

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIX.

1912

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXI.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1912

Le « frazioni riunite di coda » vennero recuperate dal bagno elettrolitico con acido solfidrico. Il precipitato fu ossidato con acido nitrico: poi dopo aver scacciato l'acido e aver sciolto il residuo in acido cloridrico, si ricuperò il tellurio con ammoniaca e acido acetico.

N.°	Gr. Te	Gr. Te O ₂	Peso atomico
22	0.8529	1.0666	127.71

Anche il frazionamento elettrolitico ha avuto esito negativo circa la complessità del tellurio.

CONCLUSIONE.

Ripetendo esattamente il metodo di frazionamento di Browning e Flint ho avuto risultati negativi sulla complessità del tellurio, complessità affermata da quegli autori. Così pure il metodo di frazionamento elettrolitico ha dato risultati negativi.

Le mie conclusioni si accordano con quelli di Harcourt e Baker.

Il tellurio possiede natura elementare.

Botanica. — *Ricerche anatomo-fisiologiche sopra le vie acquisite delle piante.* Nota preliminare del dott. L. MONTEMARTINI, presentata dal Socio G. BRIOSI.

Questa Nota sarà pubblicata nel prossimo fascicolo.

Patologia vegetale. — *Attività enzimatiche di alcuni funghi parassiti di frutti* ⁽¹⁾. Nota di DIANA BRUSCHI, presentata dal Socio G. CUBONI.

Ad Hartig (*Zersetzungersch. d. Holzes*, 1878) si debbono le prime osservazioni su enzimi citasici nei funghi parassiti del legno di alberi viventi. La *Sclerotinia libertiana*, secondo de Bary (*Bot. Zeitung*, 1886, pag. 415), secerne una citasi, che scioglie la lamella mediana e distrugge la cellulosa, ed una sostanza tossica di natura enzimatica (non chiaramente dimostrata) che uccide il protoplasma; ambedue agiscono solamente in reazione acida e sono efficacemente aiutate dall'acido ossalico fabbricato dallo stesso fungo. Marshall Ward (*Ann. of Bot.*, II, 1888, pag. 346) ha osservato in una forma di *Botrytis* parassita del giglio la secrezione di un enzima che scioglie la lamella mediana delle pareti cellulari (pectinasi) e perfora le membrane cellulose (citasi o cellulasi).

¹⁾ Ricerche eseguite nella R. Stazione di Patologia vegetale di Roma.

Kissling (Zur Biol. d. *Botrytis cinerea*, Diss., Dresden 1889) ha confermato, quanto alla *Botrytis cinerea*, i dati di de Bary, sebbene non tenga chiaramente distinte l'azione tossica e l'azione disgregatrice. Anche Nordhausen (Jahrb. f. wiss. Bot., XXXIII, 1899, pag. 1) ha ritrovato la secrezione di un veleno enzimatico e di enzimi che hanno ambo le azioni, pectinasi e cellulasi, nella *Botrytis cinerea* e *Peziza sclerotiorum* (cfr. Beauverie, Comptes rendus, CXXXIII, 1901, pag. 107), mentre Behrens (Zeitschr. f. Pflanzenkr., III, 1894, pag. 84) conferma la presenza di enzima pectinasi e cellulasi nella *Botrytis*, ma dimostra (Centr. f. Bakteriolog., [2], IV, 1898, pag. 549) che l'estratto di questo fungo, come pure di *Penicillium luteum*, *Mucor stolonifer* e *Monilia fructigena* è velenoso anche dopo la cottura, contiene cioè un veleno fisso, nè enzimatico, nè volatile. Anche Petri (questi Rendic., [3], XVIII, 1909, I sem., pag. 545) ha trovato un potere citasico e secrezione di ossalato acido di potassio nella *Scler. libertiana*, e questo sale costituisce probabilmente il veleno in questione, ma nessuna produzione di veleni di natura tossinica.

A parte tale lato della questione, concernente l'azione tossica dei funghi parassiti, le ricerche più estese sui loro enzimi si debbono a Behrens. Egli ha trovato in una *Pseudodematophora* isolata da legno marcio di vite (Centr. f. Bakteriolog., [2], II, 1897, pag. 640) cellulasi, amilasi, invertasi, gelatinasi, emulsina: a proposito dei funghi produttori del marciume nelle frutta, ha trovato una vera cellulasi nella sola *Botrytis cinerea* (mentre Miyoshi — Bot. Zeitung, 1894, pag. 1 — aveva osservato che il *Penicillium glaucum* e il *Mucor stolonifer* forano le membrane cellulose per puro sforzo meccanico ⁽¹⁾, in seguito ad un sufficiente stimolo chemotropico), una vivace pectinasi nella *Botrytis*, *M. stolonifer*, *P. luteum*, mentre manca nella *M. fructigena*; un'invertasi in tutti questi funghi, tranne nel *M. stolonifer* ⁽²⁾; un'amilasi (forse una maltasi) in tutti; una proteasi (tripsina e pepsina) in tutti, tranne nella *Monilia* ⁽³⁾; un'emulsina nei *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilia*.

La presenza di citasi (non sempre distinguendo l'azione cellulasi dalla pectinasi) è indicata da Hartig (ved. sopra), Czapek (Ber. botan. Ges., XVII, 1899, pag. 166), Kohnstamm (Beihefte Bot. Centr., X, 1901, pag. 116), Harder (Naturwiss. Zeitschr. f. Land. u. Forstw., VII, 1909, pag. 446) per i funghi parassiti del legno; da Herzberg (Beiträge z. Biol. d. Pilze, V, 1895, pag. 1) per le *Ustilago*, da Biffen (Ann. of Bot., XV, 1901, pag. 127) per la *Bulgaria inquinans*. Schorstein (Centr. f. Bakteriolog., [2], IX, 1902, pag. 436;

⁽¹⁾ Una *Phyllosticta studiata* E. W. Schmidt, Zeitschr. f. Pflanzenkr., XIX, 1909, pag. 102, perfora anche lamelle di celloidina se è stimolata chemotropicamente.

⁽²⁾ Pantanelli invece (Ann. di Bot., III, 1905, pag. 113) si servì di questo fungo per studiare la secrezione di invertasi; Behrens forse si riferisce a culture su frutto.

⁽³⁾ Nel testo di Behrens la *Monilia* è taciuta a questo riguardo.

XVIII, 1907, pag. 402) ritiene di aver trovato nei funghi del legno un enzima che attacca i pentosani; del resto, anche Behrens (1898) ha trovato nella *Mon. fructigena* e nella *Botr. cinerea* un'emulsina che idrolizza la quercitrina, che è un pentoside (del ramnosio). Czapek (1899) indica come *hadromasi* l'enzima che scinde la combinazione eterea della cellulosa con l'*hadromale* e che sotto altro nome era stato già studiato da Hartig e Marzell.

Le ricerche di de Bary, Behrens e Nordhausen sono inquinate dal fatto di avere adoperato senz'altro gli estratti della parte marcia (tuberi, frutti, foglie), in cui si potevano trovare anche i veleni o gli enzimi autoctoni della parte offesa, che probabilmente per le cellule similari sono anche più dannosi o più attivi dei veleni od enzimi secreti dal parassita. Inoltre, tranne la *Botrytis* e la *Monilia*, gli altri funghi studiati da Behrens sono più saprofiti che parassiti. Io invece ho fatto uso di culture pure di tre forme nettamente parassite: *Fusarium niveum*, *F. lycopersici* e *Monilia cinerea*, su substrato artificiale a base di gelatina nutritizia contenente anche estratto dell'organo su cui si doveva fare agire il parassita. Quando il fungo aveva raggiunto un notevole sviluppo e totalmente disciolto il substrato, veniva triturato, con aggiunta di circa 5 volumi di acqua e la poltiglia addizionata di una quantità di timolo appena sufficiente a impedire lo sviluppo di batterii. Dopo due giorni di autolisi a 30° C., una parte della poltiglia era filtrata per porcellana, e nell'estratto limpido, privo di germi, erano immersi pezzi o fettoline del frutto vivente, prelevate con le debite cautele asettiche. Questa prova, conservata in condizioni asettiche a 30° C., serviva per la ricerca di enzimi attivi sulle diverse lamelle della parete cellulare del frutto.

Il resto della poltiglia, non filtrata, veniva diviso in due parti, di cui una veniva mescolata con egual volume di poltiglia del medesimo frutto, l'altra lasciata a sè, e ambedue con aggiunta di timolo poste in autolisi a 30° C., accanto alla poltiglia del frutto egualmente addizionata di timolo (1 cc. di soluzione alcoolica satura per 100 cc.). Prima e dopo l'autolisi fu determinata l'acidità totale; gli zuccheri riduttori, dopo defecazione, secondo il metodo di Allihn, e così gli zuccheri non riduttori per idrolisi con H_2SO_4 $\frac{1}{10}$ norm. a 75° C. per 20 minuti; l'azoto totale secondo Kjeldal-Gunning, l'azoto proteico secondo Barnstein. Dell'azoto totale, che in tali poltiglie acide non ebbe mai a variare, è riportata nelle tabelle la media delle determinazioni fatte prima e dopo l'autolisi.

Tutti i dati si riferiscono a 10 cc. delle poltiglie o miscele.

Fusarium niveum Atk.

La forma da me adoperata è quella isolata dal dott. E. Pantanelli da piantine di cocomero affette da avvizzimento (cfr. Italia Agricola, XLVI, 1909,

pag. 132). Si lascia facilmente coltivare in substrato artificiale: per le seguenti prove fu allevato in bevute da un litro, contenenti ognuna:

Nitrato ammonico	5	gr.
Fosfato monopotassico	2,5	"
Solfato di magnesio cristallizzato	2,5	"
Estratto di 50 gr. di zuccheti maturi	—	
Gelatina	60	"
Acqua di fonte	500	"

Su questa gelatina il *F. niveum* si sviluppa rapidamente a 25°, e in 20 giorni ha totalmente disciolto la gelatina e le albumine dello zucchero. Si lascia sgocciolare completamente il liquido esterno, limpido, giallo-bruno, senza ledere nè sommergere la grossa coperta nivea, ricca di macroconidii e di clamidospore; poi questa si trita, e si opera con la poltiglia come si è detto.

Azione tossica — 20 minuti dopo che le fettoline di zucchero (non ancora maturo) sono immerse nel filtrato sterile, crudo, della poltiglia del micelio (autolizzata), le cellule degli strati esterni hanno il protoplasma coartato e coagulato; il nucleo è ben visibile, rigonfiato, ma irregolare, torbido, coagulato. Aggiungendo una soluzione diluita di bleu di anilina o rosso-congo al liquido fungino, si può constatare che, a mano a mano che questo penetra nel tessuto, provoca la morte dei protoplasti: il processo mortale è completo in 5-10'. Nel medesimo liquido riscaldato a 100° in bagnomaria per 10' si ha la morte di talune cellule superficiali dopo un'ora, ma talune restano in vita fino al terzo giorno, mentre nel liquido crudo tutte le cellule muoiono entro le prime 4-5 ore, anche in tocchetti di 5 mm. di spessore.

Attacco delle pareti cellulari — 16 ore dopo l'immersione nel succo crudo, la polpa di zucchero vivo si lascia facilmente disgregare, e ciò prova che la pectinasi ha cominciato ad agire; il 2° giorno le cellule superficiali del pezzo sono già isolate, e il 3° giorno sono separate le une dalle altre tutte le cellule, anche in pezzi di 1-2 cm. di spessore; la membrana cellulosa (parete propria) è intatta. Anche coltivando il *F. niveum* su zucchero intero, vivo, ove si sviluppa rapidamente a 25° C., ho constatato la rapida disgregazione del tessuto senza attacco della cellulosa.

Il *F. niveum* secerne dunque una *pectinasi* che scioglie le materie pectiche della lamella mediana, ma non fabbrica cellulasi, almeno nelle condizioni delle mie esperienze. Nel liquido fungino cotto la disgregazione del tessuto comincia dopo il 10° giorno, a 25° C.

Enzima proteolitico — Come si vede dall'annessa tabella, in 7 giorni di autolisi a 30° C. nel succo di zucchetto, e molto più ancora nella pol-

In 10 cc.	SUCCO DI ZUCCHETTO			POLTIGLIA DI <i>F. niveum</i>			MISCELA DEI DUE SUCCHI		
	prima l'autolisi	dopo	variaz. %	prima l'autolisi	dopo	variaz. %	prima l'autolisi	dopo	variaz. %
Acidità totale cc. $\frac{1}{10}$ normale	0	0,3	—	1,7	1,7	—	0,85	0,85	—
Zucchero totale mg.	118,8	103,4	- 12,9	39,8	22,4	- 43,7	79,3	54,7	- 31,0
Zucchero facilmente idrolizzabile	21,9	12,6	- 42,4	16,0	7,5	- 53,1	18,9	0	- 100
Zucchero riduttore	96,9	90,8	- 6,3	23,8	14,9	- 37,3	60,4	54,8	- 9,3
Azoto totale	10,10	10,10	—	28,53	28,53	—	19,31	19,31	—
" proteico	6,74	4,88	- 27,6	23,86	13,19	- 44,7	15,30	17,55	+14,7
" non proteico	3,36	5,22	+ 55,3	4,67	15,34	+228,4	4,01	1,76	-56,1

tiglia del micelio di *F. niveum*, si svolse una vivace proteolisi, mentre nel miscuglio delle due poltiglie non solo non si ebbe proteolisi, ma anzi crebbero le sostanze azotate precipitabili con idrato di rame. Fra le molte spiegazioni possibili, si potrebbe anzitutto pensare che uno dei due succhi (quello del fungo?) contenesse una prosintesi, che venisse attivata da una cinasi contenuta nell'altro succo.

Per chiarire questo punto, fu ripetuta l'esperienza facendo agire la poltiglia del micelio su succo di zucchetto riscaldato a 100° in bagnomaria per 10', in modo da annullare i suoi enzimi:

In 10 cc.	SUCCO di zucchetto cotto	POLTIGLIA DI <i>F. niveum</i>			MISCELA DEI DUE SUCCHI		
		prima l'autolisi	dopo	variazioni %	prima l'autolisi	dopo	variazioni %
Azoto totale mg.	12,35	26,50	26,50	—	19,42	19,42	—
" proteico	8,42	22,66	12,26	- 45,8	15,54	15,28	- 1,67
" non proteico	3,93	3,84	14,24	+ 270,8	3,88	4,14	+ 6,70

In questo caso l'azione sintetica non superò l'azione proteolitica; però è manifesto che l'attività dell'enzima proteolitico del fungo subiva un forte impedimento dal succo, pur cotto, dello zucchetto. Si tratta dunque anche di un altro fattore sfavorevole, e si può pensare all'acidità, che nel sugo degli zucchetti era debole o nulla, per cui l'acidità della poltiglia miceliare era ridotta a metà nella miscela. Ripetevi quindi ancora la prova por-

tando con acido malico l'acidità del succo cotto di zucchetto ad egual grado (1,5) della poltiglia del micelio:

In 10 cc.	Succo di zucchetto cotto	POLTIGLIA DI <i>F. niveum</i>			MISCELA DEI DUE SUCCHI		
		prima l'autolisi	dopo	variazioni %	prima l'autolisi	dopo	variazioni %
Azoto totale . . . mg.	11,42	28,73	28,73	—	20,08	20,08	—
" proteico . . "	8,05	23,40	14,75	— 36,9	15,72	13,20	— 16,03
" non proteico "	3,37	5,33	13,98	+ 162,2	4,36	6,88	+ 57,7

Questa volta la proteasi del *Fusarium* potè sviluppare meglio la sua attività, grazie al mantenimento dell'acidità, però non ancora come nella poltiglia del solo micelio. Pur considerando che la proteasi era diluita a metà nella miscela (a tali diluizioni già forti si può ritenere che l'attività proteolitica diminuisca linearmente con la concentrazione), resta ancora una azione ostacolante la proteolisi, quando si mettono a contatto i due succhi, e ciò può essere dovuto ad un'azione reversiva, pallido ricordo dell'attività costruttrice di albumine nel fungo a spese di componenti azotati dello zucchetto, o ad una influenza antiproteolitica di qualche sostanza dello zucchetto.

Resta ad ogni modo il fatto che:

1°) tanto il *F. niveum*, quanto lo zucchetto quasi maturo contengono una proteasi capace di scindere le proprie albumine in autolisi;

2°) mescolando i due succhi la proteolisi è impedita, o mascherata da un'azione sintetica, la quale appare dovuta

a) in parte a cause eliminabili col riscaldamento del succo di zucchetto (cinasi che attiva l'enzima sintetico del fungo? antiproteasi? sostanza volatile antiproteolitica?);

b) in parte a cause che persistono dopo il riscaldamento del succo di zucchetto (diminuzione dell'acidità della poltiglia miceliare a contatto del succo neutro dello zucchetto; sostanze antiproteolitiche (tannino od altri composti aromatici?); prodotti di idrolisi che tendono a condensarsi).

A questo proposito è opportuno ricordare che Cook, Thompson, Bassett e Taubenhaus (*Science*, XXXIII, 1911, pag. 624) hanno stabilito che uno dei mezzi di difesa dei frutti non ancora maturi contro l'invasione dei funghi è la trasformazione ossidativa di sostanze tanniche in polifenoli nocivi per il fungo. Ora, il micelio di *F. niveum* contiene un'energica ossidasi.

Enzimi respiratorii. Gli enzimi respiratorii prevalgono nel *F. niveum*; gli zuccheri furono distrutti in maggior proporzione nella poltiglia del suo micelio che nella miscela dei due succhi; l'acidità per altro rimase invariata, forse perchè anche l'acido fu distrutto. Anche nel succo di zucchetto una piccola parte di zucchero scomparve durante l'autolisi, ma qui l'acidità aumentò leggermente.