

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVI.

1909

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVIII.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1909

ha dato una nettissima colorazione bruna, che apparentemente non può essere data che dal platino. Ma su questo torneremo tra breve con dati analitici più sicuri.

Dalle esperienze riferite emerge chiaramente che l'acqua distillata pura attacca a caldo facilissimamente il rame, facendolo passare in soluzione anche dalle leghe con altri metalli; attacca modicamente l'argento facendolo passare in soluzione allo stato colloidale, ed attacca pochissimo il platino. Notiamo per ora i fatti, senza spiegarli e senza farne delle applicazioni, poichè è nostra intenzione di tornare, tra breve, su questo importante argomento.

Patologia — Nodi, treccie e convoluti vasali nel cervello senile. Nota del dott. UGO CERLETTI, presentata dal Socio B. GRASSI.

Questa Nota sarà pubblicata nel prossimo fascicolo.

Patologia vegetale. — Un'esperienza sopra il valore del chemotropismo nell'azione parassitaria dei funghi. Nota di L. PETRI, presentata dal Socio G. CUBONI.

Una recentissima pubblicazione di E. W. Smith ⁽¹⁾ sopra la parte che il chemotropismo ha nel determinare l'azione infettiva nei funghi parassiti, mi decide a pubblicare alcuni risultati di una serie di ricerche, che, sino dal 1905, avevo iniziato allo scopo di definire la vera natura del meccanismo della resistenza naturale contro dati funghi in alcuni vegetali superiori. Non avendo potuto ancora terminare tali ricerche, perchè assorbito da altri lavori, credo opportuno descrivere in questa Nota un'esperienza che, a quanto mi consta, non fu ancora tentata da alcun altro studioso di patologia vegetale.

Nelle ben note esperienze di Miyoshi ⁽²⁾, come in quelle di altri osservatori (Büsgen, Reinhardt, Smith) sopra il chemotropismo dei funghi, l'ostacolo, interposto fra il micelio in esame e la sostanza stimolante, è costituito generalmente da lamine di celloidina, di mica o metalliche. Miyoshi ha anche adoperato delle foglie viventi, separate dalla pianta, di *Tradescantia discolor*, *T. procumbens* e *T. variegata*, iniettate con soluzioni nutritive.

⁽¹⁾ Smith, E. W., *Ueber den Parasitismus der Pilze*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten, Bd. XIX, 1909, pag. 129.

⁽²⁾ Miyoshi M., *Ueber Chemotropismus der Pilze*. Bot. Zeitg., 1894, pag. 1.

I micelii posti sopra l'epidermide, stimolati positivamente, penetrano nell'interno del mesofillo attraverso le aperture stomatiche.

Nelle mie esperienze ho pure adoperato delle foglie viventi, ma queste rimanevano in unione organica con la pianta e non erano nè iniettate nè comunque bagnate con la soluzione stimolante, la quale era posta a una determinata distanza dalla superficie fogliare opposta a quella su cui poteva svilupparsi il fungo in esame. In tal modo la foglia vivente e normalmente vegetante costituiva l'ostacolo che il micelio doveva superare per raggiungere la sostanza nutritiva.

Questo mio tentativo muove dai seguenti quesiti che riguardano direttamente il meccanismo dell'immunità nelle piante superiori.

Se quelle piante, che sono dotate di un'immunità naturale contro dati funghi, si potessero porre in condizioni per le quali, pur non modificandosi la struttura istologica nè la composizione chimica del contenuto cellulare, si trovassero sottoposte all'attacco di questi funghi, energicamente stimolati, presenterebbero ancora tali piante una sufficiente resistenza? O in altre parole l'immunità naturale contro dati organismi sussiste in questi vegetali perchè sono privi di un'azione chemotropica positiva o piuttosto perchè la loro struttura istologica o il contenuto cellulare hanno la facoltà di neutralizzare i mezzi meccanici o chimici che i funghi parassiti hanno a loro disposizione per determinare l'infezione?

Un tal quesito si ricollega all'altro se nelle piante superiori, come negli animali, l'immunità naturale si svolga quasi esclusivamente contro gli organismi parassiti piuttosto che contro i loro prodotti enzimatici o tossici.

Il fungo posto in esperimento è stata la *Sclerotinia Libertiana* Fuck., una forma assai virulenta da me isolata da piante di fagiuolo notevolmente infette dal « mal dello sclerozio ».

La ragione che mi ha indotto a prescegliere questo fungo piuttosto che un parassita ad azione più nettamente specifica è stata la seguente: Nella *Sclerotinia Libertiana* l'attività citolitica e tossica è ben distinta dall'azione meccanica di penetrazione delle ife, compendosi quindi a distanza il processo enzimatico, che nei parassiti obbligati specialmente, si compie sotto la presenza diretta della cellula secernitrice. L'elaborazione della citasi e delle sostanze tossiche è così abbondante nel caso della *Sclerotinia*, che facilmente può farsi lo studio in vitro di queste secrezioni. Le stesse colture sopra carote forniscono al 15° o 18° giorno (Temp. media 16° C.) un'abbondante pectinasi mediante un processo di autolisi della maggior parte delle ife miceliali. Questa morte del micelio coincide per lo più con la formazione di microconidi. L'acidità del liquido così ottenuto varia da 0.09 a 0.1 % per le colture ottenute con micelio isolato di fresco, per le colture eseguite con micelio isolato da molti mesi il grado d'acidità diminuisce sino a 0.02-0.01 % (acidità riferita all'acido solforico) e in tal caso la citasi è

quasi inattiva anche sulle pareti cellulari di foglie di fagioli o di fava che sono delle più facilmente attaccabili da questo enzima.

Estraendo con la pressa il succo da foglie di tali piante attaccate dalla *Sclerotinia* si ottiene un liquido molto attivo per il grado elevato di acidità. In apposite prove eseguite con l'apparecchio rappresentato dalla fig. 1, servendosi come ostacolo fra il micelio e la sostanza stimolante, di porzioni di foglie imbevute di soluzioni più o meno concentrate di carbonato sodico, neutralizzante l'acidità della secrezione fungina, mi è stato facile stabilire che *variando l'intensità dello stimolo chemotropico varia nello stesso senso anche la quantità di ossalato acido di potassio elaborato dalla Sclerotinia* ⁽¹⁾. Questo fatto coincide con quanto Miyoshi aveva già dimostrato che cioè i fenomeni chemotropici seguono la legge di Weber.

Fra i prodotti elaborati dalla *Sclerotinia* non mi è stato mai possibile di porre in evidenza una sostanza di natura enzimatica provvista di un'azione tossica specifica sopra il citoplasma della pianta attaccata. Ciò contrariamente alle affermazioni di alcuni e a conferma di quanto già aveva constatato De Bary.

Come piante che sono per natura immuni contro gli attacchi della *Scl. Libertiana* ho prescelto alcune graminacee spontanee. L'immunità delle piante di questa famiglia per le varie specie di *Sclerotinia* non è però generale.

Schellenberg ⁽²⁾ ha descritto alcuni di questi funghi che possono infettare l'Orzo e il Frumento. La stessa *Scl. Libertiana* attacca, per quanto raramente, il Granoturco.

Numerosi tentativi per determinare un'infezione di *Agropyrum repens* P. B., di *Poa pratensis* L., di varie specie di *Festuca*, precedettero la scelta della pianta da sottoporre all'esperienza. Questi tentativi d'infezione mi hanno dato sempre risultato negativo.

Per quanto la *Scl. Libertiana* possa svilupparsi a spese di queste graminacee uccise col calore, non si deve ritenere che il mancato attacco della pianta viva sia dovuto a sostanze elaborate dal citoplasma, di natura enzimatica. Le pareti cellulari di *Agropyrum*, di *Poa*, di *Festuca* non presentano un'immunità contro la citasi del fungo, la dissoluzione della lamella mediana avviene sempre quando si faccia agire sopra l'epidermide fogliare o del culmo un liquido ricco di citasi ad un elevato grado di acidità, quale si ottiene dalle colture della *Sclerotinia* su substrato vivente (piante di fagiolo o di fava).

⁽¹⁾ Quando lo stimolo chemotropico diventa subminimale anche l'elaborazione di citasi cessa quasi del tutto. Katz ha studiato fatti simili in altri funghi (*Die regulatorische Bildung von Diastase durch Pilze*. Pring. Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, pag. 599).

⁽²⁾ Schellenberg H. G., *Ueber neue Sclerotinien*. Centrabl. für Bakt., II Abt. Bd. XII, 1904.

L'acidità elevata è necessaria per la rapida neutralizzazione che l'ossalato acido di potassio, segregato dalla *Sclerotinia*, subisce a contatto del succo cellulare delle foglie delle graminacee.

Unendo quantità eguali di succo estratto con la pressa da foglie di *Agropyrum* o di *Poa* e liquido autolitico con citasi attiva, quest'enzima perde la propria attività per la quasi totale precipitazione dell'ossalato acido di potassio; riportando il grado di acidità eguale a quello del liquido autolitico, l'enzima riacquista la sua attività, esso dunque non è distrutto dal succo delle graminacee ma soltanto arrestato nella sua azione.

Lo stimolo chemotropico che il succo di foglie di graminacee esercita sul micelio della *Sclerotinia* raggiunge un grado subminimale (misurato con l'apparecchio descritto più oltre), e ciò in gran parte deriva dalla mancanza o dal quantitativo minimo di alcune sostanze che favoriscono lo sviluppo del fungo. Il peso del micelio (secco) che si sviluppa sopra un litro di decotto di foglie di *Agropyrum* è molto minore di quello del micelio ottenuto nello stesso periodo di tempo sopra un decotto di fagioli.

L'estrema difficoltà di un attacco della *Sclerotinia Libertiana* contro le graminacee anzidette è facilmente comprensibile dopo quanto ho ora brevemente riferito. È evidente che se artificialmente si aumentasse il grado dell'azione stimolante dei tessuti fogliari di queste piante verso il micelio della *Sclerotinia Libertiana*, l'infezione sarebbe resa possibile.

L'apparecchio qui rappresentato permette di realizzare una simile esperienza.

Un supporto metallico a due branche (6, fig. 1), mediante le due viti di pressione (5 e 10), mantiene lo stesso asse verticale, due tubi di vetro (3 e 9), i quali costituiscono la parte essenziale dell'apparecchio. Le loro due estremità combacianti sono perfettamente piane e forate al centro. Al tubo (3) è fissata, mediante il tappo (2) una bacchetta di vetro (1) assottigliata inferiormente e terminante con un filo di platino avvolto a spirale.

Il tubo (9) termina con un manicotto metallico (12) che gli permette di esser fissato al tubo (14) mediante

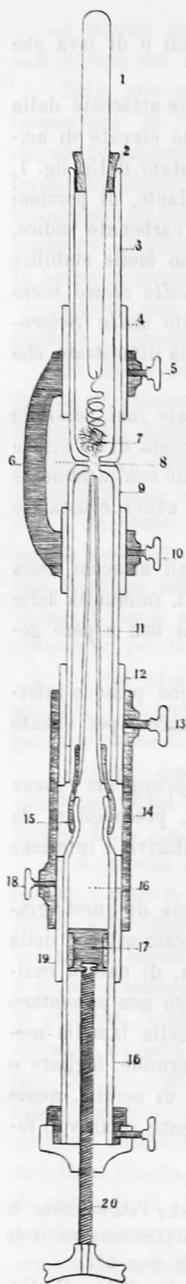


FIG. 1.

Spaccato longitudinale dell'apparecchio adoperato (4) (5 della gr. nat.).

la vite di pressione (13). Nello stesso tubo (14) è pure fissato il tubo di vetro (16) mediante la vite di pressione (18). L'estremità superiore di questo tubo (16) è alquanto assottigliata e mediante il manicotto di caoutchouc (15) vi è innestata la cannula di vetro (11). Una lunga vite (20) permette di alzare e abbassare nel tubo (16) un pistone (17) a perfetta tenuta.

I numeri 4, 12 e 19 indicano i manicotti metallici che circondano i tubi di vetro in corrispondenza del tratto che serve al loro innesto sui tubi maggiori.

La sterilizzazione dell'apparecchio si fa nell'autoclave, dopo di aver riempito di una soluzione nutritiva il tubo (16) e la cannula (11) tenendo abbassato il pistone.

Fra le due superficie combacianti dei tubi 9 e 3 si pone un pezzetto di carta da filtro imbevuta d'olio, premendola col tubo (3) che viene poi fissato colla vite (5). La bacchetta (1) vien tolta prima della sterilizzazione e l'orifizio del tubo (3) viene chiuso con cotone. La bacchetta (1) viene sterilizzata a parte, col calore umido, in una comune provetta dopo aver posto un piccolo pezzo di carota (7) all'estremità del filo di platino. A sterilizzazione terminata su questo pezzetto di carota vien trapiantato un poco di micelio di *Sclerotinia* e rapidamente la bacchetta, tolta dalla provetta, è introdotta nel tubo (3) dell'apparecchio come indica la figura. Prima di questa operazione al pezzo di carta da filtro interposto fra i due tubi (3 e 9) vien sostituita la foglia vivente. A tal fine vicino all'apparecchio è posto un piccolo vaso da fiori contenente una pianta delle graminacee prescelte. Una foglia, in ottime condizioni di vegetazione vien posta fra i due tubi nella posizione indicata dalla linea punteggiata (8). La forma lineare e il sottile spessore permettono di fare rapidamente e bene l'operazione.

Ho trovato utile di lavare previamente la superficie fogliare passandovi sopra un po' di cotone imbevuto in una soluzione di sublimato al 0.5‰ e quindi un buon lavaggio con acqua sterilizzata.

I due tubi (3 e 9) non devono premere sul lembo della foglia, ma devono trovarsi a leggero contatto con questo, in modo da non impedire l'accrescimento in quel punto, nè la traspirazione nè l'assimilazione. L'unico inconveniente che in queste esperienze può determinare l'insuccesso è il possibile sviluppo di batterii o di funghi saprofiti nella soluzione nutritiva contenuta nella cannula (11). Operando con precauzione però si riesce assai facilmente ad ottenere un mezzo sterile che si conserva per un tempo sufficiente.

Per effetto della sterilizzazione il livello della soluzione nutritiva si abbassa sempre nella cannula (11), è per mezzo della vite (20) che si può ricondurre il liquido sino ad affiorare all'estremità libera, che può essere a sua volta mantenuta a differenti distanze dalla superficie inferiore della foglia mediante innalzamento o abbassamento del tubo (9) nel tubo (14).

Quale soluzione nutritiva stimolante ho adoperato il decotto concentrato di fagioli bianchi. Questo decotto è di un color giallo d'ambra, perfettamente limpido, della densità di 1,082 a 25° C., e con un grado di acidità (riferita all'acido solforico) pari a 0.23 ‰. Nelle esperienze eseguite la concentrazione di questo decotto è ridotta di $\frac{2}{10}$ e di $\frac{6}{10}$. Queste diverse concentrazioni sono rispettivamente indicate con α (decotto concentrato), con β ($\frac{8}{10}$ di α), con γ ($\frac{4}{10}$ di α).

La tabella seguente mostra l'andamento delle esperienze.

Inizio della esperienza	Distanza in m/m della soluzione nutritiva dalla foglia	Liquido nutritivo	Concentrazione del liquido nutritivo	Resultato dell'esperienza
22 febbraio 1906	1,5	Decotto di fagioli	α	Il 27 febbraio (dopo 5 giorni) dei filamenti di micelio avevano già passato la foglia raggiungendo la superficie libera del decotto. La foglia tolta dall'apparecchio presentava una macchia bruna, rotonda, corrispondente al foro dei tubi (3 e 9), completamente ripieno di micelio. Abbondante precipitazione di ossalato calcico nelle cellule e nell'intercellulari del mesofillo nel punto di passaggio delle ife (fig. 3).
1 marzo	3	idem	α	Soltanto l'8 marzo (dopo 7 giorni) si vedevano dei filamenti miceliali raggiungere la soluzione nutritiva dopo avere attraversato la foglia.
8	6	idem	α	Anche dopo 10 giorni nessun filamento di micelio ha attraversato la foglia.
19	1,5	idem	β	Passaggio delle ife dopo 8 giorni
30	1,5	idem	γ	Anche dopo 12 giorni non vi è accenno di una penetrazione delle ife nella foglia.
12 aprile	1	Decotto di foglie di <i>Agropyrum</i>	—	Resultato come sopra.
25	1	Acqua potabile sterilizzata	—	Resultato come sopra.

L'esame microscopico delle foglie sottoposte alle esperienze simili a quella del 22 febbraio mostra la formazione sull'epidermide superiore di numerose terminazioni coralloidi delle ife disposte sopra la linea di unione di due cellule contigue (fig. 2). In questo stadio non si nota ancora nessuna precipitazione di ossalato. La lamella mediana si rende ben visibile rigonfiandosi. Fissando al sublimato gli organi appressori della *Sclerotinia* e colorando con cloruro d'oro, i nuclei di queste cellule si presentano rossi a differenza dei nuclei delle ife vegetative non secernenti citasi. Questo diverso

comportarsi di fronte allo stesso reagente indica la parte attiva che il nucleo probabilmente prende nell'elaborazione dell'enzima (¹).

Una sezione della foglia, in corrispondenza del punto di passaggio delle ife (fig. 3) mostra la distruzione della lamella mediana, una disorganizza-

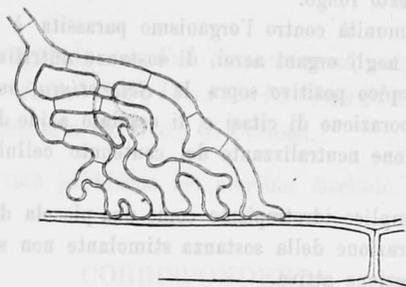


FIG. 2.

zione del citoplasma e dei granuli di clorofilla. Una grande quantità di

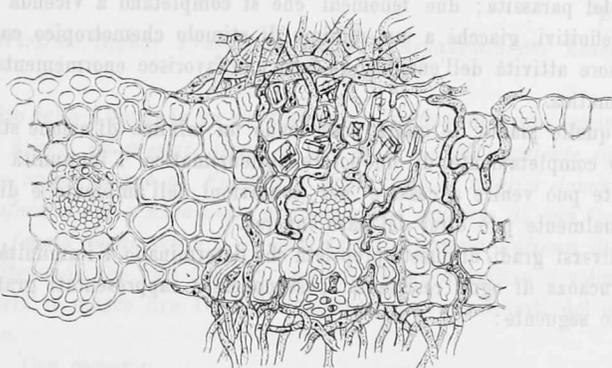


FIG. 3.

grossi cristalli di ossalato calcico sono depositati nell'interno e al di fuori delle cellule necrosate.

(¹) Le molteplici terminazioni coralloidi del micelio disposte quasi regolarmente a palizzata possono essere paragonate, per il loro significato fisiologico, alle cellule di un epitelio secretore. Per questi tessuti più differenziati esistono numerose ricerche, per quanto non sempre concordanti, sul comportamento del nucleo durante la secrezione. Cfr. Torrey J. C., *Cytological changes accompanying the secretion of diastase*. Bull. Torr. Bot. Club, Vol. XXIX, 1902, pag. 421; Reed H. S., *A study of the Enzyme-secreting cells in the Seedlings of Zea Mais*. Ann. of Botany, Vol. 18, pag. 267, 1904.

Le conclusioni che possono trarsi dai risultati qui brevemente esposti sono le seguenti:

1°. Alcune graminacee presentano un'immunità naturale contro la *Sclerotinia Libertiana*, questa immunità non implica quella contro la citasi elaborata da questo fungo.

2°. L'immunità contro l'organismo parassita è basata sopra un minimo contenuto, negli organi aerei, di sostanze nutritive che esercitino uno stimolo chemotropico positivo sopra la *Sclerotinia*, sufficiente a provocare un'adeguata elaborazione di citasi e di ossalato acido di potassio necessario per vincere l'azione neutralizzante del contenuto cellulare della pianta superiore.

3°. Il semplice idrotropismo come una piccola diminuzione dell'optimum di concentrazione della sostanza stimolante non sono capaci di determinare una secrezione attiva.

Nel caso studiato, e probabilmente in molti altri d'immunità naturale contro i microrganismi parassiti, il meccanismo di questa resistenza si basa dunque sopra la concomitanza, nello stesso organo, di un minimo di azione stimolante positiva con un massimo di azione neutralizzante l'attività enzimatica del parassita; due fenomeni che si completano a vicenda nei loro effetti definitivi, giacchè a un minimo di stimolo chemotropico corrisponde una minore attività dell'enzima, un fatto che favorisce enormemente l'azione antienzimatica.

In quelle piante, le quali, possedendo un minimo di azione stimolante, mancano completamente di un potere antienzimatico, l'immunità naturale facilmente può venire a cessare per condizioni dell'ambiente e di cultura.

Eguualmente può dirsi del caso inverso.

I diversi gradi di queste proprietà che determinano l'immunità assoluta e la mancanza di ogni resistenza possono esser rappresentati graficamente nel modo seguente:

$$\frac{N}{S} > 1 \text{ (immunità)} \quad \frac{N}{S} \leq 1 \text{ (immunità relativa o ricettività).}$$

dove N rappresenta l'azione antienzimatica e S lo stimolo chemotropico positivo.

In questo stesso ordine d'idee deve venir considerato il significato biologico della formazione del sughero nelle infezioni dei funghi e batteri nei vegetali superiori. Non è evidentemente la resistenza meccanica o chimica di per se stessa, delle pareti suberificate, quella che può arrestare il cammino del parassita, ma piuttosto è il cambiamento di rapporto che interviene nei due fattori principali della resistenza, e che si verifica nei tessuti posti al di là del sughero. È sufficiente infatti che questo rapporto torni a

variare per cause interne od esterne, perchè nuovamente il parassita sorpassi la barriera che gli era stata opposta.

La struttura istologica in questi fenomeni dell'infezioni parassitarie ha solo un valore molto relativo (1).

Patologia vegetale — *Sul disseccamento delle foglie dell'olivo prodotto dalla Phyllosticta insulana* Mont. Nota di L. PETRI, presentata dal Socio G. CUBONI.

Questa Nota sarà pubblicata nel prossimo fascicolo.

CORRISPONDENZA

Il Presidente BLASERNA annuncia che la signora CLOTILDE SELLA REY gli ha inviato una lettera nella quale dichiara di voler attuare una disposizione testamentaria, benchè incompleta, del suo figlio prof. Alfonso Sella.

Biella Maggio

Illustrissimo Signor Presidente della R. Accademia dei Lincei

Roma

Mio figlio Alfonso in un suo testamento incompleto aveva lasciato scritto:

« Lascio un premio annuo di lire mille a quell'assistente in un laboratorio universitario di Fisica che avrà fatto il miglior lavoro, premio da conferirsi dalla Accademia dei Lincei sul giudizio di una Commissione di cui faccia anche parte il Presidente della Società Italiana di Fisica ».

Ritenendo che tale fosse la sua intenzione definitiva e volendo perciò compierla, le unisco lire 1001 di rendita annua in certificati del consolidato Italiano.

Con ossequio

dev^{ma}

CLOTILDE SELLA REY.

Il PRESIDENTE aggiunge che ha già iniziato le pratiche per dare regolare assetto a questa generosa istituzione, salvo l'approvazione dell'Accademia in adunanza plenaria.

(1) Anche Marshall Ward in una sua importante Memoria intorno al parassitismo delle Uredinee sul *Bromus* così si esprime nelle sue conclusioni: « The capacity for infection, or for resistance to infection, is independent of the anatomical structure of the leaf, and must depend on some other internal factor or factors in the plant ». (Cfr. Marshall Ward H., *On the Question of Predisposition and Immunity in Plants* (Proc. Cambridge Philos. Soc., Vol. 11, 1902, pag. 323).