ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCC.

1903

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XII.

1° Semestre.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1903

Patologia vegetale. — Sulla Botrytis citricola n. sp. parassita degli agrumi. Nota del dott. Ugo Brizi, presentata dal Socio Pirotta.

Da qualche anno alla R. Stazione di Patologia vegetale, a più riprese e da varie regioni (Ascoli, Fermo, Salerno, Firenze, Todi), pervennero molti campioni di limoni ed aranci colpiti da una malattia non molto frequente, ma che, a quanto affermano concordemente i nostri corrispondenti, produsse qua e là danni assai considerevoli.

Il carattere più saliente della malattia è la presenza di macchie rugginose infossate sparse sui frutti le quali, da principio piccolissime, si estendono, confluiscono e possono invadere l'intera superficie, cagionando la caduta dei frutti se ancora attaccati all'albero, o lo sfacelo di essi, se distaccati perchè maturi o perchè portati nei magazzini a completare la maturazione.

Per vario tempo la malattia è passata inosservata perchè di non facile studio in causa della variabilità delle sue manifestazioni, poichè i campioni che ci pervenivano, alcune volte erano già decomposti ed invasi da numerose muffe, altre non presentavano alcuno sviluppo di microrganismi ma erano ugualmente in via di putrefazione, altre volte invece, anzichè decomposti, i frutti malati che ci pervenivano erano piccoli, duri, raggrinziti, veramente mummificati e senza alcuna apparenza esteriore di muffe o di altri microrganismi.

L'osservazione attenta di questi casi di malattia così diversi, mi fece sorgere il dubbio che si trattasse sempre della stessa malattia con manifestazioni variabili, che fosse di natura parassitaria e causata da un parassita unico il quale aprisse poi la via ad altri microrganismi distruggitori.

Se si esamina un frutto così colpito al microscopio, facendo una sezione trasversa del pericarpio in corrispondenza di una delle macchie rugginose, si osserva, mediante i soliti metodi e reattivi, particolarmente col bleu Poirier all'acido lattico, che tutte le cellule sono invase da un sottile micelio ramificato septato e perciò pluricellulare, a diametro variabile, privo di veri austori, che perfora le pareti delle cellule attraversandone la cavità per cui a prima vista, si riconosce l'analogia di siffatto micelio con quello delle comuni Botrytis.

Il micelio invade principalmente i tessuti circostanti alle glandule oleifere di cui è ricco il pericarpio dei limoni ed aranci e talvolta occupa come una fitta rete la maggior parte delle cellule secretrici, nella cavità delle quali produce delle curiose sfrangiature, non ancora descritte per nessuna specie del genere Botrytis, e molto simili alle forme coralloidi del micelio di qualche ficomicete.

Costantemente, in corrispondenza di tutte le macchie rugginose, si riscontra il micelio ora descritto e, naturalmente, quando l'intera superficie del frutto è totalmente rugginosa, il micelio si rinviene in tutto il pericarpio; spesso oltre che nel pericarpio si rinviene anche nelle grosse cellule del mesocarpio.

La presenza del micelio nei frutti di agrumi determina la produzione di un profumo assai gradevole che, nell'inizio della malattia è, si può dire, caratteristico. perchè non ho mai riscontrato tal fenomeno in altre infezioni crittogamiche degli agrumi, se non in qualche raro caso di frutti molto decomposti, con rigoglioso sviluppo di *Penicillum glaucum*, il quale era forse in tal caso associato al fungillo in questione.

Tenendo nelle solite condizioni, in termostato a temperatura costante di 18°-20° dei frutti così maculati, dopo un periodo variabile da 20 a 36 ore, in corrispondenza delle macchie rugginose e quindi delle aree infette dal micelio, si sviluppano dei ciuffetti candidissimi costituiti da ife fertili provenienti, come dimostra l'esame microscopico, dal micelio che invade il pericarpio.

Le ife sono ramificate ad alberetto a rami nettamente tricotomi, che portano alla estremità dei piccoli conidi disposti a grappolo, bianchissimi, sferici od appena ovulari, di dimensioni relativamente assai piccole.

Il fungillo sistematicamente appartiene al genere *Botrytis* e differisce sensibilmente da tutte le specie del genere fin qui descritte, ed anche dall'affine *B. griseola*, che è la sola finora rinvenuta come probabile parassita, sugli agrumi. La diagnosi della nuova specie è la seguente:

B. CITRICOLA n. sp. Coespitulis pulvinatis densis, albis, nitentibus, conidiophoris erectis, ramosis, ramis trichotomice divisis, conidiis 8-10 dense aggregatis, obscure globosis, parvis (μ. 6-8).

In fructubus Hesperidearum, quos necat.

Quando i frutti di limoni o di arancio siano invasi dal micelio del fungillo, non avviene generalmente in natura una rapida formazione di conidi, giacchè è necessaria, perchè si formino quest'ultimi, una temperatura abbastanza elevata e sopratutto un ambiente molto umido, giacchè, se avviene il contrario e se trovansi invece in un ambiente asciutto, il micelio del fungillo invade tutto il mesocarpio arrivando sino ai semi, ma senza formazione di conidiofori.

Ne consegue un inaridimento del frutto che perde a poco a poco il succo senza putrefarsi, il pericarpio si prosciuga lentamente sotto l'influenza del fungo, l'epicarpio diventa bruno-scuro, cuoioso, duro, resistente e l'intero

42

frutto diminuisce della metà o di due terzi del volume primitivo, si mummifica completamente pur conservando il caratteristico e gradevole odore.

Così mummificati i frutti di limone ed arancio, solidi, quasi cornei, difficilissimi a tagliarsi, diventano assolutamente imputrescibili in modo quasi analogo a quanto accade nei frutti di molte pomacee e particolarmente del cotogno, sotto l'influenza del micelio della Monilia fructigena. Ma, mentre nel caso della Monilia è assai facile, in condizioni opportune, far produrre i conidi sui frutti mummificati, non è altrettanto facile nei limoni nei quali il micelio, pur essendo presente, facilmente riconoscibile nei tessuti ed in apparenza vivo, non produce affatto i rami conidiofori nelle condizioni solite.

Per questa ragione era molto difficile identificare la natura di questa strana mummificazione. Per ottenere la produzione di conidiofori mi servii di un mezzo molto semplice, allo scopo, direi quasi, di richiamare in vita il micelio del fungillo.

Lasciai i frutti mummificati e divenuti addirittura cornei e sui quali avevo constatata la presenza del micelio, per un certo tempo immersi in liquido sterilizzato, composto di acqua distillata con circa il 3 % di saccarosio, il 5 % di succo di limone tratto da frutti sani ed il 0,5 % di acido citrico, avendo cura di mantenere il liquido, in termostato, a circa 30%. Dopo 48 ore tolsi dal liquido i frutti leggermente rigonfiati per imbibizione, li lavai a lungo in acqua distillata e, dopo averli prosciugati con cura, li posi in camera umida in termostato, a temperatura costante di 25%.

Dopo 48 ore circa si iniziò lo sviluppo dei rami conidiofori e dei conidi, che divenne poi rigoglioso nello stesso modo come ho detto avvenire per i frutti non mummificati. In questa maniera potei convincermi della identità della origine parassitaria della malattia nelle sue due forme, dirò così, umida e secca.

La Botrytis da me studiata si può ottenere facilmente in colture artificiali seminando i conidi in diversi substrati nutritivi acidi. In un liquido costituito da succo di limone diluito in acqua distillata, coll'aggiunta del 10 % di uno zucchero fermentescibile, il micelio prende un rapidissimo ed enorme sviluppo, in modo da formare un denso velo alla superficie del liquido nel quale, fatto che mi sembra importante notare, induce una speciale fermentazione e comunicandogli un profumo alquanto simile a quello dei frutti, con formazione di una piccola quantità di alcool riconoscibile, col metodo di Lieben, per la formazione di piccolissimi cristalli di jodoformio.

L'esame miscropico del liquido, avendo dimostrato l'assenza di speciali fermenti figurati, e che d'altra parte non avrebbero avuto campo di svilupparsi per la rapida e soverchiante formazione del micelio, rendono assai probabile che a quest'ultimo soltanto sia dovuto lo sdoppiamento dello zucchero e la conseguente formazione dell'alcool.

Nelle colture in mezzo solido, ossia in gelatina acida fatta con succo di arancio gelatinizzato al 20 %, si ha pure una rigogliosa vegetazione di micelio, dal quale si sviluppano degli sporidi lunghi, filamentosi che costituiscono come un ciuffo lasso intorno all'estremità di alcuni fili micelici.

Questi conidi germinano pure rapidamente dando origine a fili di micelio, dai quali nascono nuovi sporidi ed anche direttamente ifi conidiofori come quelli descritti più sopra. Si avrebbe così in questa *Botrytis* anche una forma conidiofora intermedia, come del resto è noto accade, benchè raramente, anche in altri funghi (*Pseudopezisa tracheiphila* M. Th.).

Nessun'altra forma fungina mi riuscì di ottenere che potesse completare il ciclo di sviluppo del fungo, nè sclerozi, nè forme ascofore, nè dai frutti ammalati, nè dalle colture pure.

Sui limoni fortemente infetti si trovano talvolta delle masse sclerotiformi, ma che non diventano mai veri sclerozi, perchè mancano di una corteccia protettiva. Neppure cogli ordinari mezzi soliti ad usarsi per provocare la formazione di corpi riproduttivi nei funghi riuscii ad ottenere altre forme.

È perciò probabile che la sola forma di ibernazione del fungillo sia appunto quella del micelio nei frutti mummificati, i quali, probabilmente, cadendo a terra vi passano l'inverno, ed, inumiditi poi dalle pioggie estive associate all'alta temperatura, possano dare origine ai conidiofori ed ai conidi che propagano l'infezione.

Come possa avvenire l'infezione in natura non è facile arguire, ma le esperienze che ora accennerò, avendo dimostrato che non avviene infezione nei frutti maturi senza una soluzione di continuità nell'epicarpio, e d'altra parte il fatto che negli agrumeti del salernitano la malattia s'iniziò sugli ovari dei fiori e sui frutticini appena allegati, sui quali rinvenni il micelio e riuscii, col concorso dell'umidità e dell'alta temperatura, ad ottenere la formazione dei conidiofori, può far supporre, con grande probabilità di essere nel vero, che l'infezione avvenga o s'inizii direttamente nel fiore.

Da quanto ho detto intorno al comportamento del fungillo non può sorger dubbio sulla sua natura parassitaria. È ben vero che v'è chi dubita della natura parassitaria di tutte le *Botrytis*. Non è qui il caso di discutere se tal fungillo, analogo a molti altri, non debba chiamarsi parassita vero, pel fatto che non diventa probabilmente tale se non in certe determinate condizioni, oppure semiparassita perchè in altre può anche essere innocuo.

La questione sarà certo importante, ma il fatto comune a tutti i cosidetti semiparassiti è questo: che occorrono sempre due circostanze, speciali disposizioni predisponenti e presenza del parassita. Le une e l'altra sono necessarie perchè nè risulti la malattia, per cui, come in questo caso del fungillo degli agrumi, è probabile che senza speciali condizioni non si avrebbe avuta la malattia, ma non è forse meno vero che senza il fungillo i frutti non sa-

rebbero caduti decomposti o mummificati; perciò, al caso pratico, poco importa che il fungillo stesso, che certo è indispensabile per produrre la malattia, si chiami parassita vero e semiparassita o parassita facoltativo.

Per confermare poi la natura parassitaria dell'infezione ho cercato di riprodurla artificialmente su frutti di limoni sani, ed ho ottenuto risultati positivi con relativa facilità anche su frutti di aranci e di mandarini immaturi.

Alcune esperienze, però, d'infezione tentate su limoni ed aranci, pennellando semplicemente la superficie esterna dei frutti con il liquido di coltura della *Botrytis* contenente conidi, tenendo i frutti stessi in camera umida a 24°, ebbero esito completamente negativo.

L'infezione invece tentata innestando nel pericarpio dei limoni sani un cilindretto di pericarpio di limone malato, diede esito sempre positivo, giacchè i numerosi frutti infettati in tal modo presentarono la caratteristica infezione rugginosa intorno al punto infettato.

L'esame microscopico confermò la presenza del micelio sui frutti sui quali, in condizioni opportune, si svilupparono i conidiofori abbondantissimi.

Ottenni anche artificialmente la mummificazione dei frutti, infettando alcuni limoni non perfettamente maturi, iniettando una goccia estremamente piccola di liquido contenente conidi di *Botrytis* sotto l'epicarpio mediante una semplice scalfittura, o meglio puntura, sulle glandule oleifere che, come è noto, formano delle piccole sporgenze bitorzolute sull'epicarpio. I frutti in tal modo infettati, rapidamente presentavano i caratteri della malattia, se tenuti in temperatura costante in camera umida, per circa 30 ore.

Se questi frutti così infettati venivano tolti dal termostato, portati alla temperatura ordinaria e lasciati all'aria ed alla luce preservandoli, per quanto era possibile, dall' umidità, non avveniva affatto formazione di conidiofori nè il conseguente sfacelo del frutto, ma si prosciugavano invece lentamente acquistando un intenso profumo e si venivano mummificando man mano.

Una perfetta mummificazione ottenni perfino con un frutto di mandarino ancora immaturo. È interessante il fatto che la mummificazione non avviene se non quando l'infezione si produce sui frutti ancora immaturi, giacchè le esperienze eseguite su frutti a perfetta maturanza non diedero mai frutti mummificati anche pel fatto che venivano facilmente attaccati da altre muffe, le quali forse venivano tenute lontane, in causa dell'ambiente eccessivamente acido, nei frutti ancora immaturi.

Non posso tralasciare di notare la grande analogia che la proprietà mummificante della *B. citricola* presenta colla *B.* dell'uva la quale, è noto, può indurre nell'uva due sorta di putrefazioni, una nobile e l'altra, per così dire, ignobile. Infatti, anche nei frutti di agrumi invasi dalla *B. citricola* come mi risulta, oltrechè dall'esperienze, anche da dati di fatto, avviene che, se la stagione corre calda ed umida, si formano rapidamente i conidiofori, i

frutti cadono a terra o vanno in rapido sfacelo coll'aiuto di altri saprofiti e specialmente del *Penicillum glaucum*. Se invece la stagione corre asciutta, come avviene nell'*Edelfaüle* dell'uva, i conidiofori non si formano; il micelio resta nell'interno del frutto, concentra e modifica i succhi e finisce col mummificarlo.

Aggiungerò che, prestandosi facilmente il materiale di studio, volli tentare di ottenere di poter riprodurre la malattia o per lo meno alcuni caratteri di essa, senza la presenza del parassita, soltanto mediante le sostanze chimiche che esso elabora. Se si potesse dimostrare un tal modo sperimentalmente vera l'ipotesi che qualcuno pensa e che è davvero molto seducente, che si debbano i disturbi funzionali delle piante, e sopratutto le neoformazioni, di origine parassitaria esclusivamente a speciali sostanze chimiche secrete del parassita, si aprirebbe davvero un nuovo orizzonte alle ricerche di Patologia vegetale.

Io volli tentare qualche cosa di più modesto, di ottenere cioè non già di riprodurre caratteri della malattia senza parassita, ma di vedere se fosse stato possibile sperimentalmente, ottenere soltanto il profumo caratteristico che il parassita induce nei frutti ammalati.

Triturai e schiacciai alcuni limoni attaccati dal parassita e fortemente profumati; filtrai il liquido, prima per un filtro ordinario e poi allo Chamberland, raccogliendolo accuratamente in una fialetta sterilizzata. In tal modo si aveva nel liquido il secreto o l'enzima del fungo senza il fungo, e tal liquido iniettai con una siringa di Pravaz sotto l'epicarpio di alcuni limoni ed aranci previamente, ed accuratamente, lavati con acqua distillata e bollita. Ma l'esito fu sempre negativo, perchè per quanto tenessi i frutti in camera umida accuratamente sterilizzata, non solo non si manifestò alcun carattere di malattia, come era prevedibile, ma non ottenni neppure in minima quantità il caratteristico profumo dei frutti ammalati.

L'esito negativo di una sola ed incompleta esperienza, però, non è certo sufficiente per autorizzarmi a creder di aver dimostrata erronea la geniale ipotesi.

Riguardo ai rimedî mi è finora mancata l'opportunità di eseguire rigorose esperienze che mi riservo di eseguire e di esporre nella pubblicazione, che a suo tempo seguirà accompagnata da disegni, della completa storia naturale di questa interessante malattia.

Si può però fin da ora dire che, se realmente la infezione avviene o sui fiori, o sui frutticini appena allegati, sarà difficile dominarla. Sui frutti in via di maturazione l'esperienza dimostra che occorre, perchè l'infezione avvenga, una soluzione di continuità, prodotta probabilmente o da urti meccanici del vento, o da insetti, o grandine ecc., per cui non so se sia il caso di consigliare senz'altro l'applicazione di sostanze anticrittogamiehe, d'effetto, come l'espe-

rienza dimostra, in simili casi, non sempre sicuro. Sarà certo utile, se come è probabile l'ibernazione avviene per mezzo dei frutti mummificati, praticare come si fa nei pomarî per attenuare i danni della *Monilia*, la raccolta e distruzione dei frutti mummificati. Per evitare poi che nei frutti raccolti nei magazzini si propaghi la malattia, sarà opportuna un'accurata selezione, eliminando tutti quei frutti che presentano macchie rugginose infossate sull'epicarpio, e procurare che i magazzini siano freschi, ben aereati e sopratutto ben asciutti.

V. C.