

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCXCIV.

1897

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME VI.

1° SEMESTRE



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1897

Di esso mi limito soltanto a notare che si lascia difficilmente intaccare dal sodio. Io ne sciolsi gr. 10 in cc. 70 di toluene, vi aggiunsi gr. 1,50 di sodio in fili sottili e lasciai bollire a ricadere per cinque ore, per cercare di ottenere la scissione in canfora, non ancora dimostrata da Beckmann.

Quasi tutto il sodio rimase inalterato, le acque di lavaggio acidificate diedero uno scarso intorbidamento, e dalla soluzione toluica, scacciato a vapor d'acqua il solvente, rimase una sostanza bianca che cristallizzata dall'alcool fuse a 156°. Questa grande inerzia segna una notevole differenza tra i composti in cui il legame tra due molecole di canfora si stabilisce nel posto $\alpha\alpha$ e i due ossigeni stanno in posizione 1:2, e quelli della serie dicanforica in cui il legame è nel posto $\beta\beta$ e i due ossigeni stanno in posizione 1:4.

Patologia vegetale. — *La Bacteriosi del Sedano* (*). Nota del dott. UGO BRIZI presentata dal Corrispondente R. PIROTTA (†).

Nella primavera dello scorso anno, da diversi luoghi dell'Alta Italia, specialmente della bassa valle del Po (Ferrara-Rovigo), vennero spediti alla R. Stazione di Patologia vegetale molti campioni di piante del comune Sedano (*Apium graveolens*), affette da una singolare malattia.

La base dei larghi picciuoli delle foglie, e specialmente quella porzione la quale, essendo ricoperta per un certo tempo di terra rimane scolorata, ed anche la porzione verde fino ad una certa altezza presentavano delle macchioline di color giallo il quale ben presto assumeva una tinta rossastro-rugginosa. In corrispondenza delle macchioline i tessuti apparivano avvallati e sprofondati, e l'ulceretta così formatasi ingrandendo rapidamente e scavando per così dire i sottoposti tessuti, finiva col formare delle larghe chiazze rossastre, orlate da un'aureola livida jalina, le quali chiazze si estendevano per tutta la superficie, specialmente esterna, del picciuolo stesso.

I picciuoli così colpiti ed anche le stesse foglie, finivano ben presto col cadere in putrefazione assumendo, prima di trasformarsi in una massa putrida, un aspetto paragonabile a quello che prendono i tessuti molto ricchi di acqua (piante grasse), quando vengono fortemente contusi o scottati coll'acqua bollente.

Lasciando i picciuoli colle ulcerette in via di sviluppo in camera umida per 18-24 ore, la superficie delle ulcerette apparisce velata da uno straterello di liquido torbido giallastro e vischioso, il quale velo, dopo 36-48 ore, prende

(*) Lavoro eseguito nella R. Stazione di Patologia vegetale di Roma. Dicembre 1896.

(†) Presentata nella seduta del 7 marzo 1897.

l'aspetto di una grossa goccia mucilagginosa la quale è costituita da zooglee di bacilli tenuti insieme da un muco giallastro.

Esaminando al microscopio una ulceretta non molto avanzata, si riconosce, dopo attento esame, la presenza di innumerevoli bacilli grossi ($2-2\frac{1}{2}\mu$), fortemente rifrangenti, diritti, leggermente attenuati all'estremità, mobilissimi, che occupano totalmente gli elementi dei tessuti invasi, persino talvolta le cellule del collenchima e gli elementi dei cordoni vascolari.

Le cellule ripiene di milioni di questi bacilli naturalmente vengono uccise, i contenuti scompaiono cedendo il posto alle zooglee di bacilli, la membrana dapprima ingiallisce, poi imbrunisce; gli elementi stessi, specialmente dei parenchimi, perdono il loro turgore dando origine alla depressione ulcerativa caratteristica; finalmente la lamella mediana si discioglie e gli elementi si separano trasformando i tessuti colpiti in una massa putrescente.

Nel principio della infezione, quando cioè le pustole sono piccole non ancora molto affondate nei tessuti, ma che interessano appena l'epidermide, è facile notare come esse abbiano origine e sede sempre nei tessuti molli interposti fra i grossi cordoni collenchimatici, rilevati, che costituiscono le costole ben visibili sulla porzione esteriore dei grossi picciuoli delle foglie.

Nei punti infetti l'epidermide scompare ben presto e intorno ad essi si solleva e si distacca dal sottostante parenchima, e finisce col cadere lasciando spesso i cordoncini collenchimatosi ipodermici allo scoperto per un certo tratto. L'ulceretta si approfondisce così, corrodendo, per così dire, i tessuti intorno ai cordoncini ipodermici, e di lì si distribuiscono nel parenchima corticale dei piccoli focolai d'infezione i quali si raggruppano per solito presso i canali escretori, frequenti come è noto al disotto dei cordoni ipodermici e nella massa stessa del parenchima; i canali stessi sono spesso infarciti di mucilaggine contenente milioni di batteri. Poco dopo vengono invasi anche i cordoncini ipodermici, nei quali alcuni elementi cominciano ad ingiallire riempiendosi di mucilaggine e di bacilli, e ben presto l'intero cordone di collenchima è totalmente invaso e finisce col putrefare. Più tardi i bacilli invadono gli stessi cordoni vascolari, attraverso i quali l'infezione si diffonde rapidamente lungo il picciuolo.

La porzione floematica del fascio resta lungo tempo immune, e tale si rinviene anche in qualche caso in cui vengano distrutti, quasi interamente, il parenchima corticale in corrispondenza del fascio, la zona cambiale cogli elementi imbruniti e pieni di batteri, il midollo, seminato di focolai d'infezione, e infine persino le trachee.

Infatti, sezionando un cordone vascolare un po' al disotto di una ulceretta e trattando opportunamente la sezione nel modo che ora dirò, si riesce a scorgere nel fascio le localizzazioni dei grossi batteri, i quali occupano totalmente il parenchima fondamentale, il lume delle trachee, il midollo, la zona cambiale e rispettando il cordone di collenchima e i tubi cribrosi.

Questa localizzazione, beninteso, si presenta all' inizio della diffusione, e specialmente nei tessuti limitrofi alle ulcere; quando poi queste ultime sono molto depresse ed estese, come avviene quando il picciuolo, tenuto più giorni in camera umida, sta per putrefarsi interamente, allora non è più il caso di parlare di localizzazioni giacchè i bacilli si riscontrano anche nelle porzioni floematiche dei fasci che vengono anzi distrutti insieme ai tessuti circostanti, formando delle grandi cavità lisigeniche.

Nelle porzioni di picciuolo fortemente infette ma non ancora totalmente decomposte, sono assai interessanti ed istruttive le preparazioni che permettono di mostrare i rapporti tra il bacillo e i tessuti dell' ospite, preparazioni non molto facili ad eseguirsi perchè i tessuti alterati sono estremamente molli, sia per la quantità d' acqua che contengono, sia perchè in via di putrefazione. Le porzioni di tessuti infetti non si possono indurire e fissare coll' alcool assoluto, perchè esso per la rapida sottrazione dell' acqua contrae e deforma gli elementi ed i contenuti, compresi i batteri, in guisa che essi divengono irricognoscibili.

L' indurimento dei tessuti da sezionare si ottiene invece lasciando i frammenti per 48 ore in un liquido costituito da 100 parti di acqua distillata, alla quale si aggiunge una parte d' acido acetico glaciale e una parte d' acido cromatico; il frammento così trattato, dopo circa 48 ore, si può mettere nell' alcool a 70° e quindi nell' alcool assoluto per completare l' indurimento.

I pezzi induriti si lasciano quindi imbevvere di una soluzione di paraffina nel cloroformio, per circa 24 ore in recipiente chiuso; si versa quindi la soluzione di paraffina in un piccolo recipiente o in una scatola di carta, ponendovi i frammenti di tessuto e lasciando essiccare all' aria. I tessuti così inclusi si sezionano ottimamente a mano o con un piccolo microtomo.

Si ottengono poi eccellenti colorazioni doppie per mettere in evidenza i bacilli nelle sezioni dei tessuti col metodo seguente: liberati i tagli dalla paraffina tenendoli pochi minuti nel cloroformio agitandoli continuamente, si lavano a lungo con acqua distillata calda, s' immergono in una soluzione acquosa all' 1‰ di verde di metile, e si lasciano ivi per circa tre o quattro ore, dopo il qual tempo si passano in acqua distillata acidulata con acido idroclorico; con tale trattamento i bacilli colorati in verde non si scolorano nell' acqua acidulata, mentre il tessuto fondamentale, le membrane e i contenuti cellulari si decolorano totalmente; si trasporta allora la preparazione, decolorata al punto giusto, in una soluzione acquosa di picro-carminio, nella quale si lasciano le preparazioni per circa un' ora, poi si lavano, si disidratano, si impregnano coll' olio di garofano e si montano in balsamo. In tal modo nelle preparazioni ben riuscite i bacilli colorati in verde spiccano sul fondo rosso dei contenuti protoplasmatici delle cellule e roseo delle membrane. Una buona colorazione pure caratteristica, si ottiene col violetto di genziana all' acido acetico (acqua p. 100, acido acetico p. 10, soluzione alcoolica satura di vio-

letto di genziana p. 20). Trattate le sezioni colla soluzione colorante per circa un'ora, si passano in alcool forte al quale si aggiungono alcune gocce di ipoclorito di soda. In tal modo i tessuti si decolorano totalmente ed i soli bacteri restano colorati in violetto; a questo punto poi si può immergere per alcune ore la preparazione in una soluzione di eosina, la quale dà una colorazione rosea al fondo, colorazione che permane anche dopo l'imprugnazione in olio di garofano e la montatura in balsamo.

..

Nelle foglie le porzioni infette mostrano una tinta livida come se la lamina fosse stata in quel punto scottata con acqua bollente; in principio dell'infezione, in corrispondenza delle macchioline livide, gli elementi del mesofillo si appiattiscono alquanto, mentre le pareti cominciano ad imbrunire; si possono allora constatare nelle cavità delle cellule e negli spazi intercellulari numerosi bacilli, i quali formano delle piccole zooglee avvolte in mucio giallastro, producendo la decomposizione della massa plasmatica e la disorganizzazione dei cloroplasti i quali diventano bruni e sono addirittura distrutti.

Distrutti i cloroplasti la parete persiste, ma la cellula verde a questo punto è diventata bruna e si mostra ripiena in gran parte e qualche volta in totalità di mucilagginne ricca di bacilli. La preparazione delle sezioni delle foglie infette è assai difficile per la estrema mollezza dei tessuti, i quali non resistono alla fissazione necessaria per la preparazione dei bacilli, e non permettono neppure di seguire i metodi più sopra descritti per i piccioli.

Si possono però ottenere delle preparazioni mediocri, ma sufficienti allo scopo, sezionando all'asciutto e senza alcun trattamento preventivo molti frammenti di foglie in principio d'infezione, avendo cura di scegliere per la sezione i punti immediatamente vicini all'aureola livida delle macchioline che segnano il principio della infezione; le sezioni, che sarà più facile ottenere sovrapponendo molti frammenti di foglie, si collocano sopra un vetrino coprioggetti e si lasciano all'aria finchè siano un po' asciugate, ma non già totalmente disseccate; si pone quindi il vetrino colle sezioni aderenti volte all'ingù sopra una boccetta aperta contenente una soluzione (10%) di acido osmico, i vapori del quale in pochi minuti fissano ottimamente i bacteri.

Le preparazioni così fissate si possono colorire nel modo descritto più sopra ed ottenerne anche delle colorazioni doppie.

L'infezione della lamina fogliare non è primaria, ma avviene secondariamente attraverso il tessuto conduttore dei piccioli nei quali sembra abbia esclusiva sede ed origine l'infezione; infatti la lamina non viene mai direttamente infetta, ma viene colpita quando il picciolo è esso stesso fortemente infetto.

La ricerca microscopica dà ragione di questo fatto, perchè i bacilli percorrono le trachee dei fasci conduttori più rapidamente che non gli altri tessuti, e penetrano nella foglia per mezzo delle trachee delle nervature attraverso le quali passano nel mesofillo, fatto che è assai facile constatare giacchè la infezione sulle foglie, anzichè cominciare dall'epidermide, principia invece sempre intorno alla nervatura dalla quale si irradia e solo tardi, quando già il mosofillo è molto infetto ed in via di decomposizione, vengono attaccate le epidermidi.

Il bacillo, il quale non ha finora un nome e che provvisoriamente chiamerò *Bacterium Apii*, si coltiva facilmente in diversi mezzi nutritivi. Sulla gelatina di brodo di vitello peptonizzata col 10% di gelatina cresce bene ad una temperatura di 20 — 22°; le colonie, che appaiono sulle piastre dopo 18—24 ore, sono bellissime e caratteristiche giacchè dopo cinque o sei giorni diventano grosse, rilevate, a forma di mezza sfera, jaline, trasparenti, perfettamente simili in apparenza a grosse e brillanti gocce di glicerina, che crescono in superficie senza affondare nel substrato, e per conseguenza senza fondere la gelatina.

Nelle culture a striscia a superficie inclinata nei tubi, le colonie si fondono in una sola striscia a contorno ondulato e di aspetto simile a quello delle colonie isolate; nelle culture per infissione in tubo, le colonie si sviluppano soltanto alla superficie ed abbastanza rapidamente, mai nell'interno del canale d'infissione, il che dimostra che il bacillo è perfettamente aerobio.

Nelle fette di patate e sulle patate in tubo, le colonie si sviluppano lentamente, restano piccole ed acquistano presto una tinta gialliccia; nel brodo di carne peptonizzato, con agar-agar, le colonie crescono assai stentatamente, restano piccole, puntiformi e non raggiungono mai le dimensioni (5-7 millimetri di diametro) che raggiungono sulla gelatina. Nel mosto d'uva al 10% gelatinizzato non si sviluppano mai.

I bacilli ottenuti dalle culture pure si colorano più difficilmente cogli stessi metodi impiegati per i tessuti, perchè sono avvolti in abbondantissima mucillaggine che impedisce la colorazione. Per ottenere delle buone preparazioni, si stempera una porzione della colonia in acqua distillata tiepida. Si fissano i bacilli alla fiamma e il vetrino copri-oggetto si lascia nuotare per qualche tempo in una soluzione di bleu di anilina, e dopo una rapida lavatura in alcool assoluto si lascia asciugare all'aria. Quando è ben disseccato s'immerge in una soluzione di corallina sodica (40%), la quale rispetta la colorazione dei bacilli che rende anzi assai più intensa, e colora in roseo il fondo mucillaginoso.

Le colonie, lasciate a sè medesime, dopo un certo tempo s'intorbidano, si fanno gialliccie ma senza fondere mai in nessun caso la gelatina.

La malattia batteriologica ora descritta, la quale ha qualche somiglianza con quella citata da Russell (*Bacteria in their relation of vegetable tissue in Hosp. rep. of Baltimore* III, 1893) e descritta da Halsted, ha menata una vera strage nelle coltivazioni dei sedani, e tale malattia, se non è del tutto nuova, certo non era stata mai finora osservata nè descritta in Italia.

P. B.
