

Edmondo H o n s e l l

Contributo all'interpretazione dei fenomeni di accumulo delle fluoresceine nei protoplasti viventi di cellule vegetali, in base ad alcune ricerche di citospettrofluorometria.

INTRODUZIONE

Uno dei fatti fondamentali per un'esatta interpretazione dei fenomeni della colorazione vitale e la conseguente spiegazione di numerosi problemi di protoplasmatica ad essi inerenti è la conoscenza delle caratteristiche chimico-fisiche dei singoli coloranti e, in particolare, dell'andamento della loro dissociazione e ripartizione tra fase idrofila e fase lipofila. Le numerose ricerche fatte sotto questo punto di vista hanno permesso di proporre interessanti teorie sui diversi meccanismi di accumulo e di portare notevoli contributi agli studi sulla costituzione del plasma vivente.

Ancora poco chiari sono i fenomeni relativi all'accumulo delle fluoresceine e i rapporti che essi presentano con l'attività plasmatica. Il carattere inturbante della colorazione e il fatto che abbia luogo soltanto se le cellule sono vive è stato rilevato già da DÖRING (1935) e confermato da tutti gli altri Autori che si sono interessati della questione.

Esse vengono accumulate principalmente dal citoplasma e dal nucleo e, con la morte della cellula, passano nuovamente nella soluzione esterna (DÖRING, 1935; SCHUMACHER, 1936; STRUGGER, 1938; HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN, 1956). Il plasma imbibito per reazione da ferita dà una fluorescenza più intensa (DÖRING, 1935) e lo stesso effetto si ottiene anche per la contrazione vacuolare indotta sperimentalmente o in seguito a plasmolisi da sali di potassio (HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN, 1956). L'intensità della fluorescenza del plasma colorato è in rapporto con determinati stati fisiologici delle cellule stesse (HONSELL, 1949 a,b) e dipende anche dall'intensità respiratoria: l'azione di veleni

respiratori come l'ossichinolina provocano la liberazione del colorante nella soluzione esterna e la scomparsa della fluorescenza plasmatica (HONSELL, 1961). Altre sostanze ad azione simile, tuttavia, come il dinitrofenolo o il fluoruro di sodio non influenzano l'assunzione delle fluoresceine, mentre il cianuro di potassio e l'arseniato di sodio hanno, invece, una forte azione inibitrice (SCHWANTES, 1961).

In molti casi avviene spontaneamente, dopo un certo tempo dall'inizio della colorazione, il passaggio irreversibile di questi coloranti dal plasma nel succo vacuolare (DÖRING, 1935; HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN, 1956): questo fenomeno può essere anche indotto sperimentalmente per trattamento del materiale con carbonato di ammonio (ENÖCKL, 1960), ma allora è reversibile.

Infine, le fluoresceine presentano notevole affinità per i granuli di amido e per i corpi pirenoidi (HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN, 1956; HONSELL, 1959 b; ZIEGLER, 1960).

DRAWERT (1960), confermando alcune osservazioni di STRUGGER (1938), dimostra che anche il plasma morto può assumere questi coloranti in determinate condizioni di pH della soluzione esterna, in rapporto col punto isoelettrico delle proteine cellulari e, quindi, il concetto della colorabilità esclusiva del plasma vivente è da considerare in senso ristretto. Inoltre, in base alle ricerche di SCHARF (1955, 1956), propone un'interessante ipotesi di lavoro per spiegare il meccanismo di accumulo delle fluoresceine, ammettendo che esse si leghino a gruppi polari a carattere basico, appartenenti ai lipoidi plasmatici, costituenti di complessi lipoprotidici, dopo che questi ultimi, in determinate condizioni, come per es. per l'imbibizione plasmatica, si scindono rendendo liberi detti gruppi.

Le ricerche di SCHARF (1955, 1956) sui caratteri chimico-fisici della fluoresceina potassica (vedi anche FÖRSTER, 1951) hanno permesso di stabilire che questa sostanza, a carattere anfotero, presenta, secondo lo schema a lato, il comportamento seguente: al di sopra di pH 4,3, in soluzione idrofila, si trova in forma di sale più o meno dissociato in anioni colorati monovalenti e bivalenti; fra valori di pH da 3,8 a 3,3 sono presenti soltanto molecole indissociate dell'acido libero, mentre nei sol-

venti non polari idrofobi la molecola neutra dell'acido si trasforma in lattone. Al di sotto di pH 3,1, quindi in ambiente molto acido, sono invece presenti cationi colorati (fig. 1).

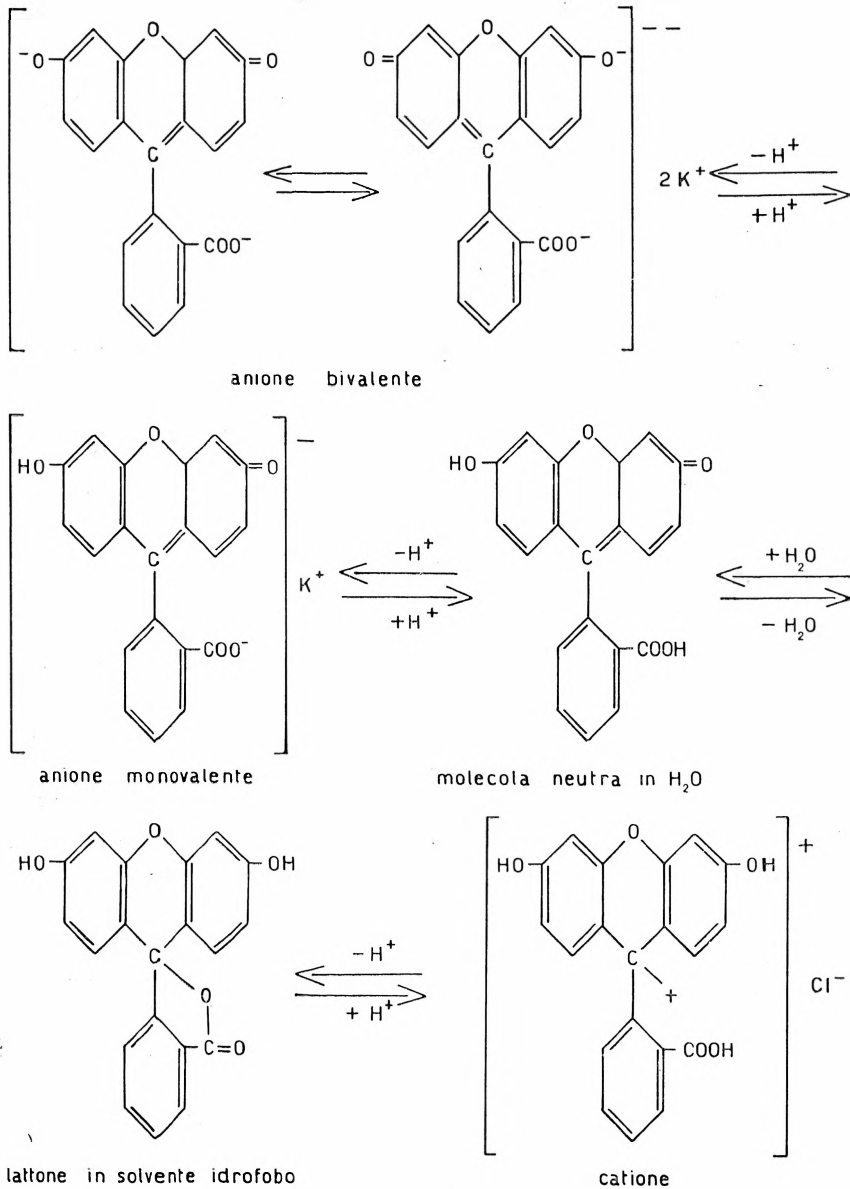


FIG. 1

Fluoresceina potassica nei diversi stadi della sua dissociazione.
(da SCHARF, 1956).

La fluoresceina, al contrario di tanti altri coloranti vitali, non presenta fenomeni evidenti di metacromasia, per cui è difficile giudicare lo stato fisico in cui si trova in soluzione. SCHARF (1956), tuttavia, descrive piccole differenze di colorazione e di fluorescenza a seconda si tratti di anioni bivalenti, anioni monovalenti, molecole indissociate o cationi. Soltanto il lattone, disciolto in solvente idrofobo, è incolore e privo di fluorescenza, almeno nel visibile.

PARTE SPERIMENTALE

Durante una breve permanenza presso l'Istituto Botanico di Marburg/Lahn nell'autunno del 1961 ho eseguito alcune ricerche sui fenomeni di accumulo delle fluoresceine, ponendo particolare attenzione al comportamento chimico-fisico di questi coloranti in soluzione. I risultati delle analisi cromatografiche, elettroforetiche e sull'andamento della ripartizione tra fase idrofila e fase lipofila su fluoresceine sodiche e potassiche di provenienze diverse hanno confermato i dati rilevati da SCHARF (1956) per la dissociazione della fluoresceina potassica e dimostrato che anche la fluoresceina sodica ha un comportamento del tutto corrispondente.

Dall'esame spettrofotometrico di soluzioni di fluoresceine in concentrazione 1:50000 a diversi valori di pH (fig. 2) ho potuto constatare che i cationi e le molecole neutre indissociate dell'acido libero presentano un massimo di assorbimento a 438 m μ , il sale indissociato e gli anioni univalenti, due massimi a 455 e 475 m μ e, infine, che gli anioni bivalenti hanno un unico massimo di assorbimento a 492 m μ e che, quindi, è possibile, per questa via, stabilire in quale stato chimico-fisico si trovino questi coloranti in soluzione acquosa.

Le fluoresceine in solvente idrofobo (cloroformio) si trovano, secondo SCHARF (1956), in forma di lattoni e non hanno colorazione; tuttavia, l'aggiunta ad una loro soluzione di 2-n-amilamina, sostanza con due gruppi NH₂ liberi ed a carattere fortemente basico (DRAWERT, 1960), determina la comparsa

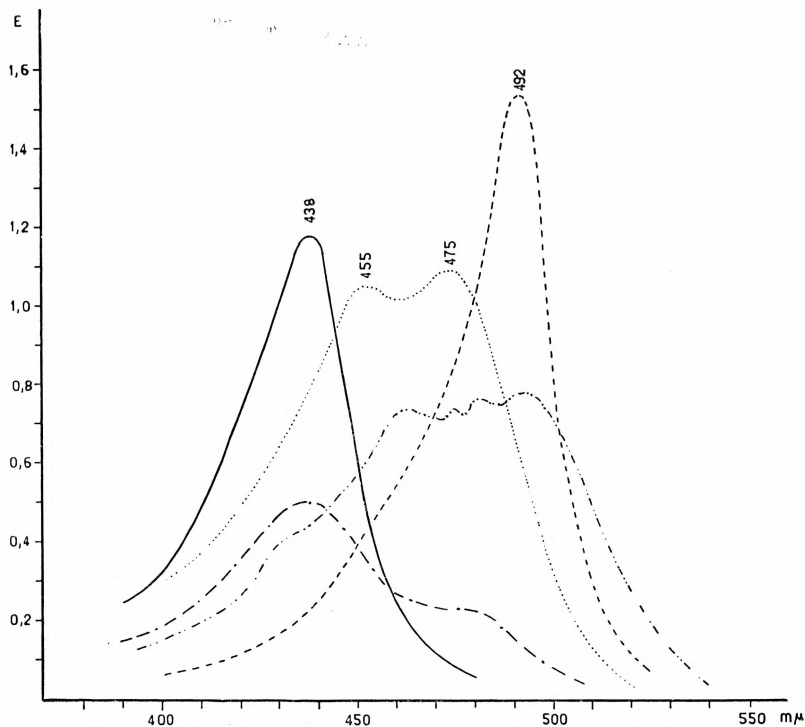


FIG. 2

Curve di assorbimento di soluzioni di fluoresceina sodica Merck alla concentrazione 1:50 000 in tamponi fosfatici M/150 a diversi valori di pH e in cloroformio + 2-n-amilammina.

————— pH 2,2 (cationi), - · - · - pH 3,3 (acido neutro + cationi?)
..... pH 5,3 (sale indissociato + anioni monovalenti), — — — pH 8,1 (anioni bivalenti), - - - - - (cloroformio + 2-n-amilammina).

della colorazione, con una regione di massimi di assorbimento da 464 a 492 mμ.

Ulteriori recenti ricerche di spettrofotometria sulla fluorescenza di queste sostanze in soluzione ed accumulate in vivo, eseguite a Napoli presso l'Istituto di Biologia generale, mi hanno dato risultati molto interessanti. Per il rilevamento dei dati ho impiegato un metodo messo a punto dal prof. DE LERMA (1958), che ringrazio cordialmente per aver messo a mia disposizione le apparecchiature da Lui realizzate. Esse consi-

stono in un microscopio a fluorescenza collegato ad uno spettrografo. Per mezzo di un adatto oculare l'immagine del preparato del quale si vuole conoscere la composizione spettrale della fluorescenza emessa, viene messo a fuoco a livello della fessura dello spettrografo. Lo spettro viene fotografato su lastra e da questa si ottiene, per mezzo di un microdensitometro, la curva di emissione della fluorescenza esaminata.

In una prima serie di ricerche orientative ho studiato la emissione spettrale della fluorescenza data da soluzioni di fluoresceina sodica e potassica in acqua alla concentrazione di 1:10000 a valori di pH tali da avere presenti questi coloranti nei diversi gradi di dissociazione. I risultati di queste misure hanno prevalentemente un carattere qualitativo, dato che non ho ancora potuto, per difficoltà tecniche, ottenere precisi valori sulla distribuzione spettrale dell'energia della fluorescenza, ma pur essendo approssimati, è già possibile definire, in base ad essi, alcuni fatti fondamentali per l'interpretazione dei fenomeni di accumulo in vivo delle fluoresceine.

L'esame del diagramma della fig. 3 dimostra che la distribuzione spettrale della fluorescenza, come quella dell'assorbimento, è in rapporto con lo stato di dissociazione di questi coloranti e che, anche in questo caso, sono presenti quattro massimi caratteristici, i quali, però, si trovano nella regione dal bleu-verde al giallo fra 500 e 600 $m\mu$. I cationi, che secondo lo schema della fig. 1 sono presenti in ambiente molto acido, danno uno spettro di emissione con un massimo principale a 562 $m\mu$ e tre massimi secondari a 518, 542, e 586 $m\mu$. Spettri analoghi, ma con variazioni quantitative nei singoli massimi, sono dati anche dalle molecole dell'acido libero, dagli anioni univalenti e anche dal sale indissociato, con la differenza che in questi tre casi, il massimo a 518 $m\mu$ è prevalente sugli altri. Lo spettro degli anioni bivalenti è, invece, molto ben caratterizzato, con un unico massimo a 518 $m\mu$.

Le fluoresceine disciolte in cloroformio o in benzolo, si trovano, come ho già detto in precedenza, in forma di lattone incolore e privo di fluorescenza: in cloroformio, tuttavia, ma non in benzolo, l'aggiunta di un piccolo quantitativo di 2-n-amilammmina determina la comparsa della fluorescenza, con uno

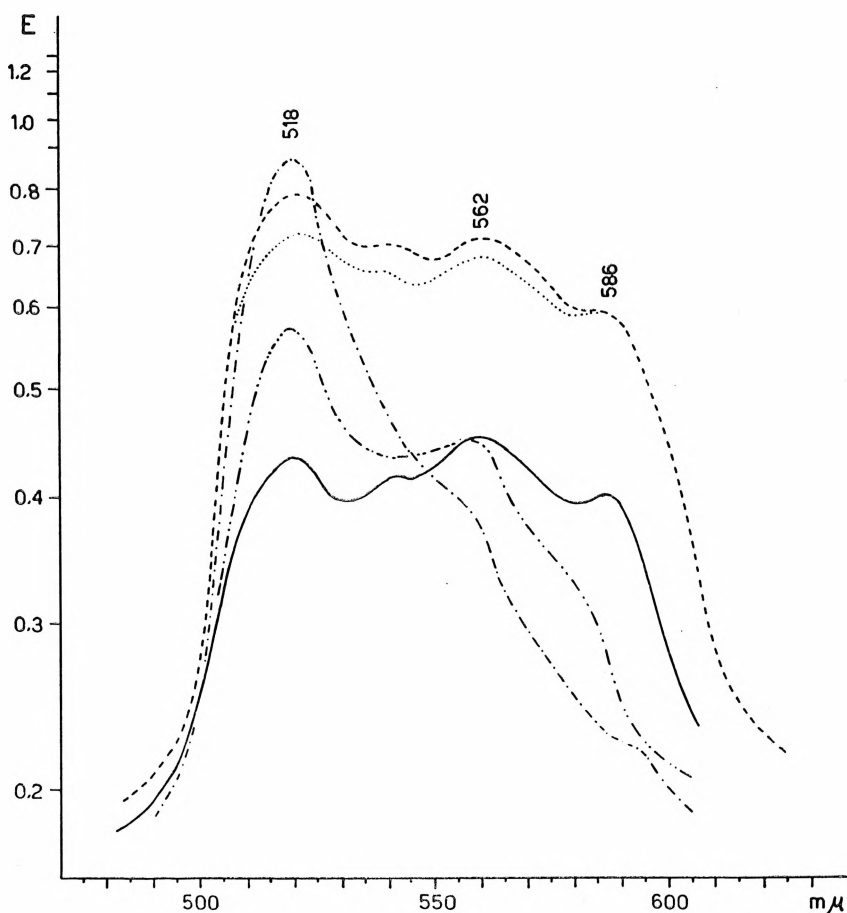


FIG. 3

Distribuzione spettrale della fluorescenza delle fluoresceine sodica e potassica in soluzione acquosa 1:10 000 a diversi valori di pH (tamponi fosfatici M/150) e in cloroformio + 2-n-amilamina.

————— pH 2 (cationi), pH 3,4 (ácido libero), ———— pH 5,5 (sale indissociato e anioni univalenti), —·—·— pH 8,7 (anioni bivalenti), —·—·— (sol. in cloroformio + 2-n-amilamina).

spettro di emissione non molto dissimile da quello dei coloranti in soluzione acquosa, con un massimo principale a 518 mμ e un massimo secondario a 562 mμ.

Per l'analisi spettrofotometrica della fluorescenza data dalle fluoresceine accumulate in vivo ho adoperato la stessa apparecchiatura usata nel caso precedente. Il materiale sul quale ho fatto le misure era costituito da cellule epidermiche delle tuniche di alcuni bulbi di *Allium cepa*, preparate secondo il metodo classico descritto da STRUGGER (1949).

Ho eseguito le colorazioni immergendo dette epidermidi per 10 minuti in soluzioni di fluoresceina potassica e sodica alla concentrazione 1:10000, in tampone fosfatico M/150 a pH 4,8. Il quadro dell'accumulo al microscopio a fluorescenza era simile a quello già descritto da HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN (1956) e non presentava nessuna differenza sensibile per i due diversi coloranti. Le cellule davano al microscopio UV una bella fluorescenza verde nel plasma e nel nucleo: alcune di esse, principalmente al margine del frammento di epidermide, presentavano contrazione vacuolare (evidentemente per stimolo da ferita) e il loro plasma imbibito emetteva una fluorescenza più intensa. Il passaggio del colorante dal plasma nei vacuoli avveniva dopo tempi variabili da sei a dodici ore dall'inizio della colorazione. Rilevo a questo proposito che, in alcune ricerche orientative iniziate recentemente, ho potuto constatare che, se il materiale viene posto in ambiente privo di ossigeno, il passaggio delle fluoresceine dal plasma al succo vacuolare non ha luogo (vedi anche HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN, 1956).

Dato che l'irradiazione UV determina in queste diverse forme di accumulo in vivo, come del resto anche in vitro, una graduale estinzione della fluorescenza, nell'eseguire le fotografie degli spettri ho usato esposizioni molto brevi, successive, sostituendo di volta in volta i singoli preparati.

Nel diagramma della fig. 4 sono rappresentate le curve di emissione della fluorescenza del plasma imbibito (p.i.), del citoplasma e nucleo (n.c.) che sono identiche fra loro e dei vacuoli (s.v.), dopo che tutto il colorante era passato in essi dal citoplasma e dal nucleo.

Anche in queste curve si notano gli stessi massimi presentati dalle soluzioni in vitro. Nel plasma imbibito, il massimo principale di emissione della fluorescenza si trova a 518 m μ e sono pure bene evidenti nella curva i due massimi secondari a

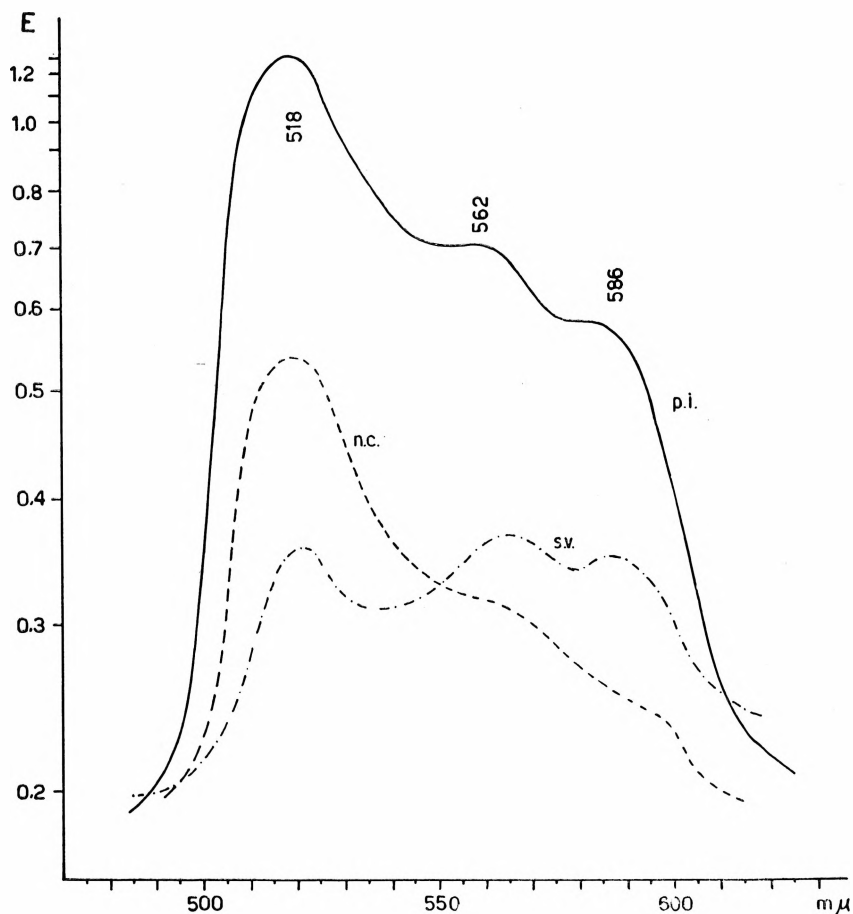


FIG. 4

Distribuzione spettrale della fluorescenza delle fluoresceine sodica e potassica accumulate nei protoplasti vivi di cellule epidermiche delle tuniche dei bulbi di *Allium cepa*. n.c. = nucleo e citoplasma, p. i. = plasma imbibito, s.v. = succo vacuolare.

562 e 586 mμ. Nucleo e citoplasma, invece, hanno praticamente un solo massimo a 518 mμ e la curva presenta due flessi in corrispondenza di 562 e 586 mμ. Molto diversa è la curva di emissione della fluorescenza del colorante passato nel succo vacuolare. Il massimo principale si trova a circa 562 mμ e i due massimi secondari a 518 e 586 mμ.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il confronto fra le curve di assorbimento spettrale delle fluoresceine in soluzione acquosa a diversi valori di pH e in cloroformio + 2-n-amilamina (coloranti presumibilmente combinati chimicamente) con quelle di emissione della loro fluorescenza, indotta da radiazioni ultraviolette in vitro ed in vivo, permette di rilevare alcuni fatti molto interessanti per l'interpretazione dei diversi fenomeni di accumulo di questi coloranti nel plasma vivente.

L'esame delle curve di assorbimento (fig. 2) dimostra che in soluzione acquosa alla concentrazione 1:50000 i cationi e gli anioni sono molto ben caratterizzati, presentando, rispettivamente, i loro massimi di assorbimento a 438 e 492 m μ , la molecola neutra è quasi incolore e presenta un massimo di assorbimento della stessa lunghezza d'onda dei cationi (è possibile che la soluzione esaminata contenesse ancora una piccola percentuale di cationi) ma di intensità di gran lunga minore e un flesso intorno a 475 m μ mentre l'anione monovalente (a pH 5,3) è caratterizzato da due massimi a 455 e 475 m μ . In quest'ultimo caso è prevedibile che siano contemporaneamente in soluzione anche molecole indissociate del sale bivalente.

Il rapporto fra curve di assorbimento e curve di emissione della fluorescenza di una stessa sostanza dovrebbe consistere nel fatto che le prime rappresentano l'immagine speculare delle seconde e che i massimi di queste si trovano spostati verso lunghezze d'onda maggiori (FÖRSTER, 1951). Nel caso delle fluoresceine da me esaminate, tuttavia, ciò avviene soltanto in parte: le curve di emissione di queste sostanze nei loro diversi stati chimico-fisici presentano egualmente quattro massimi di emissione con lunghezze d'onda maggiori (518, 542, 562 e 586 m μ) ma soltanto la curva degli anioni bivalenti con un unico massimo a 518 m μ può essere considerata come l'immagine speculare della corrispondente curva di assorbimento con massimo a 492. Le altre curve, degli anioni monovalenti, delle molecole neutre e dei cationi, pur presentando variazioni quantitative, hanno un andamento molto simile fra di loro, con l'unica differenza che quella dei cationi ha il massimo principale a

562 m μ , mentre le altre lo hanno a 518. Per ora non è possibile spiegare il motivo di queste differenze fra spettri di assorbimento e spettri di emissione, ma non è da escludere che esse siano dovute alla differenza di concentrazione delle soluzioni impiegate per i due gruppi di misure, in quanto, nel primo caso ho dovuto usare, per esigenze tecniche, diluizioni a 1:50000 mentre nel secondo, sempre per lo stesso motivo e anche per ottenere intensità di fluorescenza simili nelle misure in vitro ed in vivo, ho usato diluizioni nel rapporto 1:10000. Questo aspetto della questione deve essere, comunque, ulteriormente studiato.

Le fluoresceine disciolte in un solvente non polare idrofobo (cloroformio) si trovano sotto forma di molecola neutra (lattone) e non danno nè colorazione, nè fluorescenza (SCHARF, 1956), ma se alla soluzione viene aggiunta una piccola quantità di 2-n-amilamina (DRAWERT, 1960) queste compaiono, probabilmente in seguito alla formazione di un legame chimico, o anche chimico-fisico, delle molecole neutre dei coloranti con i due gruppi polari NH₂ presenti in questa sostanza. L'analisi dello spettro di assorbimento di una soluzione di fluoresceina sodica o potassica in cloroformio + 2-n-amilamina ci mostra che la sua curva è molto diversa da quelle date da soluzioni acquose di questi coloranti a diversi valori di pH. Lo spettro di emissione della fluorescenza, invece, non differisce molto da quelli della molecola neutra e dell'acido univalente, presentando un massimo a 518 m μ (il massimo caratteristico degli anioni bivalenti) e un massimo a 562 m μ , mentre manca del tutto il flesso a 586 m μ .

Gli spettri di emissione della fluorescenza in vivo, di cellule dell'epidermide di *Allium cepa* colorate con queste sostanze presentano una certa variabilità, a seconda si tratti del citoplasma e nucleo, del plasma imbibito o dei vacuoli e differiscono, sotto certi aspetti, da quelli delle fluoresceine in vitro, pur presentando i relativi massimi caratteristici.

La fluorescenza del nucleo e del citoplasma dà una curva di emissione molto simile a quella degli ioni bivalenti in soluzione acquosa alla concentrazione 1:10000 a valori di pH piuttosto basici. Nel diagramma della fig. 3 è rappresentato lo spettro di emissione a pH 9,5 ma anche a valori più bassi, di

poco superiori a pH 7, la curva conserva lo stesso andamento. Il plasma imbibito presenta qualitativamente una curva simile alla precedente ma le differenze quantitative sono sensibili in quanto, pur essendo il massimo a 518 m μ sempre predominante, assumono una notevole importanza i due flessi a 586 e 562 m μ e la forma della curva tende ad avvicinarsi a quella degli anioni monovalenti e del sale indissociato. Infine, il succo vacuolare, dopo che i coloranti sono passati in essi spontaneamente dal plasma e dal nucleo, dà una fluorescenza la cui curva di emissione presenta tutti e quattro i massimi caratteristici delle fluoresceine e rassomiglia molto, sia qualitativamente che quantitativamente, a quella data dai cationi.

L'interpretazione di questi fatti non è molto semplice in quanto, mentre in base alle curve di emissione della fluorescenza è relativamente facile riconoscere la presenza, in soluzione acquosa, di anioni bivalenti e forse anche dei cationi colorati, non si può dire la stessa cosa per la molecola neutra e per gli anioni monovalenti: tuttavia, ammettendo che le singole curve di emissione sopra descritte per le fluoresceine in vitro siano esclusive per i singoli stati di dissociazione indicati, è possibile fare alcune considerazioni ed ipotesi sul meccanismo di accumulo di queste sostanze nelle cellule vegetali vive.

Premesso che la penetrazione di questi coloranti può avvenire esclusivamente per liposolubilità attraverso il plasmalemma, in quanto l'accumulo ha luogo soltanto se la soluzione colorante esterna è relativamente acida (STRUGGER, 1938; HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN, 1956) e contiene quindi in prevalenza molecole del sale indissociato (SCHARF, 1956), ben liposolubili, si deve ammettere che, in base all'esame degli spettri di emissione della fluorescenza data da questi coloranti quando sono presenti nel plasma, essi subiscono in queste condizioni una variazione del loro stato chimico-fisico. Infatti ciò appare bene evidente dal confronto fra gli spettri di emissione della soluzione colorante esterna in ambiente acido (pH 5,3) e quelli dati, dopo avvenuto l'accumulo, dal citoplasma normale e dal nucleo (fig. 3 e 4). La curva di emissione di questi ultimi presenta, come ho detto sopra, una grande somiglianza con quella data dagli anioni bivalenti in ambiente basico e differisce notevol-

mente da tutte le altre curve di emissione studiate, compresa quella delle fluoresceine in cloroformio + 2-n-amilammina, che hanno un aspetto notevolmente diverso.

Da ciò si dovrebbe dedurre, pertanto, che anche nel nucleo e nel citoplasma normali le fluoresceine si trovino allo stato di anioni bivalenti nella fase idrofila plasmatica, ma data la costituzione del plasma vivente è possibile ammettere un fatto del genere? Indubbiamente è poco probabile che questi anioni bivalenti si trovino liberi: si potrebbe piuttosto pensare che essi siano legati a qualche componente del plasma a carica positiva. La natura del legame è poco chiara e, secondo HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN (1956) sarebbe da escludere che si tratti di un fenomeno di adsorbimento in quanto la presenza di sali alcalini (che determina un'imbibizione plasmatica), non solo non inibisce l'accumulo ma, anzi, provoca un aumento di esso. D'altra parte il diverso aspetto dello spettro di emissione delle fluoresceine legate ai gruppi NH_2 della 2-n-amilammina in solvente lipofilo, rispetto a quello dato da queste sostanze accumulate nel plasma, parlerebbe a sfavore dell'ipotesi di DRAWERT (1960) per la quale questi coloranti si legherebbero a gruppi polari basici nella fase lipidica plasmatica. Dai risultati delle mie osservazioni, si potrebbe piuttosto ammettere che questo legame avvenga nella fase idrofila plasmatica con sostanze a carattere basico in essa disciolte. La lability del legame fra fluoresceine e plasma vivente e i rapporti che intercorrono fra l'intensità dell'accumulo e l'attività cellulare (HONSELL, 1959 a, b, 1961), come pure il fatto che l'azione di veleni respiratori, anche a bassissima concentrazione determinano la liberazione delle fluoresceine accumulate dal plasma (per es. ossichinolina: HONSELL, 1961) deve far pensare che esista uno stretto rapporto fra accumulo e respirazione e non è da escludere che nel fenomeno di accumulo abbia un ruolo determinante il pH della fase idrofila del plasma stesso.

Il plasma imbibito dà con le fluoresceine una fluorescenza secondaria molto più intensa (DÖRING, 1935, HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN, 1956) e il suo spettro di emissione presenta, da un punto di vista qualitativo e quantitativo una certa differenza rispetto

a quello del plasma normale e a quello degli ioni bivalenti in vitro.

Il massimo di emissione si trova sempre a 518 m μ , ma un altro massimo, di considerevole intensità si trova in corrispondenza della lunghezza d'onda di 562 m μ . Non è da escludere, pertanto, che in questo caso la curva di emissione della fluorescenza sia la risultante di due curve diverse, data una dagli anioni bivalenti e corrispondente a quella del plasma normale e una dal colorante presente in altra forma, che potrebbe essere o l'anione univalente o la molecole neutra. Inoltre è possibile constatare una notevole somiglianza anche con la curva di emissione del colorante in cloroformio in presenza di 2-n-amilammina, con l'unica differenza rappresentata dalla mancanza del flesso a 586 m μ .

L'imbibizione plasmatica è indubbiamente in rapporto con una modificazione dei complessi lipoprotidici che sono costituenti essenziali del plasma stesso (DRAWERT, 1948, 1960; HÖFLER, 1959) e, in seguito alla comparsa di questo fenomeno, è probabile che abbia luogo la scissione di essi con la liberazione di gruppi reattivi dei lipoidi polari a carattere basico. La concordanza della curva di emissione delle fluoresceine nel plasma imbibito con quella delle fluoresceine in solvente lipofilo in presenza di gruppi NH₂ è senz'altro da considerare come un argomento a favore dell'ipotesi di DRAWERT (1960). Nel plasma imbibito, quindi, ma non in quello normale, il meccanismo di accumulo delle fluoresceine può senz'altro avvenire per la formazione di un legame con i gruppi polari liberi dei lipoidi plasmatici, dopo la loro scissione dai complessi lipoprotidici.

Infine, è da considerare ancora il passaggio spontaneo delle fluoresceine dal plasma nel succo vacuolare, dopo un periodo di tempo più o meno lungo dall'inizio della colorazione. Il fenomeno, descritto già da DÖRING (1935), STRUGGER (1938) e ulteriormente studiato da HÖFLER, ZIEGLER e LUHAN (1956) ha un carattere generale e può venire indotto anche sperimentalmente per l'azione di carbonato di ammonio (ENÖCKL, 1960). In quest'ultimo caso è però reversibile, mentre se avviene spontaneamente è irreversibile.

L'esame dello spettro di emissione della fluorescenza del colorante accumulato nel succo vacuolare, per un processo spontaneo, permette di rilevare una notevole somiglianza con quello dei cationi e, in ordine subordinato, con quello dell'acido libero indissociato. Dato che le fluoresceine si trovano in questa forma soltanto in ambiente molto acido, al di sotto di pH 3,8, non è possibile ammettere che ciò avvenga anche nel succo vacuolare: piuttosto è prevedibile che abbia luogo nel plasma, per effetto dell'attività cellulare stessa, un'azione riduttrice sul colorante accumulato in altra forma e la sua combinazione con un determinato costituente a carattere acido, con la formazione di un composto il quale, per le sue caratteristiche chimico-fisiche, possa venire lentamente accumulato nel succo vacuolare. HÖFLER, ZIEGLER, e LUHAN (1956) interpretano questo fenomeno come un fatto determinato dall'attività del plasma stesso e lo mettono in rapporto con i processi respiratori. Anche questo punto della questione, comunque, richiede ulteriori ricerche.

In base allo studio spettrofluorometrico delle fluoresceine accumulate in vivo nelle cellule vegetali e all'interpretazione delle curve della distribuzione spettrale della fluorescenza e al loro confronto con quelle di soluzioni in vitro a diversi valori di pH si possono trarre le seguenti conclusioni:

a) il plasma non imbibito e il nucleo accumulano le fluoresceine dando lo spettro caratteristico degli anioni bivalenti in soluzione acquosa (massimo a 518 $m\mu$): è presumibile che essi presentino la stessa fluorescenza indipendentemente dal fatto che si trovino liberi in soluzione o che formino il sale bivalente indissociato o che siano legati a composti con gruppi basici liberi, ma sempre in ambiente idrofilo.

b) il plasma imbibito e colorato con le fluoresceine dà uno spettro di emissione molto diverso da quello del plasma normale con due massimi di emissione a 518 $m\mu$ e a 562 $m\mu$: esso presenta un andamento molto simile a quello dato dalle fluoresceine in soluzione idrofoba (cloroformio) in presenza di 2-n-amilamina, con l'unica differenza che il massimo a 518 $m\mu$ è quantitativamente maggiore. Non è da escludere che alla co-

stituzione della curva di emissione non prendano anche parte anioni bivalenti.

c) le fluoresceine concentrate nel succo vacuolare per un processo attivo di accumulo danno uno spettro di emissione corrispondente a quello dei cationi o della molecola neutra non dissociata: anche qui è possibile che il colorante si trovi legato a qualche sostanza a carattere acido.

Ringrazio il prof. H. Drawert per avermi ospitato nell'Istituto Botanico di Marburg/Lahn e aver messo a mia disposizione tutta l'attrezzatura necessaria alle ricerche cromatografiche, elettroforetiche e spettrofotometriche sulle fluoresceine. Ringrazio inoltre il prof. De Lerma, direttore dell'Istituto di Biologia Generale dell'Università di Napoli, per avermi permesso di utilizzare l'apparecchiatura da Lui messa a punto per le misure di microspettrografia di fluorescenza.

Le presenti ricerche sono state eseguite con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

Portici, febbraio 1962.

S O M M A R I O

L'accumulo delle fluoresceine sodica e potassica nelle cellule epidermiche vive delle tuniche di bulbi di *Allium cepa* viene studiato dall'A. con metodi spettrofluorometrici. Dal confronto fra gli spettri di emissione della fluorescenza in vivo ed in vitro, a diversi valori di pH (e quindi in diversi stati di dissociazione) si possono trarre le seguenti considerazioni:

a) il plasma e il nucleo normali accumulano le fluoresceine sotto forma di anioni bivalenti in fase idrofila; non è da escludere, tuttavia, che questi siano legati a composti con gruppi basici liberi,

b) il plasma imbibito, nel quale presumibilmente i complessi lipo-proteici hanno subito una scissione con la liberazione di gruppi reattivi a carattere basico appartenenti a lipoidi polari, dà con le fluoresceine uno spettro di emissione molto simile a quello di una soluzione di questi coloranti in cloroformio + 2-n-amilammina. Dato che in quest'ultimo caso avviene la formazione di un legame fra le fluoresceine e i gruppi NH_2 liberi della 2-n-amilammina in ambiente idrofobo, si può ritenere che una reazione analoga avvenga anche in vivo.

c) le fluoresceine concentrate nel succo vacuolare per un processo attivo di accumulo, danno uno spettro di emissione corrispondente a quello dei loro cationi o della molecola neutra: anche in questo caso è probabile che il catione non sia libero ma si trovi combinato con qualche sostanza, la quale, però, abbia carattere acido.

SUMMARY

The Autor studies by fluorescence spectrographical methods the accumulation of Na- and K-fluorescein in the living cells of *Allium cepa*. By the comparison of fluorescence spectra in vivo and in vitro in solutions at various pH (and therefore in various dissociation rates) it is possible to deduce the following considerations:

a) the normal cytoplasm and nucleus accumulate the fluoresceins under the form of bivalent anions in hydrophilic phase; it is not improbable, however, that those anions are bound by compound with free basic groups.

b) the imbibited protoplasm, where presumably the lipo-proteine complexes have released by scission reactive groups of basic nature belonging to polar lipoids, gives with floresceins a spectrum very similar

to one, which results from a solution of these dyes in chloroform + 2-n-amylamine. Since in this latter case the fluoresceins and the NH_2 free groups of 2-n-amylamine in hydrophobic medium bind together, one can suppose the occurrence of a similar reaction in vivo.

c) a concentration of fluoresceins in the vacuolar sap, as consequence of active accumulation, results in a spectrum, which corresponds to the one of cations or of the neutral molecule. In this case, too, the cation may not be free, but in combination with some substance of acid nature.

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

- DE LERMA B. - *Die Anwendung von Fluoreszenzlicht in der Histochemie.* In Handbuch der Histochemie, Bd. 1(1): 78-159. 1958.
- DÖRING H. - *Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebenden Pflanzenzellen.* Ber. Dtsch. Bot. Ges., 53: 415-437. 1935.
- DRAWERT H. - *Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung.* In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 11: 252-289. 1956.
- — - *Fluorochromierungsstudien an lebenden und toten Pflanzenzellen mit Fluorescein.* Ber. Dtsch. Bot. Ges., 73: 115-122. 1960.
- ENÖCKL F. - *Uranin-Fluorochromierung von Allium-Zellen nach Vorbehandlung mit Ammonkarbonat.* Protoplasma, 52: 244-375. 1960.
- HÖFLER K., A. ZIEGLER e M. LUHAN - *Fluorochromierungsstudien mit Uranin.* Protoplasma, 46: 322-366. 1956.
- HONSELL E. - *Sull'esistenza di un gradiente citofisiologico nelle colonie di Oscillatoria irrigua Kütz., messo in evidenza dall'accumulo protoplasmatico "in vivo" del fluorocromo uranina.* R. Acc. Naz. Lincei, Cl. Sci. fis. mat. e nat. S. VII, 26: 74-78. 1959 a.
- — - *Ricerche sui rapporti fra attività fotosintetica e colorazione vitale con l'uranina nelle cellule di Spirogyra.* Ann. di Bot., 26: 304-308. 1959 b.
- — - *Osservazioni sul rapporto fra accumulo protoplasmatico del fluorocromo uranina e intensità respiratoria in Oscillatoria irrigua Kütz.* N. Giorn. Bot. 63 (1-2): 89-97. 1961.
- SCHARF J. H. - *Fluoreszenz und Fluoreszenzpolarisation myelotroper Nervenfasern nach Fluorochromierung in der Umgebung des IEP des Fluoresceins.* Z. Naturforschung, 10 b: 355. 1955.

- — - *Fluoreszenz- und Fluoreszenzpolarisation der Nervenfasern nach Färbung mit Phenyloxyfluoronen. Versuch einer Interpretation.* Mikroskopie, 11: 261-319 e 349-397. 1956.
- SCHUMACHER W. - *Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Haaren von Cucurbita pepo.* Jahrb. wiss. Bot., 82: 507-533. 1936.
- SCHWANTES H. O. - *Mikrospektroskopische Untersuchungen über die Aufnahme von Farbstoffen in die pflanzliche Zelle.* Ber. Dtsch. Bot. Ges., 74: 418-423. 1961.
- STRUGGER S. - *Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszein-Kaliums in pflanzlichen Geweben.* Flora, 132: 253-304. 1938.
- STRUGGER, S. - *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze.* 2 Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg. 1949.
- ZIEGLER A. - *Plastiden und Stärke-Fluorochromierung mit Uranin.* Protoplasma, 52: 618-656. 1960.