

Giacomo Tripodi

Osservazioni sui fenomeni di accumulo del rosso neutro nel tubo pollinico (*)

INTRODUZIONE

P. DANGEARD (1923, 1933, 1934, 1956a, b) ha per primo affrontato il problema della evoluzione del sistema vacuolare nel tubo pollinico delle Angiosperme e, adottando le colorazioni vitali con il rosso neutro quale metodo di ricerca, concluse che esso trae origine da quello della microspora. Egli mise in evidenza come i vacuoli che lo costituiscono abbiano una morfologia variabile, ma riconducibile a due tipi distinti, dei quali il più diffuso è rappresentato da una serie di piccoli vacuoli sferici, mentre l'altro è costituito da vacuoli più grandi, di varia forma; tale differenza sarebbe da attribuire ad un diverso grado di imbibizione. In seguito alla colorazione vitale, i grandi vacuoli assumono un color rosa pallido, gli altri, invece, accumulano il rosso neutro più intensamente.

Queste osservazioni di P. DANGEARD vennero confermate dalle analoghe ricerche di HUREL-PY (1934), che, inoltre, ha rilevato l'esistenza di un rapporto fra colorazione vacuolare con il rosso neutro e il pH della soluzione colorante esterna, come era stato in precedenza dimostrato da IRWIN (1923, 1926) in *Nitella*, e da McCUTCHEON e LUCKÈ (1924).

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto Botanico della Facoltà di Agraria in Portici, diretto dalla prof.ssa Valeria Mezzetti Bambacioni.

Numerosi Aa. (vedi DRAWERT, 1956) hanno ampiamente dimostrato come sia determinante il pH della soluzione colorante esterna per tutti i fenomeni di permeazione e di accumulo, di qualsiasi tipo essi siano. Infatti, è condizione essenziale perchè possa avvenire la penetrazione dei coloranti nella cellula viva, che essi si trovino nella soluzione esterna, almeno in parte, allo stato non dissociato; la particolare costituzione del plasmalemma (BRIGGS, HOPE e ROBERTSON, 1961) consente il passaggio dei coloranti vitali soltanto per via lipidica e, di conseguenza, soltanto allo stato indissociato liposolubile (DRAWERT, 1939, 1940; HÖFLER, 1947). Pertanto, è evidente quale sia la importanza del pH della soluzione colorante e della costante di dissociazione dei singoli coloranti (COLLANDER, LÖNEGREN e ARHIMO, 1943; KINZEL, 1954).

Per quanto concerne i meccanismi di accumulo vacuolare, essi sono diversi, in relazione alla costituzione chimica e chimico-fisica dei succhi cellulari e dei coloranti impiegati. HÖFLER (1946) per primo ha distinto i succhi cellulari in *pieni* e *vuoti*, in funzione del meccanismo con il quale accumulano i coloranti: nei primi, l'accumulo avviene con il meccanismo della trappola ionica, per il quale il colorante, una volta penetrato nella cellula allo stato di molecola liposolubile, si dissocia nel vacuolo in ioni che, idrosolubili, non possono più migrare all'esterno; ciò determina nel plasma una caduta di concentrazione che consente la penetrazione di altre molecole dalla soluzione colorante esterna. I fattori che determinano questo tipo di accumulo sono il pH della soluzione esterna e quello del liquido vacuolare (che deve essere più basso), e la costante di dissociazione del colorante impiegato (KINZEL, 1954). Nei succhi cellulari pieni, l'accumulo è invece dovuto ad una combinazione tra il colorante e una determinata sostanza presente nel succo cellulare stesso; la quantità di colorante che viene così legata è in rapporto stechiometrico con la quantità della « sostanza di accumulo » presente nel vacuolo. KINZEL e BOLAY (1961) ritengono che tali sostanze abbiano nella loro molecola gruppi fenolici (sostanze flavonoidi e tanniche).

Le due diverse forme di accumulo vacuolare possono essere distinte per i fenomeni di metacromasia che gran parte dei

coloranti vitali presenta; secondo KINZEL (1958), le molecole e gli ioni hanno generalmente metacromasia *positiva* quando sono in soluzione, mentre il colorante legato ha una ben distinta metacromasia *negativa*: tuttavia, in alcuni casi, sia per l'azione di numerosi fattori che per il complicato andamento della dissociazione di molti coloranti, possono manifestarsi fenomeni metacromatici di significato diverso, spesso ancora non ben conosciuti.

DRAWERT (1956) riporta altri meccanismi di accumulo vacuolare, fra i quali di particolare importanza quelli in rapporto alla liposolubilità dei coloranti nei lipidi dispersi in alcuni succhi vacuolari, e quelli dovuti a fenomeni di adsorbimento dei cationi colorati a colloidali vacuolari a carica negativa. In questi casi, spesso si verificano fenomeni di smescolamento molto simili a quelli descritti in cellule artificiali colorate con il rosso neutro da BOOIJ e BUNGE BERG DE JONG (1956); secondo questi Aa., il fenomeno sarebbe dovuto alla formazione di un complesso tra colorante e una fase colloidale dispersa, ed è molto probabile che a questo meccanismo siano da attribuire anche i fenomeni di smescolamento che avvengono nei succhi cellulari e, talvolta, anche nel citoplasma di cellule vive.

Coloranti basici come il rosso neutro possono dare una colorazione plasmatica particolarmente evidente nei casi in cui manca la concorrenza nell'accumulo da parte del vacuolo. Per lo più si tratta di una soluzione delle molecole indissociate del colorante nelle fasi lipidiche del plasma (STRUGGER, 1940; TOTH, 1952); tuttavia, recenti ricerche hanno dimostrato che possono manifestarsi nel plasma vivo evidenti fenomeni di smescolamento determinati dall'accumulo di questi coloranti (HONSELL, 1957, 1959, 1962; HÖFLER, 1963; TRIPODI, 1964; HONSELL e TRIPODI, 1965). La natura di questi fenomeni non è ancora stata perfettamente chiarita, ma il fatto che in certi casi si abbiano colorazioni metacromatiche positive e in altri negative farebbe pensare, nel primo caso, ad un semplice smescolamento provocato dalla lipofilia del colorante in un plasma molto ricco di componenti lipidici in equilibrio colloidale instabile, mentre nel secondo si formerebbe un legame fra un determinato costituente plasmatico a carica negativa e i cationi colorati.

Dato che questi fenomeni avvengono sia in alghe marine (*Bryopsis*, *Bangia*) che in cellule embrionali di piante superiori, come mostrano osservazioni di HONSELL e mie (non ancora pubblicate), nel presente lavoro ho ritenuto opportuno studiare, alla luce delle recenti teorie, i fenomeni di accumulo vacuolare del rosso neutro nei microgametofiti in accrescimento di diverse Angiosperme, le eventuali colorazioni del citoplasma, e la sua reazione alla presenza di questo colorante.

PARTE SPERIMENTALE

Ho condotto le mie osservazioni e ricerche sul polline di nove Angiosperme coltivate nell'Orto Botanico di Portici, sia appena raccolto che conservato in essiccatore a 4-5°C. per qualche giorno, rilevando un identico comportamento in entrambi i casi. Il polline è germinato in soluzioni di saccarosio in acqua distillata, sopra portaoggetti tenuti in camera umida (una capsula Petri con carta bibula imbevuta) a 18°C.; per ogni singola specie ho trovato la concentrazione ottimale della soluzione nutritizia: *Eschscholtzia californica* (5%), *Alyssum maritimum* (4%), *Jucca gloriosa* (5%), *Scilla autumnalis* (14%), *Hosta ventricosa* (5%), *Crinum album* (5%), *Agapanthus umbellatus* (5%), *Haemanthus coccineus* (5%), *Tradescantia crassifolia* (5%).

Le osservazioni preliminari al microscopio in contrasto di fase mi hanno mostrato il tratto apicale dei tubi pollinici sempre occupato da plasma finemente granuloso, non vacuolizzato, con attive correnti citoplasmatiche: i vacuoli compaiono nel tubo pollinico soltanto quando questo si è accresciuto, nelle predette condizioni di esperimento, per un tempo che varia con la specie: 2-3 ore per *Jucca gloriosa*, 4-5 ore per *Alyssum maritimum*, 10-12 ore per *Haemanthus coccineus*.

Nel corso di queste osservazioni preliminari non ho visto i piccoli vacuoli sferici descritti da P. DANGEARD, i quali, idratandosi, dovrebbero dar luogo ai grandi vacuoli: questi ultimi sono ben visibili, e spesso occupano lunghi tratti di tubo pollinico.

Per le colorazioni ho adoperato il diacromo basico rosso neutro (RdH), dopo aver controllato cromatograficamente la sua purezza.

Per una esatta interpretazione dei fenomeni di accumulo è necessario conoscere come essi procedano con il variare della reazione del mezzo colorante; tuttavia, avendo le soluzioni di saccarosio adoperate quale mezzo nutritivo un pH intorno a 5.5, e dato che il polline fatto germinare in soluzioni con reazione regolata ad altri valori di pH da tamponi fosfatici ha presentato un comportamento irregolare, attribuibile sia alle condizioni non ottimali di pH, sia all'influenza che gli elementi presenti nella soluzione tampone hanno sulle attività metaboliche del tubo pollinico, ho dovuto usare la seguente tecnica: dopo aver ottenuto la germinazione nella soluzione zuccherina in acqua distillata (pH 5.5), ho prosciugato il mezzo nutritivo con carta bibula facendo in modo da lasciare gran parte dei granelli sul vetrino; rapidamente ho quindi aggiunta una goccia di una soluzione tamponata con fosfati M/150 (pH 3.5 e pH 6.8), alla stessa concentrazione zuccherina usata per la germinazione; in questa era anche disciolto il colorante diluito 1:10.000; l'eccesso non ha disturbato le osservazioni.

Un controllo al microscopio in contrasto di fase in soluzioni tamponate prive di colorante, mi ha mostrato come il tubetto pollinico resista bene alle variazioni momentanee di pH: infatti, le correnti citoplasmatiche non subiscono alterazioni apprezzabili. Non ho osservato modificazioni morfologiche vacuolari o citoplasmatiche, nè formazioni che possano far pensare ai piccoli vacuoli sferici di P. DANGEARD.

Per le sue caratteristiche di dissociazione il rosso neutro si trova nelle soluzioni con pH intorno alla neutralità quasi esclusivamente allo stato molecolare, mentre al di sotto di pH 6.0 è ionizzato e, quindi, in condizione di non poter penetrare nelle cellule; a valori tra 6 e 7 coesistono molecole indissociate e ioni.

I fenomeni di accumulo rilevabili dopo una colorazione eseguita con le modalità riportate interessano sia la parete sporale che il contenuto del tubo pollinico:

L'*esosporio*, nei casi osservati, si colora intensamente e con rapidità in rosso violaceo sia a pH 3.5 che a pH 5.5 e 6.8.

La *parete del tubo pollinico*, in corrispondenza dei valori di pH saggiati, non ha mai accumulato il colorante.

I *grandi vacuoli*, a pH 3.5, non hanno mai presentato fenomeni di accumulo del rosso neutro; l'accumulo vacuolare è solo raramente osservabile a pH 5.5, ma si verifica costantemente a pH 6.8, in forma diffusa e con metacromasia positiva (colorazione rosso fragola dei succhi cellulari). Il vacuolo contenuto nella microspora assume il rosso neutro anche prima di immettersi nel tubo: infatti, esercitando una pressione sul coprioggetto, si provoca una rottura all'apice del tubetto e il suo rapido svuotamento: si osservano allora i grandi vacuoli scorrere perfettamente colorati (Tav. I, 2).

L'ammoniaca in dosi biologiche (N/200-N/400) ha la capacità di permeare rapidamente la cellula; HÖFLER (1946) così trattando succhi cellulari vuoti in precedenza colorati con rosso neutro, ne provocava la completa decolorazione: l'ammoniaca, infatti, alcalinizzando il liquido vacuolare, fa regredire la dissociazione del colorante che, non più trattenuto con il meccanismo della trappola ionica, diffonde all'esterno. In tutte le specie di polline da me esaminate, questa reazione ha sempre dato esito positivo: si è avuta, cioè, una decolorazione immediata del succo cellulare.

Il *plasma* dà luogo a fenomeni di accumulo del rosso neutro, particolarmente in corrispondenza di pH 5.5 e 6.8; le modalità secondo le quali esso si verifica sono diverse: con maggior frequenza ho osservato un accumulo in forma diffusa, con metacromasia positiva, particolarmente intenso nella parte apicale del tubetto. A valori più bassi di pH (3.5) ho, in qualche caso, osservato un debole accumulo, del quale però non sono in grado di stabilire il carattere metacromatico. Altrettanto raramente ho osservato, in corrispondenza di pH 5.5, una colorazione diffusa apicale con metacromasia negativa.

Una diversa forma di accumulo, che ho rilevato con maggiore frequenza in *Eschscholtzia californica* e in *Haemanthus coccineus*, si manifesta con la comparsa in seno al citoplasma di granulazioni che a volte assumono la forma di sferette con metacromasia negativa (rosso rubino) (Tav. I, 3). Questo fenomeno non è però costante, ma gode, rispetto all'accumulo diffuso, di una maggiore indipendenza nei confronti del pH della so-

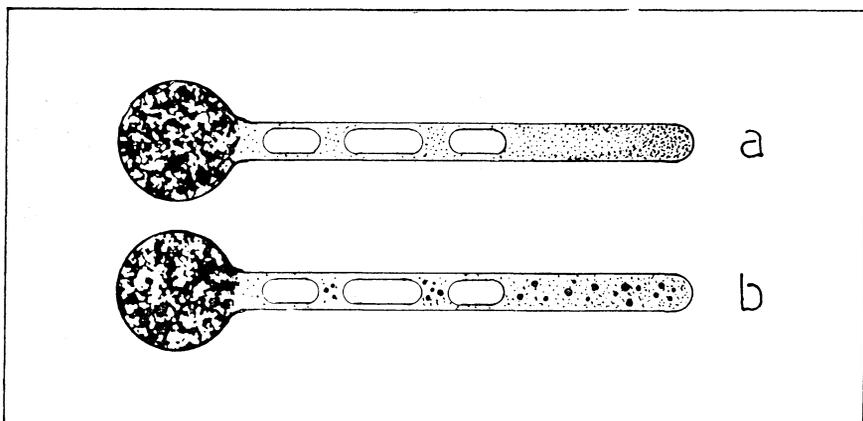


Fig. 1. — Dinamica dell'accumulo plasmatico: ad una iniziale colorazione diffusa (a), segue l'insorgere nel plasma di sferette colorate (b).

luzione colorante esterna, tanto che si verifica, sebbene in misura ridotta, anche a pH 3.5 (Tav. I, 4). Queste sferette sono ben distinguibili dai vacuoli, sia per il carattere metacromatico nettamente negativo, e sia perchè, in seguito alle colorazioni eseguite a pH 3.5, sono fortemente colorate, mentre i vacuoli restano incolori (Tav. I, 4). Inoltre, la reazione dell'ammoniaca, che ha sempre dato esito positivo nel determinare la decolorazione dei vacuoli, non ha avuto esito alcuno sulle sferette.

Lo schema in Fig. 1 illustra la dinamica dell'accumulo plasmatico.

Ho riassunto in Tabella 1 le osservazioni riportate.

Tabella 1

pH	esosporio	parete del tubo	acc. plasmatico		acc. vacuolare
			diffuso	con sferette	
3.5	+ + +	- - -	- - -	+ - -	- - -
5.5	+ + +	- - -	+ + -	+ + -	+ - -
6.8	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +

Tutti gli esperimenti sono sempre stati completati da un accurato controllo della vitalità del materiale, sia con il metodo plasmolitico che con l'osservazione delle correnti citoplasmatiche. Fatta eccezione di alcuni casi di abnorme accumulo di tipo decisamente postvitale, che non sono stati presi in considerazione, ritengo che i fenomeni osservati non abbiano molto influenzato la vitalità dei tubetti pollinici. Essi hanno conservato la capacità di plasmolizzare, almeno nei momenti immediatamente successivi alla colorazione, e soltanto nei casi in cui lo accumulo plasmatico superava un certo limite ho osservato un arresto delle correnti citoplasmatiche: evidentemente, la presenza del colorante determinava l'insorgere di fenomeni necrotici.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I meccanismi secondo i quali avviene l'accumulo vacuolare dei coloranti basici dipendono dalla natura fisica e chimica del succo cellulare: l'accumulo nei succhi pieni è determinato da sostanze disperse nel vacuolo che hanno affinità con il colorante, e che, quindi, con esso si combinano; qualora manchino sostanze di questo tipo, il pH del liquido vacuolare è determinante per l'accumulo in forma ionica (IRWIN, 1923, 1926) caratteristico dei succhi cellulari vuoti (HÖFLER, 1946).

KINZEL (1954, 1958) ha ampiamente dimostrato che queste diverse forme di accumulo possono definirsi in base ai fenomeni metacromatici che molti coloranti presentano in relazione al loro stato fisico. Il rosso neutro, adoperato nelle descritte esperienze, dà una colorazione negativa rosso rubino o violetto quando è legato a determinati costituenti cellulari, e una colorazione rosso-fragola o arancio (metacromasia positiva) quando, invece, è libero o più o meno dissociato.

Alla luce di questi fatti è possibile interpretare come segue i fenomeni di accumulo del rosso neutro nei microgametofiti delle specie sopra indicate: come ha rilevato P. DANGEARD (1923 e seg.), e come risulta dalle presenti ricerche, i grandi vacuoli del tubetto pollinico, che nelle specie qui esaminate derivano dai vacuoli presenti nella microspora, accumulano il rosso neutro assumendo una colorazione rosata che, per il suo carattere metacromatico, è da attribuire ad un accumulo del tipo dei succhi cellulari vuoti (HÖFLER, 1946), con il meccanismo della trappola ionica. Questo tipo di accumulo dipende dal pH della soluzione colorante esterna e dalla costante di dissociazione del colorante (HÖFLER, 1946, 1954; DRAWERT, 1956), ed è confermato dalla reazione dell'ammoniaca (HÖFLER, 1946); ho potuto constatare come questa colorazione non abbia luogo al di sotto di pH 5.5; ciò conferma i dati analoghi rilevati da HUREL-PY (1934) nei tubi pollinici di *Lilium* spp., *Eschscholtzia californica*, *Sedum stoloniferum* etc.; da queste considerazioni si può, quindi, dedurre che nei grandi vacuoli presenti nel tubo pollinico delle specie da me studiate mancano sostanze capaci di legare il colorante, e ciò, forse, è in relazione alla breve durata di queste formazioni, nelle quali non si accumulano che in tracce i prodotti di secrezione e di escrezione plasmatica, di cui, in genere, fanno parte quelle sostanze che, combinandosi con il colorante, determinano il meccanismo di accumulo dei succhi pieni.

Il succo cellulare deve essere leggermente acido, inferiore a pH 5.5, valore della soluzione colorante al di sotto del quale non si osserva colorazione; infatti, perchè abbia luogo un accumulo vacuolare di coloranti basici è necessario che la soluzione esterna abbia un pH più alto di quello del succo cellulare (DRAWERT, 1956).

Nei tubi pollinici hanno luogo, inoltre, altre manifestazioni di accumulo del rosso neutro, descritte da P. DANGEARD, e attribuite da questo A. ad un vacuoma allo stato disperso. Anche nel materiale qui studiato ho osservato, sebbene in maniera poco costante, l'insorgere nel citoplasma di sferette con colorazione metacromatica negativa; in questi casi si tratta, a mio avviso, di un fenomeno dovuto alla combinazione del colorante con un costituente plasmatico (KINZEL, 1954, 1958). Il fenomeno è ben noto per i succhi cellulari pieni, ed è stato recentemente descritto per il citoplasma di *Bryopsis* (HONSELL, 1957, 1959, 1962; HÖFLER, 1963), dove la presenza del colorante determina fenomeni di smescolamento con separazione di sferette con metacromasia negativa. In questi casi evidentemente si produce una alterazione dell'equilibrio colloidale plasmatico; inoltre, tali fenomeni possono subire l'influenza dell'attività stessa del citoplasma. Osservazioni analoghe ho recentemente fatto in *Bangia* (TRIPODI, 1964) e altre, su questo stesso materiale, sono in corso di pubblicazione (HONSELL e TRIPODI, 1965). La formazione di queste sferette cromofile nel plasma del tubo pollinico segue perfettamente il dinamismo descritto da HONSELL (1962) in *Bryopsis*: ad una iniziale colorazione diffusa con metacromasia positiva probabilmente dovuta ad una soluzione delle molecole del colorante nelle fasi lipidiche del plasma, segue l'insorgere delle sferette. Queste formazioni, che dovrebbero corrispondere ai piccoli vacuoli sferici rosso-violetto descritti da P. DANGEARD, sarebbero pertanto da considerare come fenomeni di smescolamento indotti dalla presenza del colorante nel citoplasma. Esse, infatti, compaiono solo in conseguenza della colorazione, in quanto le numerose osservazioni eseguite al microscopio in contrasto di fase su materiale non colorato, non mi hanno mai fatto rilevare formazioni di questo tipo; d'altra parte, se le sferette idratandosi si evolvessero nei grandi vacuoli, anche in questi si dovrebbero trovare sostanze in grado di legare il colorante.

Il problema della particolare reattività del plasma, dimostrato dalla comparsa di sferette di separazione, e rilevata soltanto di rado e in tempi recenti (*Bryopsis* e *Bangia*), è di un altro ordine; non è da escludere che i plasmi giovani in attivo

accrescimento, sui quali si hanno poche notizie sotto questo punto di vista, abbiano una costituzione del sistema colloidale citoplasmatico diversa da quella dei plasmi adulti e, quindi, in equilibrio labile, che può venir rotto dalla presenza, decisamente innaturale, di un colorante.

Concludendo, dalle presenti ricerche si può dedurre che nei tubi pollinici delle specie elencate in precedenza sono presenti succhi cellulari vuoti, mentre le formazioni a metacromasia negativa che compaiono dopo la colorazione con rosso neutro sono da considerare come fenomeni di smescolamento del sistema colloidale citoplasmatico indotti dalla presenza del colorante, e determinati da una sostanza che ha per esso una particolare affinità. Questo fenomeno, descritto soltanto in pochi casi, è molto interessante, e sembra si manifesti soprattutto nei citoplasmi di cellule in attivo accrescimento.

Portici, Istituto Botanico, dicembre 1964.

RIASSUNTO

L'A. esamina le modalità di accumulo del diacromo basico rosso neutro nel plasma e nel vacuolo del tubo pollinico di alcune Angiosperme, rilevando che:

a) il colorante viene accumulato dal citoplasma in forma diffusa con metacromasia positiva, in particolar modo all'apice del tubo pollinico; tale accumulo è dovuto alla liposolubilità delle molecole del rosso neutro nei costituenti lipidici del plasma. Talvolta, i fenomeni di accumulo del colorante sono dovuti ad un meccanismo diverso, messo in evidenza dall'insorgere nel citoplasma di sferette di separazione con metacromasia negativa: evidentemente, in questi casi si ha la formazione di un legame tra qualche costituente del colloide plasmatico e il colorante. L'A. avanza l'ipotesi che questi diversi meccanismi di accumulo possano essere determinati dalle attività metaboliche del plasma stesso.

b) l'accumulo vacuolare si verifica secondo il meccanismo della trappola ionica, con colorazione diffusa a metacromasia positiva. Questo accumulo ha luogo soltanto quando il pH della soluzione colorante esterna è più alto di quello del succo cellulare e, dato che di rado la soluzione di rosso neutro tamponata a pH 5.5 ha fatto rilevare fenomeni di accumulo vacuolare, l'A. deduce che il pH del succo cellulare del tubo pollinico delle specie esaminate si aggira intorno a tale valore.

SUMMARY

After the examination of the accumulation modalities of the basic dye neutral red in the pollen tube of some Angiosperms, the A. points out that:

a) the dye is accumulated in the cytoplasm as undissociated molecules in solution in the lipid phases with a positive metachromatic effect, particularly in the apical portions. Sometimes, another accumulation modality is pointed out by the formation, in the cytoplasm, of little spheres with a negative metachromatic effect, which indicates a bond between the dye and some plasmatic chromophile phase. The A. thinks probable that the metabolic activities of the cytoplasm can determine the accumulation modalities of the dyes.

b) the vacuoles accumulate the neutral red by ionic trap and, therefore, with a positive metachromatic effect. This phenomenon occurs only when the pH of the colouring solution of neutral red is higher than that of the cell sap and, as only seldom the A. has noticed a vacuolar accumulation with neutral red at pH 5.5, he deduces that, in the examined cases, the vacuolar pH is about the above said range.

BIBLIOGRAFIA

- BOOIJ, H. L. & H. G. BUNGEDEBERG DE JONG, 1956. *Biocolloids and their interactions*. Protoplasmatologia, **1**, (2): 148-153.
- BRIGGS, G. E., A. B. HOPE & R. N. ROBERTSON, 1961. *Electrolytes and plant cells*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- COLLANDER, R., H. LÖNEGREN & E. ARHIMO, 1943. *Das Permeationsvermögen eines basischen Farbstoffes mit demjenigen einiger Anelektrolyte verglichen*. Protoplasma, **37**: 527-537.
- DANGEARD, P., 1923. *Le vacuome dans les grains de pollen des Gymnospermes*. C. r. Ac. Sc., Paris, **176**: 915-917.
- —, 1933. *Sur le vacuome des grains de pollen et dans les tubes polliniques*. C. r. Ac. Sc., Paris, **197**: 858-860.
- —, 1934. *Les caractères du vacuome dans les grains de pollen et dans les tubes polliniques*. Le Botaniste, **26**: 235-240.
- —, 1956a. *Le vacuome des grains de pollen et sa coloration vitale*. Protoplasma, **46**: 152-159.
- —, 1956b. *Le vacuome de la cellule. Morfologie*. Protoplasmatologia, **3**, (1): 16-18.
- DRAWERT, H., 1939. *Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen*. Planta, **29**: 376-391.
- —, 1940. *Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem*. Flora, **134**: 159-214.
- —, 1956. *Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung*. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, **2**: 252-289.
- HÖFLER, K., 1946. *Sur la coloration vitale des vacuoles par l'orange d'Acridine et le rouge neutre*. C. r. Ac. Sc., Paris, **223**: 335-337.
- —, 1947. *Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von den Plasmapermeabilität und Stoffespeicherung?* Mikroskopie, **2**: 13-29.
- —, 1954. *Sur la coloration vitale et fluorescente des algues*. Atti dello 8° Congresso Internazionale di Parigi, **17**: 10-12.
- —, 1963. *Zur Vitalfärbbarkeit von Bryopsis*. Protoplasma, **56**: 376-380.
- HONSELL, E., 1957. *Colorazione vitale con coloranti basici diacromi e fenomeni di accumulo nel citoplasma di Bryopsis plumosa (Huds.)*. C. Ag. Ann. Fac. Agr., Portici, **23**: 147-158.

- —, 1959. *Nuove ricerche sui fenomeni di accumulo di alcuni fluorocromi basici e neutrici nel plasma di Bryopsis e Derbesia*. Ann. di Bot., Roma, **26**: 421-434.
- —, 1962. *Sulla natura dell'accumulo plasmatico in vivo di alcuni dia-cromi e fluorocromi basici e neutri in Bryopsis e Derbesia*. Protoplasma, **55**: 632-655.
- — & G. TRIPODI, 1965. *Ricerche comparate sui fenomeni di permeabilità ed accumulo di coloranti vitali in due specie di Bangia viventi in condizioni ecologiche diverse*. (in corso di pubblicazione).
- HUREL-PY, G., 1934. *Recherches sur les conditions du pH nécessaires pour obtenir la germination des grains de pollen et la coloration vitale de leurs vacuoles*. C. r. Ac. Sc., Paris, **198**: 195-197.
- IRWIN, M., 1923. *The permeability of living cells to dyes as affected by hydrogen concentration*. J. Gen. Physiol., **5**: 223-224.
- —, 1926. *Mechanism of the accumulation of the dye in Nitella on the basis of the entrance of the dye as undissociated molecules*. J. Gen. Physiol., **9**: 561-573.
- KINZEL, H., 1954. *Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften*. Protoplasma, **44**: 52-72.
- —, 1958. *Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe*. Protoplasma, **50**: 1-50.
- — & E. BOLAY, 1961. *Über die diagnostische Bedeutung der Entmischungs- und Fallungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen*. Protoplasma, **54**: 179-201.
- MCCUTCHEON, M. & B. LUCKE', 1924. *The mechanism of vital staining with basic dyes*. J. Gen. Physiol., **6**: 501-507.
- STRUGGER, S., 1940. *Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen*. Jena. Z. Naturwiss., **73**: 97-136.
- TOTH, A., 1952. *Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht*. Protoplasma, **41**: 103-110.
- TRIPODI, G., 1964. *Contributo alla conoscenza citofisiologica della Bangia fuscopurpurea (Dillw.) Lyngb.* Ann. di Bot., Roma, **28**: 41-53.



Fig. 2. — *Eschscholtzia californica* (Rosso neutro pH 6.8): I vacuoli sono uniformemente colorati e, in seguito ad una rottura apicale, scorrono lungo il tubo.

Fig. 3. — *Eschscholtzia californica* (Rosso neutro pH 6.8): Sferette di separazione nel citoplasma.

Fig. 4. — *Eschscholtzia californica* (Rosso neutro pH 3.5): Sferette di separazione e vacuoli incolore.