

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCX.

1913

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXII.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1913

mediana, di forma un po' angolosa, che si colora con verde d'iodio o con safranina e che io interpreterei come un cristalloide, e da una periferica, la quale assorbe l'orange *g*. Questi grani, in base alla loro natura chimica, alla loro struttura, al loro comportamento sotto l'azione dei reattivi coloranti, ed al loro modo di produzione, si possono considerare come grani d'aleurona. Un fatto simile fu descritto dal Buscalioni ⁽¹⁾ nel sospensore di *Phaseolus multiflorus*.

3°. Il sospensore, soprattutto per mezzo della sua cellula basale, ha perciò, in *Stellaria media*, non solo l'ufficio di assorbire materiale nutritizio per l'embrione, ma anche quello di funzionare come un vero e proprio magazzino di riserva di materiali azotati con struttura di grani d'aleurona, i quali sono ben presto assorbiti dall'embrione insieme con l'organo in cui si sono prodotti.

Patologia vegetale. — *Ancora sull'inquinamento del terreno con sostanze nocive prodotte da funghi parassiti delle piante.*
Nota di E. PANTANELLI, presentata dal Socio G. CUBONI.

Esperienze analoghe a quelle fatte con le culture pure di *Sclerotinia Libertiana*, di cui si parlò nella precedente Nota, furono eseguite nel 1912 adoperando culture di *Fusarium incarnatum*. Questo fungillo era stato isolato da piante di medica gravemente deperite, tolte da un medicajo affetto da « stanchezza ». La regione del colletto di queste piante, che all'esterno non mostravano alcuna traccia di parassiti, era invasa dal micelio di questo fungo, come accade per i piselli ed altre leguminose affette da *Fusarium vasinfectum* (malattia di S. Giovanni).

Il *F. incarnatum* fu coltivato sopra una gelatina nutritizia eguale a quella già adoperata per la *Scl. Libertiana*, solo che invece di estratto di fava fu adoperato estratto di regione del colletto di erba medica. Tale gelatina viene totalmente liquefatta dal *F. incarnatum* in circa due mesi a temperatura della stanza (15-20° C.). Il substrato liquefatto è allora del tutto simile a quello di *Scl. Libertiana*, ma molto più alcalino (fino a 15 cc. di H₂SO₄ ¹/₁₀ norm. per 100 cc.) e puzza fortemente di amine. Anche il succo miceliare è nettamente alcalino. Per uccidere i conidii e le clamidospore, questo succo fu tenuto in autolisi con cloroformio per 5 giorni, e si dovette poi allontanare il cloroformio su bagnomaria a 40°. I semi germinavano su carta bibula. Riporto alcune prove fra le meglio riuscite:

⁽¹⁾ Luigi Buscalioni, *Contribuzione allo studio della membrana cellulare*. Malpighia, anno VI, vol. VI, 1892

	LUPINELLA		TRIFOGLIO		MEDICA		GINESTRINO	
	Sem.	Germ.	Sem.	Germ.	Sem.	Germ.	Sem.	Germ.
A. Controllo	100	85	200	149	200	138	250	166
B. Succo miceliare (alcalino), crudo	"	75	"	0	—	—	—	—
C. Succo miceliare neutraliz- zato, crudo	"	80	"	99	"	113	"	42
D. Succo miceliare neutraliz- zato, riscaldato	"	78	"	108	"	105	"	46
E. Estratto del residuo miche- liare ⁽¹⁾ , neutr., crudo	"	66	"	45	—	—	—	—
F. Liquido culturale neutraliz- zato, crudo	"	66	"	60	"	46	"	34
G. Liquido culturale neutraliz- zato, riscaldato	"	57	"	73	"	70	"	32

Il succo miceliare naturale, alcalino, fu esiziale al trifoglio, mentre la lupinella (*Onobrychis sativa*) ne soffrì poco; con la neutralizzazione perdettero molto della sua tossicità. Il riscaldamento lo rese anche meno nocivo per il trifoglio, mentre la medica tollerava meglio il succo crudo (cf. esp. preced.); per il ginestrino e la lupinella aveva la medesima tossicità prima e dopo il riscaldamento. La polpa residuale conteneva ancora materie nocive, che furono estratte dall'ammoniaca diluita. Infine il liquido culturale aveva un potere tossico molto più elevato del succo miceliare; il riscaldamento lo diminuì leggermente per il trifoglio e la medica, lo aumentò per la lupinella.

Esperienze analoghe furono fatte con semi fatti germinare in pozzolana sterile, di lupinella, ceci, trifoglio e medica; i risultati furono sempre concordi quanto alla tossicità relativa dei preparati.

Nel corso di queste prove si osservarono alcuni altri fatti interessanti.

I liquidi culturali di *Fus. incarnatum* acquistano continuamente in tossicità con l'invecchiare della cultura, mentre la tossicità del micelio diminuisce continuamente. Nei primitivi tempi il fungo elabora anche sostanze velenose distruggibili col riscaldamento, le quali poi più tardi tendono a scomparire ed anzi le sostanze distruggibili col calore tolte alle vecchie culture (4-5 mesi) hanno piuttosto un effetto stimolante (o antitossico?) sui semi delle piante ospiti.

La mancata germinazione in presenza di questi liquidi tossici è dovuta solo in parte a soppressione della potenza germinativa; se si lavano accu-

(¹) Dopo spremuto il succo, la polpa residuale del micelio fu estratta con egual peso di ammoniaca all'1 %.

ratamente i semi alla fine dell'esperienza e si pongono a germinare in altre camere sterili con acqua pura, una parte di essi germina. Questi preparati di tossici fungini hanno quindi una duplice azione sui semi delle piante ospiti, in parte agiscono come veri veleni, in quanto tolgono al plasma germinale la facoltà di crescere o addirittura l'uccidono, in parte invece si comportano come inibitori esterni della germinazione. L'analisi di queste azioni è riserbata ad ulteriori esperienze.

Si osservò ancora, che i semi immersi anche per poche ore nel liquido culturale crudo di *Fus. incarnatum* subiscono una tale alterazione, che pur lavandoli accuratamente e mettendoli in camere umide pulite (non sterili) diventano facile preda di muffe banali, pur germinando in proporzione normale. Anche questo fatto ha importanza per spiegare certi casi di attacco di piante in natura da parte di fungilli che il patologo esita a considerare come parassiti.

Infine fu tentato lo studio della natura delle sostanze nocive elaborate dal *Fus. incarnatum*, adoperando i liquidi esterni di culture di due e quattro mesi. Una parte fu precipitata con alcool al 70 % e ridisciolta in acqua fino ad $\frac{1}{5}$ del volume primitivo (*a*). Un'altra porzione fu precipitata con acqua limpida di calce, ma dette scarsissimo precipitato: scarsenza di acido ossalico. Il precipitato fu raccolto, ridisciolto in HCl diluito, fino a reazione debolmente acida, e riportato ad $\frac{1}{5}$ del volume primitivo (*b*). Una terza porzione fu distillata in presenza di un lieve eccesso di soda caustica (ammoniaca e basi volatili), il distillato fu raccolto in H_2SO_4 $\frac{1}{10}$ norm., aggiunto a grado a grado in modo che il distillato rimase sempre leggermente acido, e fu riportato al volume primitivo (*c*). Il residuo della distillazione (veleni fissi) fu riportato al volume primitivo (*d*).

Infine la maggior porzione fu manipolata secondo il classico metodo di Brieger (1885), ossia fu leggermente acidificata con HCl e concentrata su b. m. fino a consistenza sciropposa, indi estratta con alcool assoluto, in cui si sciolse quasi completamente. Scacciato l'alcool, il residuo fu ridisciolto in acqua fino al volume primitivo (*e*). Tutti questi preparati furono fatti agire nel modo solito. Es.:

	LUPINELLA			TRIFOGLIO		
	Seminati	Germinati	Germinati	Seminati	Germinati	Germinati
	(4 mesi)	(2 mesi)	(2 mesi)	(4 mesi)	(2 mesi)	(2 mesi)
Controllo	100	82	82	150	100	100
<i>a</i> (precipitato alcoolico)	"	80	74	"	81	66
<i>b</i> (precipitato $Ca(OH)_2$)	"	59	36	"	67	49
<i>c</i> (distillato)	"	5	68	"	0	56
<i>d</i> (residuo d. distillazione)	"	0	32	"	0	29
<i>e</i> (basi salificate)	"	0	1	"	0	2

Le sostanze velenose precipitate con l'alcool (vere tossine di natura albuminale o nucleoproteica) compaiono nel liquido culturale (forse sono in parte prodotti della fluidificazione della gelatina), ma diminuiscono con l'età della cultura e lo stesso avviene per gli acidi (essenzialmente acido ossalico) precipitabili con acqua di calce. Invece aumentano i veleni volatili, specialmente quelli di natura aminica, ed anche i veleni fissi. Con l'invecchiamento della cultura pare invece che la massa principale di questi veleni sia costituita da basi azotate, che formano cloridrati solubilissimi.

Siccome l'accumulo di questi composti avviene dopo la morte del micelio, essi debbono la loro origine a scomposizioni enzimatiche postmortali, le quali pare che tendano a dare basi sempre più velenose di quelle che aveva

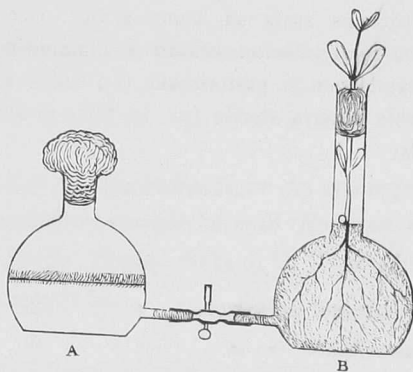


FIG. 1.

emesso il fungo in vita. D'altra parte con la morte di questo scompaiono le materie nocive di natura complessa e si potrebbe ritenere che le basi velenose accumulate nel substrato fossero in parte preformate nelle molecole del composto proteico tossico e che se ne liberino poi lentamente per idrolisi.

Sono tutte questioni che meritano di essere studiate con precisione; un vasto campo si apre qui anche per la chimica descrittiva ⁽¹⁾.

Resta intanto provato, che anche il *Fus. incarnatum* elabora composti tossici di varia natura, fra cui in ultima analisi predominano basi azotate volatili e fisse, le quali impediscono la germinazione dei semi e offendono le radici di varie leguminose.

Restava a sapersi, se questi funghi producono effetti simili anche lasciando che i loro prodotti diffondano naturalmente nel terreno. A questo scopo servirono due dispositivi. Il primo metodo, come indica la figura 1,

⁽¹⁾ Talune ricerche a questo proposito si debbono a Zellner, Anz. Wien. Akad., 1911; cfr. anche la ricca letteratura sui veleni dell'*Asp. fumigatus*, delle muffe del mais guasto, della segala cornuta, del *Lolium temulentum*, etc.

consiste nel mettere in comunicazione la gelatina culturale del fungo (pallone *A*), dopo la fluidificazione, con la sabbia (pozzolana) sterile in cui è allevata la pianta (pallone *B*). Siccome il micelio sta in superficie, non vi è pericolo che passino conidii del fungo da *A* in *B*, tanto più che i tubuli di congiunzione (*a* e *b*) sono ostruiti da ovatta. L'esperienza ha mostrato che dopo avere aperta la comunicazione solamente i componenti del substrato liquefatto di *A* diffondono in *B*, producendo rapidamente la morte della pianta. Ciò è stato osservato con *Fusarium niveum* su cocomero, *Sclerotinia Libertiana* su fava, *Fusarium incarnatum* su lupinella.

Il metodo è elegante, ma ingombrante e assai lungo. Il secondo metodo più semplice, ma più esposto ad inquinamenti, consiste nel seppellire una cultura del fungo su agar, entro grandi scatole Koch, con uno strato di 2 cm. di terra umida sterilizzata. Alcune scatole si pastorizzano poi in toto tenendole per 3 ore entro una stufa ad acqua a 50°. Occorre assicurarsi con l'esame microscopico se il micelio, conidii e clamidospore del fungo sono morti (*c*). Altre scatole non si pastorizzano (*b*); infine altre ancora portano solamente agar sterile e terra sterile (*a*). In tutte si gettano semi preparati nel solito modo. Es.

	LUPINELLA		TRIFOGLIO	
	Seminate	Sviluppate	Seminate	Sviluppate
<i>a</i>) Controllo	100	82	250	248
<i>b</i>) <i>Fus. incarn.</i> vivente nel sottosuolo	"	2	"	31
<i>c</i>) " " pastorizzato " "	"	9	"	22

Le radici delle piante seminate nel terreno infetto da *Fusarium* vivente erano amputate a 1 o 2 mm. dal seme e le piante ancora vive resistevano grazie alla produzione di radici avventizie dal fusto. Invece nelle culture con *Fusarium* pastorizzato le radici erano arrestate nello sviluppo ed imbrunite alla punta, ma non amputate e mancava la produzione di radici avventizie.

L'esame del materiale fissato in liquido di Carnoy mostrò la presenza di ife fungine nella superficie di amputazione delle radici delle prime piantine, ma nelle scatole pastorizzate non si trovò traccia d'infezione e i tentativi di isolamento del *Fusarium* dalla terra e dall'agar sottostante non dettero risultato.

I risultati di questo metodo collimano con quelli delle culture accoppiate, per cui emerge già da queste prime esperienze che *dal micelio di questi funghi o dal loro substrato, che in condizioni naturali sarebbe la parte di pianta attaccata, si possono spargere per la terra circostante sostanze nocive che arrestano l'accrescimento delle radici o addirittura la germinazione dei semi di piante similari.*