

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIV.

1907

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVI.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1907

Fisiologa vegetale. — *Ricerche bacteriologiche sui tubercoli dell' Hedysarum coronarium L. (Sulla) (¹).* Nota di G. SEVERINI, presentata dal Socio R. PIROTTA.

Occorre innanzi tutto premettere che nel parenchima del tubercolo è difficile distinguere la forma bacterica, perchè, anche nei tubercoli giovanissimi, si trova un'enorme prevalenza di bacteroidi in forma di X, Y, T ecc. Durante la fioritura della Sulla (maggio-giugno) i bacteroidi contengono vacuoli per lo più all'estremità delle branche o lungo il corpo del bacteroide: talvolta si dispongono in catena, tal'altra quelli situati all'apice si ingrossano in modo da far apparire rigonfiato l'apice stesso. Quando si inizia la maturazione dei frutti, i vacuoli divengono sempre più ampi, si fondono fra di loro e talvolta in modo da occupare tutto il corpo del bacteroide del quale non resta che un sottile straterello periferico. Non mi è stato possibile di poter seguire ulteriormente la sorte dei bacteroidi: a questo punto corrisponde poi lo svuotamento e il disfacimento dei tubercoli.

Prima di accingermi alle prove di isolamento e di coltura dei batteri di Sulla, volli stabilire con precisione se la formazione dei tubercoli avvenga normalmente e costantemente su terreno ordinario, oppure no (²). A tal uopo furono istituite quattro diverse serie di esperienze, delle quali riassumo i procedimenti e riporto i risultati di maggiore importanza.

A. Colture in vasi con sabbia sterilizzata, previa sterilizzazione o no del seme. Il seme (proveniente dalla ditta Ingegnoli) fu sterilizzato immergendolo e mescolandolo per cinque minuti in una soluzione di sublimato corrosivo 1 ‰; poi lavandolo con acqua sterilizzata. Nei vasi con semente sterilizzata non si ebbe formazione di tubercoli. Ugualmente prive di tubercoli si ebbero le piante provenienti da semi non sterilizzati. Gli innaffiamenti furono fatti con acqua di fonte, bollita.

B. Colture in piena terra su due distinti appezzamenti nel giardino annesso all'Istituto Botanico: nell'uno di essi fu mescolata una certa quantità di terriccio proveniente da vecchio sullaio, nell'altro non fu fatto alcun trattamento speciale. Il seme adoperato non fu sottoposto a sterilizzazione. La semina fu fatta il 20 marzo 1906: va notato che negli appezzamenti scelti non fu mai coltivata Sulla in precedenza. Su queste piante furono eseguite:

(¹) Lavoro eseguito nel R. Istituto Botanico di Roma. La memoria estesa verrà pubblicata negli Annali di Botanica del prof. R. Pirotta.

(²) È noto, che la Sulla non si sviluppa su terreno nuovo se non vi si mescola della terra di buon sullaio (D. Sbrozzi, *La Sulla*, II edizione, pag. 105).

1. *Misure periodiche dell'accrescimento e del numero dei tubercoli formati.* — Lasciando da parte tutte le osservazioni intermedie, dirò solo che nell'appezzamento a cui non era aggiunto terreno di sullaio non apparvero mai tubercoli sulle radici e che il primo sviluppo fu pressochè uguale in ambedue le parcelle: ma a cominciare dalla formazione della terza foglia si notava uno sviluppo maggiore nelle piante dell'appezzamento infettato, così che il 12 luglio il peso medio di 100 piante con tubercoli era di kg. 5,945, e di 100 piante senza tubercoli di kg. 1,740. Un'idea delle dimensioni raggiunte dalle piante in quel giorno si può avere dalla seguente tabella che porta le medie di dieci individui per ogni parcella:

	Longhezza radice principale	Altezza dei fusti	Numero foglie e fo- glioline	Numero info- rescenze	Numero fiori per in- fioresc.	Numero frutti già maturi	Numero tubercoli	Peso medio
Piante con tuberc.	cm. 36,4	cm. 93,0	26 foglie (5-11 fo- glioline)	5,8	13-37	32,8	15-40	Kg. 0,594
Id. senza tuberc.	" 28,1	" 57,8	12 (5-9)	1,5	8	2,7	0	0,174

L'esperienza è stata ripetuta anche quest'anno e fino ad ora nella parcella non infettata le piante mancano di tubercoli, mentre invece si sono sviluppati copiosamente nelle piante cresciute in terreno inoculato.

2. *Analisi quantitative.* — Le analisi si riferiscono all'azoto totale organico, proteico, nitrico⁽¹⁾, amido, zucchero, sostanza secca, ceneri, e furono eseguite con i soliti procedimenti. Rilevo però che la sostanza fresca veniva essiccata prima all'aria, poi in stufa a 70°-80° finchè non diminuiva più di peso. L'incenerimento fu fatto con aggiunta di carbonato sodico 10 %, e poi di carbonato ammonico. L'amido fu misurato per idrolisi con HCl.

Risultati analitici. I dati riportati nelle seguenti tabelle si riferiscono per le colonne I-II a 100 parti di sostanza fresca, e per le colonne III-IX si riferiscono a 100 parti di sostanza secca.

1^a *analisi.* Materiale prelevato il 6 giugno 1906:

Materiale esaminato	I Acqua	II Sostanza secca	III Azoto organico	IV Azoto proteico	V Azoto nitrico	VI Altre forme d'azoto	VII Amido	VIII Glucosio	IX Ceneri
<i>Piante con tubercoli</i>									
Fusti e radici	87,84	12,16	1,510	0,624	0,216	0,886	5,616	4,291	11,82
<i>Piante senza tubercoli</i>									
Fusti e radici	88,10	11,90	1,270	0,450	0,463	0,820	3,250	1,977	9,36

⁽¹⁾ In principio feci anche qualche determinazione di azoto aminico e di basi hexoniche: ma le differenze erano insensibili.

2^a analisi. Materiale prelevato il 12 luglio 1906:

Materiale esaminato	Acqua	Sostanza secca	Azoto organico	Azoto proteico	Azoto nitrico	Altre forme d'azoto	Amido	Glucosio	Ceneri
<i>Piante con tubercoli</i>									
Fusti	83,10	16,90	1,050	0,342	0,060	0,708	5,125	3,071	5,690
Radici	73,77	26,23	0,548	0,200	0,190	0,348	2,576	1,065	6,720
<i>Piante senza tubercoli</i>									
Fusti	80,43	19,57	0,982	0,366	0,214	0,616	4,673	3,110	5,494
Radici	61,81	38,19	0,360	0,195	0,830	0,165	2,560	1,244	6,836

3^a analisi. Materiale prelevato il 14 novembre 1906:

Materiale esaminato	Acqua	Sostanza secca	Azoto organico	Azoto proteico	Azoto nitrico	Altre forme d'azoto	Amido	Glucosio	Ceneri
<i>Piante con tubercoli</i>									
Fusti	90,284	9,716	2,146	0,460	0,966	1,686	4,550	0,646	5,390
Radici	84,25	15,750	0,652	0,154	0,531	0,488	3,594	0,335	6,372
<i>Piante senza tubercoli</i>									
Fusti	85,57	14,43	1,969	0,325	0,507	0,644	0,881	0,299	5,024
Radici	86,06	13,94	0,204	0,127	0,555	0,077	2,753	0,236	6,364

Dai risultati della prima analisi si rileva una prevalenza nella percentuale di azoto totale organico, proteico, amido, glucosio, sostanza secca e ceneri per le piante con tubercoli, e una prevalenza di azoto nitrico nelle piante senza tubercoli. Nella seconda analisi, considerando insieme fusti e radici, si ha sempre prevalenza di azoto totale organico e di altre forme di azoto che non siano nè proteica nè nitrica, di amido, ceneri nelle piante con tubercoli e di azoto nitrico nelle piante senza tubercoli. Dalla terza analisi infine si ricava lo stesso fatto, solo che i fusti delle piante con tubercoli sono più ricchi anche di azoto nitrico.

Le variazioni dell'azoto durante il periodo vegetativo sono evidentemente in relazione con lo stato di sviluppo degli organi analizzati.

C. *Culture in sabbia sterilizzata*, previa sterilizzazione del seme, con aggiunta di poltiglia di tubercoli o di acqua di lavaggio di terra di Sulla. 16 novembre 1906. Seminazione e trattamento suddetto.

15 dicembre 1906. Scalzando le piantine trovai nelle radici numerosissimi tubercoli in formazione.

D. *Culture acquose*. Furono apprestate delle culture acquose non solo per infettarle, quando le piantine si fossero sviluppate, con polpa di tubercoli, ma anche con culture di batteri che eventualmente avessi isolate dai tubercoli stessi. Però, ad onta di ripetuti tentativi, non fu possibile far crescere la Sulla in culture acquose, per le quali usai soluzioni nutritizie con le formule più svariate, con e senza calce, con e senza azoto ecc.

Prove di isolamento del Bacterio. — Le prove di isolamento furono iniziate nella primavera del 1906 con contenuto di tubercoli di piante seminate nel 1905 all'Istituto Botanico con aggiunta di terreno di Sulla di provenienza dai dintorni di Messina. Il materiale fu seminato su gelatina con peptone e glucosio, su agar con peptone e glucosio, su gelatina con glucosio e infuso di radici di Sulla: tutti substrati debolmente acidi. Con queste culture isolai quattro diversi batteri la cui inoculazione su piantine di Sulla non dette formazione di tubercoli.

Credo utile di riassumere il procedimento tecnico da me seguito per l'isolamento e per l'inoculazione dei batteri.

a) *Isolamento*. Scelte le piante più vigorose e lavate le radici in corrente d'acqua, si sceglievano i tubercoli e si distaccavano insieme ad un certo tratto di radice. Si sottoponevano di nuovo a corrente d'acqua lavando la superficie con un pennello per allontanare le particelle terrose, e dopo averli distesi su carta bibula, si distaccavano dalla radice tagliandoli alla base. I tubercoli stessi venivano poi ripartiti in un certo numero di provette ed ivi lavati con acqua sterilizzata, agitando per circa mezz'ora, e rinnovando 20-30 volte l'acqua. Dopo di che nelle provette stesse veniva versata rapidamente una soluzione di acido fenico al 5% agitando per 2-3 secondi, e poi sostituendo e rinnovando l'acqua per 8-10 volte. Infine si versavano tutti i tubercoli rapidamente in una capsula di vetro con coperchio, sterilizzata in stufa a secco, ed ivi ridotti a poltiglia con bacchetta di vetro previamente arroventata: il liquido torbido serviva per l'inoculazione. Talvolta invece di ridurre in poltiglia i tubercoli, si portavano in una capsula di vetro sterilizzata col calore, ed ivi sezionati con un bisturi precedentemente arroventato; coll'ago di platino si asportava dal centro del tubercolo una certa quantità di materiale che si portava in una provetta contenente un po' d'acqua sterilizzata, e ripetendo l'operazione finchè, agitando la provetta, non si ottenesse un visibile intorbidamento del liquido.

b) *Inoculazione*. I semi venivano prima immersi in una soluzione di sublimato corrosivo all'1‰ per 5 minuti, e poi lavati molte volte in acqua sterilizzata (¹). Dopo averli fatti

(¹) Hiltner und Störmer, *Neue Unters. über die Wurzelknöl. der Legumin. u. deren Erreger*. Arb. aus der Biol. Abt. für Land, etc. Gesund., Vol. IV, pag. 302. rigonfiare in acqua per 10-12 ore, venivano di nuovo lavati con acqua sterilizzata e collocati su capsule di vetro nel cui fondo erano distesi alcuni fogli di carta bibula, il tutto sterilizzato a secco. Contemporaneamente si preparavano culture di batteri o su piastre di

Altri tentativi d'isolamento del bacterio specifico furono fatti, con tubercoli di piante seminate il 20 marzo 1906, con gelatina o agar al glucosio più peptone o estratto concentrato secco di radici di *Sulla* in proporzioni ben definite (0,5 %); con queste culture isolai quattro bacteri diversi di cui tre corrispondevano a tre della serie precedente e uno era nuovo.

Le colture pure di uno di questi bacteri, il quale era già stato isolato anche negli esperimenti precedenti, e che si distingueva per la formazione di colonie bianche, irregolari, molto prominenti, di aspetto e consistenza mucillagginosa, per la forma allungata e per la scarsità delle forme mobili e perchè non fluidificante la gelatina, dette formazione di tubercoli su giovani piantine circa 35 giorni dopo l'infezione. Gli altri tre si mostrarono inefficaci.

Colla speranza di trovare i bacteri più virulenti, ho fatto prove di isolamento con tubercoli di *Sulla* spontanea raccolta a *Ponte Galera* presso Roma. Questi mi hanno data una sola specie di bacteri distinguibili per le colonie biancastre, piccole, tondeggianti o discoidali, superficiali e profonde e di consistenza leggermente mucosa, per la forma alquanto allungata e per l'abbondanza di forme mobili. Questi bacteri hanno prodotto tubercoli in due serie di esperienze successive: la prima volta 27 giorni, la seconda un mese dopo l'inoculazione.

Infine un'altra serie di tentativi fu eseguita con culture gentilmente favoritemi dal prof. Strampelli⁽¹⁾. Erano tre bacteri: uno rosso, uno bianco ed uno giallo e, secondo le affermazioni orali del prof. Strampelli stesso, il più virulento era il rosso. Inoculai tutti e tre i bacteri su piantine di *Sulla* ed ottenni formazione di tubercoli da tutti e tre; ma in una successiva prova d'inoculazione, alla quale i bacteri arrivarono dopo essere necessariamente stati *passati* più volte su gelatina con estratto di radici di *Sulla*, tutti e tre si sono mostrati inattivi.

Rimaneva a decidere se e quale dei batteri da me isolati fosse il vero agente in confronto agli altri, e a questo scopo ho ripetute le esperienze con tutti i bacteri che avevo precedentemente isolati e con quelli del prof. Strampelli. Ma questa volta il solo bacterio di *Ponte Galera* ha riprodotto tubercoli: infatti in tutti i vasi infettati il 2 maggio 1907 ed esaminati il 1° luglio,

gelatina nutritiva o su mezzi liquidi (soluzioni di peptone e glucosio, o di estratto di radici di *Sulla* e glucosio). Quando le radichette erano fuoriuscite dai semi per 5-15 mm. i semi stessi venivano gettati o sulle piastre di gelatina fluidificata a 25° o sui recipienti con substrati liquidi, lasciandoveli per alcuni minuti. Indi venivano seminati sui vasi versandovi poi sopra il materiale batterifero. I vasi di cultura, lavati accuratamente in acqua corrente, venivano sterilizzati mantenendoli per 6-7 ore in stufa di Koch. La sabbia adoperata era stata precedentemente sottoposta all'arroventamento per circa 24 ore.

(¹) Strampelli N., *Culture di bacteri azotofagi per la Sulla*, Bull. Off. Min. Agricoltura, I. e C., anno IV, 1905, vol. II, pagg. 740-42.

ho trovato piantine con tubercoli in discreta quantità, ma ancora molto piccoli e disposti sia sulla radice principale, sia sulle laterali. Nei vasi di controllo non c'era invece traccia alcuna di formazione di tubercoli. Bisogna notare che in quest'ultima serie di inoculazioni, i batteri provenivano da culture pure di passaggio di ordine ben superiore ai precedenti, così che impurità o promiscuità con altri organismi probabilmente erano ormai escluse. Dopo tanti passaggi, il solo batterio di *Ponte Galera* si conserva attivo; gli altri, o hanno perduta la virulenza o provengono da colonie miste, costituite di un organismo virulento e di un compagno estraneo, il quale solo si è propagato nei successivi passaggi ⁽¹⁾.

Chiuderò questa breve esposizione dei miei risultati di isolamento e di infezione, riportando alcuni saggi fatti per l'esame delle *proprietà batteriologiche* e del *portamento culturale* del batterio di *Ponte Galera* che fino ad ora si è dimostrato il più attivo produttore di tubercoli su questa leguminosa. Occorre premettere che su tutti i tubercoli, anche giovanissimi, accertai la presenza di un enorme numero di bacteroidi, mentre le forme batteriche erano in quantità assolutamente minima. I saggi eseguiti furono i seguenti:

Culture in substrati liquidi. — Il batterio si sviluppa scarsamente e lentamente in tutte le soluzioni nutritive *neutre* (peptone e glucosio o saccarosio, estratto concentrato di radici di sulla e glucosio o saccarosio, asparagina), pochissimo in presenza di fosfato acido di potassio; non sviluppa in presenza di nitrato di potassio. Queste sostanze vennero fornite in soluzioni varianti fra 0,5 e 2,5 % ⁽²⁾, senza notare regolarità degne di nota. Solo per l'estratto concentrato di radici di Sulla ho potuto stabilire che la dose ottimale è di gr. 0,5 %. Nei substrati liquidi, e non sulle gelatine, dà luogo a forme ramificate che probabilmente non sono che catene di 3 o 4 elementi provenienti dalla divisione di un solo individuo.

Culture in substrati solidi. — In substrati solidi il batterio si sviluppa assai meglio. In piastre, con gelatina al peptone si sviluppano colonie superficiali e profonde, biancastre, di consistenza mucosa; le profonde restano piccole, le superficiali si allargano mantenendosi circolari e a margine un po' sinuoso: il batterio è poco mobile e dopo 6-7 giorni il protoplasma si

⁽¹⁾ V. Peglion (al quale prima non era riuscito di avere produzione di tubercoli sull'*Hedysarum coronarium* adoperando i batteri di Moore per la lupinella e per il pisello comune, v. Staz. sper. agr., vol. XXXVIII, pag. 702, 1905), ha isolato, come appare da una recente pubblicazione (Staz. sperim. agr., XL, pag. 156, 1907), da tubercoli di Sulla coltivata, un batterio il quale potrebbe corrispondere tanto ai batteri che io ho isolati a più riprese da Sulla coltivata, come a quello di *Ponte Galera*. Non si comprende però se il batterio isolato dal Peglion si conservi virulento in cultura artificiale, perchè questo autore non dice di aver fatto passaggi prima di inocularlo.

⁽²⁾ Hiltner und Störmer, *Neue Untersuchungen*, I. c., pp. 228, 231 e seg.

contrae in masse dense fortemente rifrangenti, di forma rotonda, ovoidale od allungata corrispondente alla forma della cellula: esse si colorano con la fucsina come se fossero spore, ma non sono spore, come si può agevolmente dimostrare in vari modi. In goccia pendente si vede p. es. che esse si schiariscono e rigonfiano fino a riempire di nuovo tutto il bacterio di protoplasma poco colorabile, senza che si osservi in esse la menoma rottura od accenno a germinazione. Se si pastorizza il materiale contenente queste masse di protoplasma in riposo a 80° C., anche per soli *cinque* minuti, se ne ottiene la sterilizzazione completa. Tali formazioni sono dovute dunque ad una specie di plasmolisi spontanea o incistamento del protoplasma dei bacteri, i quali non sono affatto sporigeni. Essi però tendono a formare presto tali *cellule durature* con protoplasma condensato, e forse questa è la ragione per cui questi bacteri conservano la virulenza dopo numerosi passaggi. Il bacterio si sviluppa pure abbastanza bene su gelatina al latte, al saccarosio ecc. Coltivato su agar all'estratto di radici o al peptone, le colonie presentano una forma discoidale: le superficiali però si distendono circolarmente, e al loro centro resta un nucleo discoidale ben distinto: anche qui il bacterio è più mobile in agar all'estratto che non in agar al peptone: forma cellule durature in ambedue i substrati dopo 6-8 giorni. Anche in agar al latte si coltiva abbastanza bene.

L'aspetto su culture *per strisciamento* varia poco: il bacterio forma talora una serie di minutissime colonie che rapidamente si fondono, tal'altra forma subito una lunga stria. Le culture *per infissione* dimostrano evidentemente che il bacterio è *aerobio*.

Sviluppo del bacterio in substrati a diversa reazione. — Lo sviluppo massimo si ha a reazione neutra, e ciò tanto nei substrati solidi come in quelli liquidi: a reazione debolmente acida si sviluppa scarsamente su gelatina all'estratto di radici, non in substrato liquido, e in soluzioni debolmente alcaline non si sviluppa affatto.

Produzione di alcali o di acido. — Mi servii di una soluzione nutritiva all'estratto di radici di Sulla, perfettamente neutralizzata e leggermente colorata con tintura di tornasole: non si ebbe alcuna variazione nella reazione.

Inoltre questo bacillo *non coagula il latte, non si colora col Gram, non fluidifica la gelatina.*

Quanto ai bacteroidi è da ritenersi che essi pure, seminati sui substrati anzidetti, non periscano, ma bensì diano origine a colonie di bacilli, come lo rende assai probabile lo sviluppo di colonie tipiche da polpa di tubercoli che contengano in massima prevalenza bacteroidi.

Da questi caratteri morfologici e proprietà culturali si rileva che il bacterio di Sulla si allontana notevolmente da quelli delle altre leguminose, per quanto è possibile giudicare dalle descrizioni ancora controverse che di esse sono state date ⁽¹⁾, e che i bacteri che eccitano la Sulla a fare tubercoli

(1) Cfr. Hiltner, Beyerinck, Pasmowsky, Mazé, De-Rossi ecc.

in terreni nuovi per questa leguminosa, perdono con grande facilità la loro virulenza di modo che bisogna considerarli come ospiti transitori e non intimi; mentre se si vuol porre le mani sopra il vero simbiote della Sulla, bisogna ricorrere ai microrganismi che abitano nei tubercoli della leguminosa *spontanea*, cioè vegetante da tempo immemorabile in una determinata località.

Questo risultato fa pensare che, siccome tanto Strampelli quanto io abbiamo isolato quei numerosi batteri *apparentemente* virulenti da tubercoli di Sulla coltivata con aggiunta di terra di sullaio, i batteri che questa terra porta *non sieno capaci* di conservare la virulenza *fuori* del tubercolo di Sulla o in generale delle radici vive di questa leguminosa. Di qui nasce una importante questione agraria. È noto, che la Sulla si falcia lasciando in posto la base dei fusti e relative radici, da cui poi nella successiva stagione spuntano nuovi fusti, e così via per più anni. È chiaro che con questo sistema di cultura *una* inoculazione di terreno di sullaio, contenente tubercoli o radici vive, basta finchè la Sulla è viva. Ma qualora si intercali alla Sulla un'altra cultura, con completa estirpazione dei cespi di Sulla, credo, in base ai miei risultati, che sia utile una nuova inoculazione di terra fresca di sullaio, tutte le volte che si voglia riseminare la Sulla su quel medesimo appezzamento per ottenerne nuovamente un pronto e rigoglioso sviluppo. Questa costosa e difficile pratica si potrebbe forse evitare ricorrendo alle culture pure della razza di batteri isolata dai tubercoli di Sulla *spontanea*.

ELEZIONI DI SOCI

Colle norme stabilite dallo Statuto e dal Regolamento, si procedette alle elezioni di Soci e Corrispondenti dell'Accademia. Le elezioni dettero i risultati seguenti per la Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali:

Fu eletto Socio nazionale:

Nella Categoria I, per la *Meccanica*: MORERA GIACINTO.

Furono eletti Corrispondenti:

Nella Categoria I, per la *Matematica*: LAURICELLA GIUSEPPE.

Nella Categoria II, per la *Chimica*: PERATONER ALBERTO.

Nella Categoria IV, per la *Fisiologia*: MARCACCI ARTURO; per la *Patologia*: VASSALE GIULIO.

Furono inoltre eletti Soci stranieri:

Nella Categoria I, per la *Geografia matematica e fisica*: ALBRECHT TEODORO.