono metacromatico negativo tende invece al rosa-violetto.

Bryopsis e *Derbesia* accumulano fortemente il rosso neutro nel plasma, all'inizio con una colorazione diffusa uniforme tendente al rosso aranciato, ma successivamente, in seguito ad un fenomeno di smescolamento, compaiono in esso sferette di separazione le quali conservano il tono rosso aranciato, mentre la parte omogenea del plasma assume talora una debole colorazione metacromatica negativa tendente al violetto; infine, dopo un certo tempo, il colorante precipita nel plasma stesso allo stato cristallino. Talora ha luogo anche una colorazione diffusa del succo vacuolare con tono metacromatico positivo (rosso aranciato) e, più spesso, la formazione di sferette o globuli colorati, sempre in rosso aranciato, ma con debole intensità (Tav. II, fig. 6).

Quando il plasma è imbibito per azione della caffeina, il rosso neutro non dà più una colorazione diffusa, ma si concentra soltanto nelle sferette di separazione dando una colorazione rosso aranciata e, in seguito, parallelamente alla scomparsa di dette sferette, precipita in esso in aggregati cristallini (Tav. II, fig. 3).

Il succo vacuolare presenta talora la stessa colorazione che si osserva nel materiale non trattato con la caffeina.

Il materiale colorato, posto in acqua marina pura, trattiene il rosso neutro, che non è in grado, come avviene con la rodamina B, di passare all'esterno.

c) Bleu cresile brillante. — Questo colorante basico differisce dal rosso neutro, oltre che per le diverse tonalità della

colorazione (rosso violetto — metacromasia positiva, bleu cielo o bleu verde — metacromasia negativa), anche per la sua diversa costante di dissociazione: in acqua marina esso si trova soltanto in parte allo stato indissociato ed è ben solubile. L'andamento dell'accumulo avviene con le stesse modalità riscontrate per il rosso neutro, sia in materiale non trattato che in materiale previamente trattato con la caffeina.

Nel primo caso si osserva una colorazione diffusa molto intensa di color rosso violetto nel plasma e, qualche volta, ma molto più debole, nel succo vacuolare e nelle sferette di separazione che compaiono in esso. Successivamente, nel plasma compaiono sferette di separazione con colorazione metacromatica positiva, mentre la parte omogenea di esso assume una colorazione bleu cielo tenue o qualche volta bleu verde. Infine, anche in questo caso, dopo un certo tempo, il colorante precipita nel citoplasma in aggregati cristallini.

Quando la caffeina determina la formazione di sferette di separazione nel plasma, queste sole conservano la colorazione con tono metacromatico positivo (rosso violetto) mentre la porzione omogenea di esso si scolora.

4) *Fenomeni di accumulo dei coloranti neutri e basici durante la seconda fase della reazione alla caffeina (fusione delle sferette di separazione con il succo vacuolare).*

In questo stadio il plasma ha ripreso il suo aspetto normale e le sferette di separazione che si erano formate in esso sono confluite nel succo vacuolare, mescolandovisi in modo uniforme. Talora si osservano, tuttavia, alcune grosse gocce sferiche derivate da un processo di smescolamento del succo vacuolare stesso.

a) Rodamina B. — L'accumulo avviene normalmente nel plasma come nel materiale non trattato ed è facilmente dilavabile. Nel succo vacuolare le sferette che si formano, invece di presentare la solita debole fluorescenza giallo oro, hanno una tonalità metacromatica negativa tendente al verde (Tav. II, fig. 2).

b) Rosso neutro. — Il colorante non viene più accumulato nel plasma ma soltanto nel succo vacuolare che presenta una colorazione metacromatica negativa rosa-violetta relativamente intensa. In genere, il succo vacuolare è omogeneo e soltanto eccezionalmente si formano in esso sferette di separazione dello stesso colore.

Il colorante può permanere nel vacuolo anche per lungo tempo senza cristallizzare, ma in certi casi (*Bryopsis plumosa*, aprile 1961; *Derbesia tenuissima* nel settembre dello stesso anno) dopo circa mezz'ora dall'inizio della colorazione esso precipita in piccoli aggregati cristallini, i quali, pur conservando la forma di quelli che si depositano nel plasma, sono di minori dimensioni e i cristalli aghiformi che li compongono sono molto più corti.

c) Bleu cresile brillante. — I fenomeni osservati concordano perfettamente con quanto avviene per il rosso neutro. In certi casi, tuttavia, ho potuto osservare due tipi di sferette di separazione nel succo vacuolare, uno costituito da sferette più grandi, con colorazione metacromatica positiva e l'altro di sferette più piccole colorate con tono metacromatico negativo (bleu cielo) (Tav. II, fig. 4).

5) Azione della caffeina su materiale preventivamente colorato.

I filamenti di *Bryopsis* e *Derbesia*, colorati come sopra, vengono posti al microscopio e, durante l'osservazione, l'acqua di mare nella quale sono immersi viene sostituita con altra contenente caffeina nella concentrazione 0,05 M.

a) Rodamina B. — Gli unici effetti visibili della permeazione della caffeina consistono nella comparsa di sferette di separazione nel succo vacuolare con fluorescenza metacromatica negativa tendente al verde. Talora il colorante concentrato nel plasma tende a passare con maggiore velocità nell'ambiente esterno e talora si osserva qualche smescolamento nel plasma. Comunque non avviene l'imbibizione plasmatica che si riscontra sempre quando il materiale non colorato viene trattato con la caffeina.

b) Rosso neutro. — Il plasma si scolora rapidamente ma il rosso neutro non passa all'esterno come nel caso della rodamina B, ma migra completamente nel succo vacuolare il quale, in pochi secondi, assume una bella colorazione diffusa rosa-violetta (Tav. II, fig. 5), che per un certo tempo permane inalterata, fino a quando inizia la cristallizzazione del colorante nel succo vacuolare stesso. Non si osservano sferette di separazione nè nel plasma nè nel succo vacuolare.

c) Bleu cresile brillante. — Si osservano gli stessi fenomeni che avvengono per il materiale colorato col rosso neutro. Il succo vacuolare assume un'intensa colorazione omogenea bleu cielo e dopo un certo tempo avviene in esso la precipitazione del colorante.

Nel caso in cui il rosso neutro e il bleu cresile brillante si trovino già precipitati nel plasma allo stato cristallino, la caffeina non è in grado di esercitare su di essi alcuna azione e si osservano invece gli stessi fenomeni già descritti all'inizio e, cioè, l'imbibizione del plasma e il suo successivo smescolamento.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le presenti ricerche sulla reazione della caffeina nei protoplasti di *Bryopsis* e *Derbesia*, trattati o non con coloranti basici e neutri, mettono in evidenza alcuni particolari problemi di citofisiologia, relativi soprattutto alla costituzione e allo stato colloidale del protoplasma vivo di queste interessanti alghe marine.

La prima questione concerne le variazioni che la caffeina induce, con la sua presenza, nel citoplasma, variazioni che, fino ad oggi, non erano state mai osservate in altre cellule vegetali.

Come è noto, l'azione della caffeina sulle cellule vive, ampiamente descritta fin dal secolo scorso (OVERTON, 1899 e altri), consiste semplicemente nel fatto che questo alcaloide determina la precipitazione dei tannini, o meglio, un processo di

smescolamento del sistema colloidale costituito dal succo vacuolare, quando in esso sono presenti queste sostanze, messo in evidenza dalla comparsa di minute goccioline di separazione. La reazione è molto specifica e viene indicata da STRUGGER (1949) come un metodo di riconoscimento molto sensibile e preciso. Il fenomeno della precipitazione può essere spiegato, ammettendo che la caffeina si unisca in qualche modo ai tanini, dando origine ad un composto o ad una soluzione, la cui presenza determinerebbe uno squilibrio del sistema colloidale vacuolare e il conseguente smescolamento.

I fenomeni che si osservano invece in *Bryopsis* e *Derbesia*, pur consistendo anch'essi in variazioni del sistema colloidale, sono del tutto diversi, sia perchè interessano esclusivamente il citoplasma, sia perchè presentano un dinamismo che non può non essere attribuito all'attività vitale di esso. La prima fase della reazione consiste in una imbibizione del plasma, seguita rapidamente da un processo di vacuolizzazione che potrebbe anche essere interpretato come un fenomeno di smescolamento, che, sotto certi aspetti, presenta molte affinità, tanto con la contrazione vacuolare (KÜSTER, 1927; WEBER, 1930; STRUGGER, 1936, 1940; HÖFLER, 1940), che con quella particolare aggregazione plasmatica da me descritta in *Utricularia* (HONSELL, 1956). In *Bryopsis* e *Derbesia*, tuttavia, l'imbibizione è una fase transitoria di breve durata, mentre la vacuolizzazione, accompagnata dal contemporaneo aumento della granulazione del plasma, come avviene in *Utricularia*, è un fenomeno molto più sviluppato ed evidente.

La ragione di questi fenomeni (contrazione vacuolare e aggregazione) è, comunque, da ricercare in modificazioni dello stato colloidale del plasma indotte da fattori diversi: il fatto che la caffeina eserciti questa sua azione esclusivamente in *Bryopsis* e *Derbesia* deve logicamente farci pensare che nel plasma di queste *Siphonales* sia presente una specifica « sostanza di accumulo » che presenta una particolare affinità per la caffeina, la quale ultima, legandosi ad essa, determinerebbe un sensibile aumento della sua idrofilia. Così si spiegherebbe, non solo il processo iniziale di imbibizione plasmatica, ma an-

che la formazione dei vacuoli o sferette di separazione e il relativo graduale aumento di volume, che in un primo tempo non è dovuto alla loro riunione e reciproca fusione. Del resto, già RÜTER e BORNSTEIN (1925) e successivamente WASSILJEWA (1938) hanno da tempo rilevato come la caffeina eserciti sul coefficiente di ripartizione di alcuni coloranti un'azione a favore della fase idrofila. Il fenomeno sarebbe quindi analogo.

L'andamento dell'accumulo del colorante basico rodamina B e di quelli neutri, rosso neutro e bleu cresile brillante, durante la reazione plasmatica della caffeina, come anche l'effetto che essa determina sul materiale che sia stato previamente colorato, confermano ulteriormente questa interpretazione sul suo meccanismo di azione.

Inoltre, dai risultati delle presenti ricerche è possibile rilevare che l'affinità della caffeina per questa particolare « sostanza di accumulo » presente nel plasma di *Bryopsis* e *Derbesia* è inferiore rispetto a quella esistente fra caffeina e coloranti basici. Infatti, se il rosso neutro o il bleu cresile brillante si trovano già accumulati nella fase lipofila del plasma, in conseguenza di un effetto di ripartizione con la soluzione colorante esterna (HONSELL, 1961), immergendo il materiale in una soluzione di caffeina, si potrà facilmente constatare che questa non determina più il fenomeno di imbibizione e vacuolizzazione plasmatica, come avviene nel materiale non colorato, ma provoca soltanto la migrazione del colorante dal plasma (fase lipofila) al succo vacuolare (fase idrofila) e una modificazione metacromatica in senso negativo della sua tonalità. Ha luogo, pertanto, una modificazione del coefficiente di ripartizione dei coloranti verso l'idrofilia, perfettamente corrispondente ai fatti rilevati da RÜTER e BORNSTEIN (1925) e WASSILJEWA (1938) e, allo stesso momento, un fenomeno di metacromasia che, secondo KINZEL (1958), indica chiaramente l'insorgere di una combinazione chimica fra caffeina e coloranti.

I coloranti basici esercitano, quindi, una concorrenza nel legare la caffeina di fronte alla « sostanza di accumulo » plasmatica.

Più difficile da interpretare è il rapporto fra caffeina e rodamina B: questo colorante neutro non dà colorazione metacromatica negativa in presenza di caffeina, al contrario di quanto è stato osservato da FLASCH (1955) nelle cellule epidermiche delle tuniche di *Allium cepa*. E' necessario, tuttavia, tener conto, oltre al carattere neutro della rodamina, anche del fatto che in questo caso il materiale è costituito da alghe marine e che i numerosi ioni presenti nell'acqua di mare sono egualmente presenti anche nel succo vacuolare e, probabilmente, esercitano una azione inibitrice sulla combinazione di queste due sostanze. A questo bisogna ancora aggiungere che la rodamina B, quando è accumulata nel plasma, impedisce l'azione della caffeina, mentre il colorante non è dilavabile dalle sferette di separazione che compaiono nel plasma previamente trattato: ciò conferma, quindi, che, pur non manifestandosi un fenomeno di metacromasia negativa, tuttavia fra caffeina e rodamina B esiste certamente un'interazione reciproca che le attuali conoscenze impediscono di meglio definire.

La differenza di comportamento fra rodamina e coloranti basici è sensibile e potrebbe essere attribuita al diverso carattere chimico-fisico e, in particolare, al fatto che la prima, anche in soluzione acquosa, è dissociabile soltanto a valori estremi di pH mentre i secondi si trovano per lo più in forma di cationi colorati maggiormente reattivi.

In conclusione, le presenti ricerche confermano ulteriormente la particolare costituzione del plasma di *Bryopsis* e *Derbesia* mettendo in rilievo l'esistenza in esso di una « sostanza di accumulo » alla quale sono da attribuire, non solo i fenomeni di imbibizione e smescolamento che si manifestano in presenza della caffeina, ma anche l'elevata capacità di concentrazione nel plasma di coloranti basici e neutri.

Portici, ottobre 1961

Lavoro eseguito nell'Istituto di Botanica Generale della Facoltà Agraria di Portici diretto dalla prof.sa Valeria Mezzetti Bambacioni.

SOMMARIO

Il plasma delle specie esaminate di *Bryopsis* e *Derbesia* dà con la caffeina una reazione del tutto particolare, mai osservata in altre cellule vegetali.

La penetrazione della caffeina nei protoplasti vivi di queste alghe determina un notevole fenomeno di imbibizione plasmatica, seguito dopo breve tempo dalla neoformazione di numerosi piccoli vacuoli, i quali, man mano, confluiscono fra di loro e infine si fondono col grosso vacuolo centrale primario. L'imbibizione del plasma diminuisce in seguito alla vacuolizzazione e alla fine del processo la cellula presenta un aspetto normale.

Lo studio dei rapporti fra questi fenomeni e l'andamento dell'accumulo di alcuni coloranti basici e neutri permette di trarre la conclusione che nel plasma di *Bryopsis* e *Derbesia* sia presente, in concentrazioni relativamente elevate, una particolare sostanza per la quale, sia la caffeina, che detti coloranti hanno molta affinità.

I fenomeni che si manifestano nello stato colloidale del plasma in presenza della caffeina sono da mettere in rapporto con la proprietà di questa sostanza di modificare il coefficiente di ripartizione dei composti con i quali si combina, a favore della fase idrofila, diminuendo la loro lipofilia.

Il dinamismo dei fenomeni osservati sta, inoltre, a dimostrare la capacità del plasma vivente di ripristinare l'equilibrio del suo sistema colloidale eliminando la caffeina nel succo vacuolare.

SUMMARY

The plasma of *Bryopsis* and *Derbesia* reacts with caffeine in a very peculiar manner, never observed in other vegetal cells.

The penetration of caffeine into the living protoplasts of these algae causes a remarkable plasmatic imbibition. Shortly after initiates the formation of many vacuoles, which gradually flow together and at last dissolve in the primary central vacuole. The plasmic imbibition decreases during the vacuolisation process. At the end, the plasm retakes its normal aspect.

The study of the relations which subsists between this fact and the accumulation process of some basic and neutral dyes leads us to the conclusion that in the plasm of *Bryopsis* and *Derbesia* exists, in relatively high concentration, a substance wich shows a remarkable tendency to combine to caffeine and dyes.

The phenomena which occur in the plasmatic colloidal state when caffeine is present, are to be related to the capacity of this substance to modify the distribution coefficient of the compounds which react with it: this modification favours the hydrophilic phase and result in a decrease of their lipophily.

The dynamism of the reported phenomena reveals the ability of the living plasma in renewing its colloidal system balance and in eliminating caffeine by transferring it to the vacuolar sap.

B I B L I O G R A F I A

- BOOLJ, H. L. and H. G. BUNGENBERG DE JONG. - Biocolloids and their interactions. *Protoplasmatologia*. Bd. I, 2: 148-153. 1956.
- DRAWERT, H. - Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Bd. II: 252-289. Berlin, Göttingen, Heidelberg. 1956.
- FLASCH, A. - Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen. *Protoplasma*. 44: 412-421. 1955.
- HÖFLER, K. - Salzquellung des Protoplasmas und Ionenantagonismus. *Ber. d. Dtsch. Bot. Ges.* 58: 292-305. 1940.
- — - Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie. *Mikroskopie*, 1° Sonderband. Wien, 1949.
- — - Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung. *Ber. d. Dtsch. Bot. Ges.* 66: 453-467. 1953.
- — —, W. URL und A. DISKUS. - Speicher Konkurrenz im Protoplasten einiger Meeresalgen bei Rhodamin-B-Färbung. *Protoplasma*, 45: 630-632. 1956.
- HONSELL, E. - Aggregazione protoplasmatica, fenomeni osmotici e colorazione vitale nelle cellule ghiandolari degli ascidi di *Utricularia vulgaris* L. *Annali di Bot.* XXV: 94-126. 1956.
- — - Colorazione vitale con coloranti basici diacromi e fenomeni di accumulo nel citoplasma di *Bryopsis plumosa* (Huds.) C. Ag. *Annali Fac. Agr. Portici*, XXIII: 147-157. 1957.
- — - Nuove ricerche sui fenomeni di accumulo di alcuni fluorocromi basici e neutri nel plasma di *Bryopsis* e *Derbesia*. *Annali di Bot.* XXVI: 421-434. 1961.
- KINZEL, H. - Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. *Protoplasma*, 50: 1-50. 1958.

- KÜSTER, E. - Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. *Protoplasma*, 1: 73-104. 1927.
- OVERTON, E. - Ueber die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zellen, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Vjschr. Naturf. Ges. Zürich*, 44: 88-135. 1899.
- RÜTER, E. und A. BORNSTEIN. - Über den Einfluss von Alkaloiden und Salzen auf die Vitalfärbung. *Pflügers Arch.* 207: 614-623. 1925.
- STRUGGER, S. - Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma*, 26: 56-69. 1936.
- — - Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma*, 34: 601-608. 1940.
- — - *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze*. 2 Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg. 1949.
- WASSILJEWA, N. E. - Wirkung verschiedener Substanzen auf die Verteilung von Vitalfarbstoffen zwischen wässriger und lipoider Phase. *Biol. Z.*, 7: 131-142. 1938.
- WEBER, F. - Vakuolen-Kontraktion vital gefärbter Elodeazellen. *Protoplasma*, 9: 106-119. 1930.

E. HONSELL: *Modificazioni indotte dalla caffeina ecc.*



FIG. 1



FIG. 2

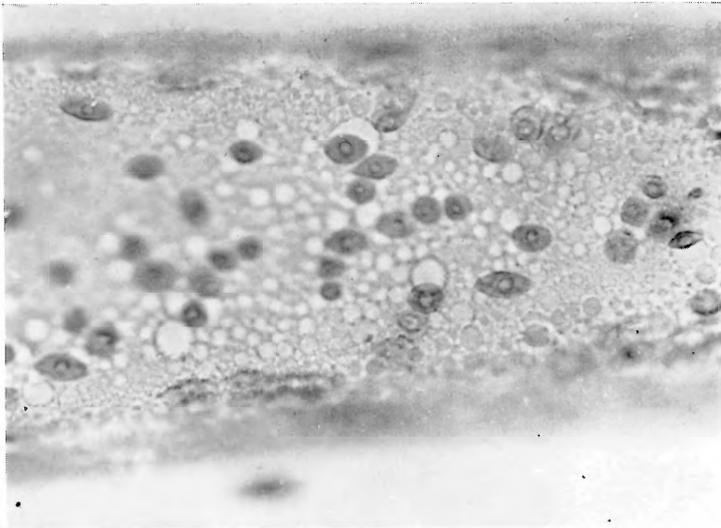


FIG. 3

Fig. 1. — Apice di *Bryopsis cupressoides* col plasma vacuolizzato, all'inizio della reazione della caffeina.

Fig. 2. — Lo stesso apice dopo un'ora, circa: i piccoli vacuoli sono confluiti fra di loro fino a formare alcuni vacuoli più grandi.

Fig. 3. — Vacuolizzazione del plasma lungo le pareti laterali dello stesso filamento. (ingrandimento 350 x)

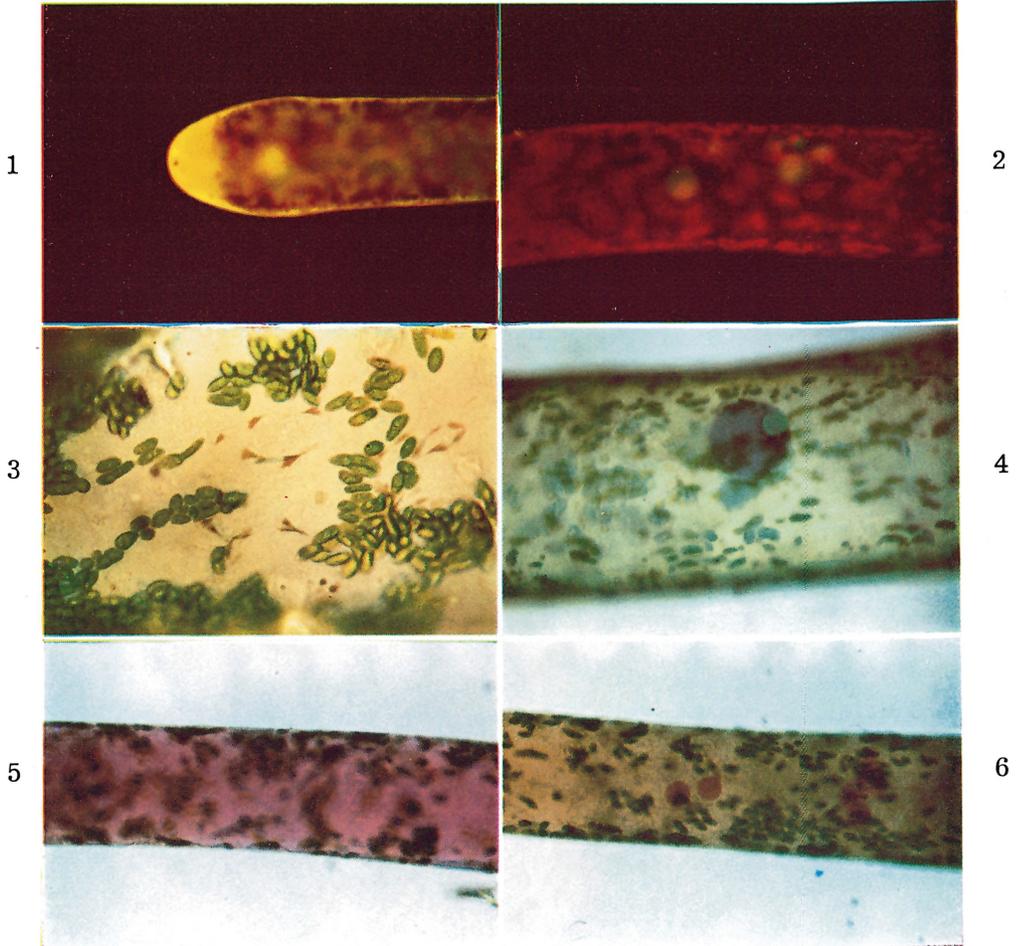
E. HONSELL: *Modificazioni indotte dalla caffeina ecc.*

Fig. 1. — Plasma apicale di *Bryopsis cupressoides* colorato con la rodamina B, all'inizio della reazione della caffeina, visto al microscopio a fluorescenza.

Fig. 2. — Accumulo della rodamina B in forma di sferette di separazione, nel succo vacuolare di materiale preventivamente trattato con caffeina.

Fig. 3. — Rosso neutro in forma di aggregati cristallini, precipitato nel plasma di *Bryopsis cupressoides*, alla fine della reazione della caffeina.

Fig. 4. — Bleu cresile brillante accumulato nel succo vacuolare, in forma di sferette di separazione con metacromasia positiva (rosso violetto) e negativa (bleu), durante la seconda fase della reazione della caffeina.

Fig. 5. — Filamento di *Bryopsis cupressoides* colorato col rosso neutro e quindi trattato con caffeina: il succo vacuolare assume una colorazione metacromatica negativa.

Fig. 6. — Lo stesso non trattato con caffeina: il succo vacuolare presenta una colorazione metacromatica positiva. (ingrandimento 100 x).

