

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIII.

1906

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1906

Patologia vegetale. — *La Typhula variabilis* R. e il *Mal dello Sclerozio della barbabietola da zucchero* (1). Nota del dott. UGO BRIZI, presentata dal Socio G. CUBONI.

Il così detto *Mal dello Sclerozio* della barbabietola, che tanti danni arreca qua e là, saltuariamente in certe annate, alle culture di barbabietola da zucchero, non è stato fin qui sufficientemente studiato perchè la crittogama causa di tale malanno non è stata finora definita. Soltanto il Prillieux nel 1895, studiando bietole da zucchero malate provenienti dalla Spagna, sospettò che il micelio e gli sclerozi che vi rinvenne, dai quali non ottenne mai la forma perfetta che permettesse di definirli, per la loro grande somiglianza con quelle della *Typhula variabilis* Riess, dovessero appunto riferirsi a questa crittogama.

Dopo il Prillieux, i pochissimi che si occuparono di tale malattia si limitarono a descrivere e accennare i caratteri delle alterazioni e la costante presenza degli sclerozi, attribuendoli allo *Sclerotium semen*, nè alcuno riuscì ad ottenere lo sviluppo di forme fruttifere dagli sclerozii.

Avendo avuta negli ultimi due anni possibilità di avere abbondante materiale da studio dalla provincia di Cremona, in parte da me raccolto e in parte per mezzo del prof. Alessandro Brizi, sono riuscito ad ottenere la forma fungina perfetta che deve appunto attribuirsi, come bene aveva sospettato Prillieux, alla *Typhula variabilis* Riess, determinando così definitivamente l'agente patogeno di questa interessante e dannosa malattia.

Le barbabietole da zucchero colpite dalla malattia nel mese di agosto, presentavano, all'inizio, delle larghe chiazze nerastre in vicinanza del colletto, chiazze che poi si estendevano, quasi sempre, da un solo lato della radice tuberizzata.

Sezionando le porzioni che apparivano alterate, al microscopio era facile vedere, con le opportune e consuete norme di preparazione e colorazione, un abbondante micelio sottile, ialino septato, il quale attraversa in tutti i sensi gli elementi del parenchima corticale, perfora le pareti, penetra nelle cavità cellulari, nelle quali spesso si avvolge in forma di gomitolo.

Il contenuto cellulare per la presenza del micelio era profondamente disorganizzato, mentre le pareti diventavano brune. I tessuti così alterati perdendo la tensione, in conseguenza della perdita del turgore delle cellule invase, infacedivano, per cui la superficie esteriore della radice, in corrispondenza delle porzioni malate, si presentava depressa, senz'altro carattere apparente.

(1) Dal Laboratorio di Patologia Vegetale della R. Scuola Sup. di Agric. Milano. Dicembre, 1906.

In seguito però, se le radici venivano tenute in ambiente caldo ed umido, il micelio si rendeva apparente anche all'esterno dei tessuti invasi, sotto forma di una sottile tela, simile a quella di un ragno, bianco-argentea, costituita da un intreccio, dapprima lasso, di fili di micelio a caratteri identici a quelli riscontrati nell'interno dei tessuti, poi a mano a mano più fitto, finchè diventa un vero feltro miceliare, fioccoso, bianco-argentino splendente.

La presenza del feltro fioccoso e argentino è assai evidente anche quando si estraggano dal suolo le barbabietole nelle quali la malattia è in istato avanzato. In tal caso l'intera radice tuberizzata e le radici laterali sono totalmente avvolte in una rete miceliare.

Sul bianco micelio ben presto appaiono dei piccoli grumi bianchissimi, costituiti da intreccio fittissimo di micelio che si avvolge a forma di gomitolo tondeggiate, dando così inizio alla formazione degli sclerozii, i quali ben presto assumono una forma determinata, sferica o sferoidale ed un colore rossastro o biondo, che talvolta rimane tale, e qualche altra volta diviene bruno cuoio o nerastro.

Questi sclerozii si producono in gran numero, tantochè non è difficile trovare delle barbabietole fortemente invase dal fungo, che sono tutte disseminate alla superficie di numerosi sclerozii, talvolta raggruppati in quantità considerevole, assai somiglianti a semi di piante diverse.

I più piccoli rassomigliano perfettamente ai semi del trifoglio ladino, soltanto che non sono perfettamente lisci, ma a superficie leggermente rugosa, altri somigliano a semi di ravizzone o di colza, e i più grossi a quelli della senape.

Frattanto la barbabietola, invasa sempre più dal micelio, viene totalmente disorganizzata per l'azione del micelio medesimo, e si trasforma in un ammasso putrido, dal quale è facile isolare a migliaia i piccoli sclerozii.

Questi ultimi sono costituiti da un lasso tessuto di filamenti intrecciati, i quali alla periferia formano una corteccia dura, resistentissima anche agli acidi diluiti.

Sembrandomi assai strano che gli sclerozii non dovessero dare alcuna forma fruttifera, ho tentato in molti modi di provocarne l'attività germinativa.

Anzitutto ho ottenuti gli sclerozii sviluppati in culture pure, portando piccole porzioni di micelio su fette di barbabietola cotta, sulle quali, in termostato alla temperatura di 26°-28°, cresce rigogliosamente, coprendo in poche ore il substrato di una frangia argentea. Diminuendo improvvisamente la temperatura fino a 18°, rapidamente dal micelio hanno origine numerosissimi piccoli sclerozii in tutto simili, e nell'aspetto e nella struttura, a quelli che si sviluppano direttamente sulle barbabietole ammalate.

Isolati i numerosi sclerozii così ottenuti e collocati su sabbia silicea umida, resa sterile, e in capsula di vetro sterile, e inumidito pure con acqua

sterile addizionata con un po' di saccarosio e peptone Witte, ho tentato di eccitare artificialmente la produzione dei corpi fruttiferi degli sclerozii, innalzando la temperatura e tenendoli costantemente in termostato, al buio, a circa 30° per molti giorni. Nessuno degli sclerozii germinò mai, per quante volte ripetessi la prova in tali condizioni. Alcuni si spaccarono sviluppando intorno una rosetta di micelio, che si estendeva più o meno rapidamente a seconda della ricchezza nutritiva del substrato, ma non più oltre di così.

Uguale insuccesso ottenni cimentando nello stesso modo gli sclerozii presi direttamente sulle barbabietole malate, da me stesso raccolte a Cremona e lasciate in laboratorio alla temperatura dell'ambiente. Neppure germinarono per quanto cercassi di variare fortemente le condizioni di luce, di temperatura, ecc., tanto che finii collo abbandonare quasi l'impresa.

Per conservare però vivente il fungo per ulteriori ricerche, continuai regolarmente i trapianti di coltura del micelio su fette di barbabietola cotta, per circa quattro mesi consecutivamente, operando il passaggio, sempre tenendo le colture a temperatura costante (20°-22°) in termostato durante tutto l'inverno circa una volta ogni dieci o dodici giorni.

Nel mese di febbraio, distratto da altri studi, abbandonai le colture in termostato, dove in quell'epoca per altre ricerche tenni una temperatura costante di 28°-30°, per oltre un mese, dopo il quale periodo trovai le fette di barbabietola, disseccate e fittamente coperte di piccoli sclerozii simili in tutto a quelli descritti, alcuni dei quali avevano prodotta la desiderata forma fruttifera, fin qui completamente ignota.

Da alcuni dei piccoli sclerozii si era sviluppato un sottile peduncolo lungo da 2 cm. a 2 cm. e mezzo, portante all'estremità un rigonfiamento a forma di clava perfettamente simile a quello descritto e figurato da Brefeld (1) per la *Typhula variabilis*, colla differenza che quasi tutti gli stipiti portanti il frutto claviforme, anziché essere semplici come quelli figurati da Brefeld, erano due o tre volte ramificati, e ciascuno dei singoli rami portava, a sua volta, un corpo fruttifero, come del resto accenna anche Winter (2).

Provai allora a collocare in termostato, alle stesse condizioni, su fette di barbabietola cotta, gli sclerozii che quattro mesi prima avevo presi direttamente dalle barbabietole infette e che avevo conservati chiusi in vaso di vetro.

Dopo circa un mese alcuni, pochissimi invero, degli sclerozii, avevano riprodotta la stessa forma fungina anzi descritta, che invano avevo cercato di ottenere qualche mese prima. Ciò si deve senza dubbio al fatto, come poi successive prove mi hanno dimostrato meglio, che gli sclerozii appena prodotti non sono capaci di germinare per dar luogo alla forma fruttifera per-

(1) *Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze* Hf. III, 1877, pag. 182, tab. VIII, figg. 1-3.

(2) *Die Pilze*, 1° Abth., pag. 301 (in Rabenhorst's Kryptogamen Flora, 1 Bd., 1884.

fetta, e che occorrono parecchi mesi, da quattro a sei, perchè, probabilmente, si completi la loro maturazione fisiologica, in modo perfettamente analogo a quanto accade per le forme ibernanti di molti funghi come oospore, teleutospore, ecc., le quali, appena costituite, non sono germinabili, e come del resto si verifica in molti semi di piante fanerogame.

Ciò spiega l'insuccesso delle prime colture, e di quelle che ebbi occasione di fare molti anni fa, sin dal 1894, a Roma.

Gli sclerozii inoltre non producono i corpi fruttiferi se non a temperatura molto elevata, e vicina ai 30°, il che probabilmente può spiegare perchè la malattia si presenti sempre nel caldo estate e attacchi perciò soltanto le barbabietole già adulte, manifestando i suoi effetti appunto sul finire di agosto, e manchi completamente quando le barbabietole sono giovanissime. Ciò forse anche spiega la ragione per cui la malattia finora è nota solo nei paesi del mezzogiorno ed è sconosciuta nelle regioni nordiche.

Inoltre la fruttificazione avviene soltanto, a quanto sembra dalle prove comparative fatte, o almeno preferibilmente, nell'assenza di luce, giacchè gli sclerozii, collocati al buio, produssero la forma fruttifera descritta, quelli invece tenuti nelle stesse condizioni, ma in una stufetta di germinazione colle pareti anteriori di vetro e in modo da dar passaggio ad abbondante luce diffusa, non ne produssero affatto.

* * *

La germinazione dello sclerozio avviene per rottura dello straterello di ife cuticularizzate che formano la corteccia dello sclerozio stesso, e da tale rottura fuoriesce un fascetto di ife che si innalzano, più o meno erette, in modo da formare il sottile stipite, mentre altre ife isolate irraggiano alla base, si distendono sopra lo sclerozio coprendolo come di una sottile ragnatela e finiscono col ramificarsi sul substrato nutritivo in modo da meritare il nome di rizoidi dato ad essi da Brefeld (loc. cit.).

Il fascio di ife che diviene poi stipite, alla base di color biancastro e alla estremità violaceo, si allunga rapidamente e, il più delle volte, si ramifica subito in due o tre rametti dei quali uno conserva, in generale, dimensioni alquanto superiori e sul quale si differenzia più presto l'ingrossamento a clava su cui si sviluppa poi l'imenio, di un color gialliccio, o talvolta anche violaceo, d'aspetto ceroso.

I basidi sono corti, fitti, ramificati a rami più o meno varicosi, e clavati alla estremità dove portano due, tre o, più generalmente, quattro basidiospore, attaccate ai relativi sterigmi, brevissimi.

Le basidiospore germinano in modo assai facile e rapido, alla temperatura di 30° su decotto di radici di bietola filtrato e gelatinizzato al 15 % con aggiunta una piccola quantità di Agar.

Danno origine ad un micelio bianco fiocoso, perfettamente simile a quello che trovasi sulle bietole malate, che invade ben presto tutto il substrato producendo direttamente i consueti piccoli sclerozii, appena la potenzialità nutritiva del substrato va esaurendosi.

Ho voluto poi fare delle prove per valutare l'azione patogena del fungo, partendo dal micelio nato dalle basidiospore.

Vista la facilità colla quale dalle barbabietole ammalate si può comunicare la malattia a bietole sane, soltanto collocando una porzione di tessuto infetto e ricco di micelio a contatto con la radice sana, ho provato lo stesso metodo col micelio in cultura pura ottenuto direttamente dalle basi diospore.

Su radici sanissime di bietola, a lungo lasciate in acqua corrente, liberate da ogni residuo di terriccio e ben lavate più volte con soluzione di formolo, collocavo, nelle condizioni opportune, delle piccole porzioni di substrato culturale con micelio in rigogliosa vegetazione, ottenuto dalla germinazione delle basidiospore, in punti diversi, presso al colletto, o sulla parte più grossa, od anche sulla porzione assottigliata del fittone.

Operando in tal modo e in tali condizioni l'infezione o non riusciva, od era tenuissima. Di dieci barbabietole da zucchero sperimentate, appena su tre, in corrispondenza della infezione praticata al colletto, vi fu evidente e spontanea, per quanto lenta, penetrazione del micelio attraverso lo strato sugheroso, ma i tessuti invasi non si putrefecero quasi affatto e la lesione rimase localizzata, per quanto le radici in esperimento fossero tenute in condizioni favorevoli allo sviluppo del fungo.

Ripetei più tardi la prova di infezione pensando di servirmi del micelio stesso, nato bensì da basidiospore, ma che aveva subito successivi numerosi trapianti su fette di barbabietola o di carota cotte, ed ottenni risultati più decisivi.

Infatti il micelio, riprodotto e continuato per uno spazio di tempo di circa un mese, obbligandolo alla vita saprofitica su bietole cotte, si mostrò di una virulenza grandissima. Collocando dei pezzetti di bietola cotta invasi dal micelio, sopra bietole intere e sane, col metodo accennato più sopra, in capo a tre giorni alla temperatura di 26°-28° il micelio aveva perforato, nettamente, come era facile persuadersene coll'esame microscopico, lo strato sugheroso e aveva invaso i tessuti del parenchima corticale.

Una sola infezione bastava perchè l'intera radice, tenuta in termostato, venisse a poco a poco violentemente e interamente invasa dal micelio che sviluppavasi rapidamente all'interno e all'esterno, tanto da ridurre in otto o dieci giorni tutta la radice in completo stato di putrefazione per cancrena umida, con abbondante formazione, all'esterno, di sclerozii.

Il micelio che vive benissimo come aerobio fin che trovasi all'aria, si adatta senza dubbio alla vita anaerobia nell'interno dei tessuti della barbabietola e, probabilmente, a intensi fenomeni di respirazione intramolecolare

si deve il rapido disorganizzarsi dei tessuti. Infatti, comprimendo al torchio alcune delle barbabetole infettate artificialmente, in istato di non avanzata decomposizione, a nessun altro microrganismo dovuta se non al micelio della *Typhula*, raccogliendo il succo, diluendolo in quattro volumi di acqua distillata, poi filtrandolo accuratamente e sottoponendolo alla distillazione, era facile, con la reazione del iodio e idrato potassico, ottenere nel distillato la caratteristica formazione di iodoformio, denotante la presenza di alcool.

Riservandomi di pubblicare in seguito altri particolari biologici relativi al fungo, e in particolar modo circa l'importanza delle forme *oidiiformi* del micelio accennate da Brefeld (l. c.), ed i risultati di altri esperimenti in corso relativi a questa singolare malattia, ho creduto utile esporre queste poche ricerche interessanti, soprattutto perchè hanno chiarita senza dubbio l'origine di questa controversa malattia di una sì importante coltura, determinandone la causa efficiente in un fungo dell'ordine dei Clavarieti, la *Typhula variabilis* Riees, e completando il suo ciclo di sviluppo.

Dimostrarono le prove accennate, oltre alla proprietà che hanno gli sclerozoi di non essere germinabili se non dopo lungo tempo da che sono prodotti, e che ciò non ostante non sono germinabili se non al buio e a circa 28°-30°, anche il potere altamente patogeno del micelio di tale fungo, il quale è capace di penetrare, spontaneamente, in tessuti sani e senza precedente soluzione di continuità dei tegumenti, secernendo probabilmente qualche enzima idrolizzante. Un altro fatto importante hanno pure posto in luce, quale è quello della maggiore virulenza del potere patogeno del micelio stesso, infinitamente maggiore, quando per un certo tempo abbia vissuto vita puramente saprofitica, analogamente a quanto accade in alcune *Sclerotinie* ed in alcune *Ustilaginee*.

Questo comportarsi del micelio del fungo può spiegare perchè la malattia, come risulta dai dati raccolti e da diligente inchiesta fatta e da notizie che da molti anni possiedo su tale malattia, che ebbi occasione di conoscere e studiare fin dal 1894 e nel 1896 nei dintorni di Roma, si abbia preferibilmente, in terreni destinati la prima volta a coltura della barbabetola oppure anche in tutti quelli largamente provvisti di sostanza organica, la quale può mantenere senza dubbio a lungo il micelio allo stadio di vita saprofitica, e perciò più virulento quando trovi l'opportunità di divenire parassita.

Non è perciò improbabile che la malattia stessa si possa rendere meno temibile coll'uso di concimi minerali e di ammendamenti calcari, i quali senza dubbio giovano nel senso che limitava la quantità di sostanza organica, o ne rendono più spedita la decomposizione e quindi creano, in entrambi i casi, un ambiente meno favorevole alla vita saprofitaria del micelio della *Typhula variabilis* R.