39. Antonio TONOLO. — **Colture artificiali di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. — I. Infezione e produzione di sclerozi su piante di cereali cresciute in ambiente sterile.** (*)

Riassunto. — 1) E' descritta la produzione di sclerozi in piantine di segala, grano e mais, coltivate in condizioni sterili e controllate di crescita.

2) La percentuale di infezione tra differenti specie e varietà di cereali può essere influenzata:

a) dalla ricettività naturale dell'ospite;

b) dalla virulenza del ceppo;

c) dalle condizioni nutrizionali di crescita della pianta;

d) dalla tecnica di inoculo.

3) Vengono descritti tre diversi tipi di infezione in relazione allo stato di sviluppo della pianta ed alla formazione degli organi riproduttivi del fungo:

I. Tipo A - Infezione embrionale o forte.

II. Tipo B - Infezione coleoptilare o media.

III. Tipo C - Infezione foliare o debole.

Le percentuali relative dei vari gruppi sono in relazione alla recettività della varietà o specie di cereale o alla virulenza del ceppo.

4) Gli sclerozi possono formarsi sull'embrione, sul germinello, sul culmo e sulle foglie.

5) La formazione degli sclerozi nell'embrione avviene per un progressivo ingrossamento ed avvicinamento delle ife. Queste presentano setti più ravvicinati (6-12 μ) e un particolare metabolismo lipidico. Inoltre non si osserva la formazione di conidi o stadi di melata; si nota invece una particolare formazione di conidi o artrospore più grandi 5-7 × 7-10 μ, che potrebbero essere interpretati come cellule scleroziali immature.

Sulle parti aeree della pianta si formano sclerozi di due tipi: esterni, che si formano sulla foglia o sul culmo, a struttura regolare con formazione di conidi aventi dimensioni uguali a quelle della *Sphaecelia segetum* Lev.; sclerozi interni, che si formano lungo i fasci fibrovascolari o in lacune interne di vari parenchimi.

6) Si fa l'ipotesi che nell'embrione la sostanza (o le sostanze) specificamente responsabili per la formazione dello sclerozio scompaiono in seguito al metabolismo dell'embrione durante la germinazione.

(*) Questo lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 386 (1959).

Summary. — 1) The production of sclerotia in rye and wheat cultivated in sterile, controlled conditions is described.

2) The percentage of infection among different species and varieties of cereals may be influenced by:

a) the natural susceptibility of the host;

b) the virulence of the strain;

c) the nutritional condition of the plant growth;

d) the inoculation technique employed.

3) Three different types of infection are recognized depending upon the development stage of the plant and the formation of the reproductive organs of the fungus:

I. Type A - Embryo = Severe infection

II. Type B - Seedling = Average infection

III. Type C - Leaf = Weak infection.

The percentage in each of the three types varies in relation to the susceptibility of the host, the virulence of the strain and the composition of the nutrient media.

4) Sclerotia may be produced on the embryo, the seedling, the stem and the leaves.

5) On the embryo the sclerotia are formed by a progressive packing of closely spaced (at 6-12 μ intervals) hyphae, containing fat droplets. The formation of conidia (honey-dew is not observed; instead a particular formation of arthrospores (5-7 × 7-10 μ) is noted.

On the aerial part of the plant the sclerotia have the same structure as those produced on the embryo, but the conidial stage (Sphaecelia segetum Lev.) precedes sclerotium formation. Sclerotia are formed also in the fibrovascular bundles.

6) The hypothesis is made made that in the embryo the substance (or substances) specifically responsible for sclerotium formation disappear by the metabolism of the embryo during germination.

I - INTRODUZIONE

La *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. è considerata un fungo specializzato nell'attacco degli organi fiorali femminili di Graminacee ([1, 2, 3]). Il suo ciclo biologico, in natura, si svolge quindi solo su particolari organi ve-

getali dove, inoltre, può formare gli sclerozi ([4]). Tale specificità della *Claviceps* è ben nota su diversi generi e specie di Graminacee ospiti ([5, 6]). Sono stati ottenuti sclerozi in parti diverse dal fiore ([7]); tuttavia tale fatto viene interpretato ([1]) come una infezione traumatica di iniziali di infiorescenze secondarie dormenti. Cherewick ([8]) suppone invece che il fungo possa svilupparsi in qualsiasi parte della pianta, ipotesi che è stata in seguito confermata da Lewis ([9]). Quest'ultimo autore è riuscito, infatti, ad infettare i germinelli di alcune varietà di segala in condizioni artificiali di sviluppo, ottenendo formazione di micelio, conidi e sclerozi. Sembrerebbe quindi che la capacità di formare sclerozi non sia un fenomeno correlato a condizioni particolari di nutrizione che il fungo trova in un organo specifico — ovario — o particolari abbozzi fiorali del culmo.

La maggior parte degli studi fatti su questo argomento riguardano il ciclo biologico della *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. sulle piante ospiti ([10, 11, 12, 13]).

Come è noto l'infezione inizia con la penetrazione e lo sviluppo delle ife nei tessuti dell'ovario; segue la produzione di una grande quantità di conidi (*Sphaecelia segutum* Lev.) e la formazione dello sclerozio, che si origina per un progressivo ingrossamento e addensamento delle ife. Le cellule che costituiscono lo sclerozio perdono la loro forma originaria allungata o globiforme, assumendo quella isodiametrica o poligonale.

La formazione dello sclerozio inizia alla base delle glumette e le cellule scleroziali si diferenziano particolarmente dalle ife vegetative per il loro contenuto in goccioline di grasso.

Con le stesse modalità avverrebbe anche la formazione istologica dello sclerozio su culmi di segala ([12]).

Forme scleroziali o pseudo-scleroziali sono state descritte anche in colture artificiali su terreni nutritivi ([11, 14, 15, 16, 17, 18]) o in tessuti embrionali sterilizzati con tecniche particolari ([19]) e, più recentemente, anche in coltura sommersa ([20]).

L'interpretazione delle forme scleroziali ottenute in colture artificiali del fungo sono piuttosto discordanti. Mentre infatti per alcuni autori i pseudo-parenchimi ottenuti in coltura artificiale sarebbero dei veri e propri sclerozi, per altri tali forme sarebbero interpretate come addensamenti irregolari di ife, o forme immature di veri sclerozi.

E' sembrato quindi interessante approfondire le ricerche morfologiche sulla formazione di sclerozi in piantine cresciute sterilmente in un terreno nutritivo ed in condizioni controllate di nutrizione e di crescita. Tale metodo permette inoltre di seguire con maggiore facilità i primi sta-

di dell'infezione, la diffusione del micelio nei tessuti della pianta ospite, la resistenza di diverse varietà di cereali alla malattia, la virulenza di vari ceppi di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., e la biosintesi degli alcaloidi.

II - TECNICHE E METODI

a) *Specie e varietà di cereali.*

Sono state impiegate le seguenti specie e varietà di cereali:

Secale cereale L.: varietà Rosen 2n e Rosen 4n (ricevute dal Prof. Lewis del Michigan State University of Agriculture and Applied Science, East Lansing, Michigan, USA). Stirpe 18: (ricevuta dalla Stazione Agraria Sperimentale di San Michele, Alto Adige).

Triticum vulgare Vill.: varietà Damiano (ricevuta dalla Stazione di Patologia Vegetale di Roma).

Zea mais L.: ibridi Wisconsin 355, Wisconsin 641 AA, USA 13 (ricevuti dalla Stazione di Genetica e Cerealicoltura di Roma).

b) *Ceppi di Claviceps.*

Per le prove di infezione si sono adoperate diverse specie e ceppi di *Claviceps* e precisamente:

Ceppo F-1: *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. da *Secale cereale* L. (12-5-1955) raccolta dal Prof. Grasso, della Stazione di Patologia Vegetale di di Roma;

Ceppo F-6/1: *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. da *Triticum vulgare* Vill. varietà Damiano (15-3-1956) raccolta dal Prof. Grasso;

Ceppo F-8/1: *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. da *Secale cereale* L. (15 novembre 1956);

Ceppo F-86/1: *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. da *Cynodon Dactylon* (15 novembre 1956);

Ceppo F-99: *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. da *Secale cereale* L. (2-12-1956);

Ceppo F-122: *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. da *Secale cereale* L. (1950) inviata dal Prof. Lewis (il ceppo originale aveva la sigla Cp-8);

Ceppo F-97: *Claviceps paspali* Stewens et Holl da *Paspalum disticum* (12-12-1956);

Ceppo F-114: *Claviceps litoralis* Kawatani: da sclerozi inviati dal Prof. Kawatani (12-12-1956).

I ceppi di *Claviceps* sono stati isolati direttamente dagli sclerozi disinfettati in superficie, o per diluizione dei conidi ottenuti dal lavaggio della superficie dello sclerozio stesso.

c) *Disinfezioni delle cariossidi.*

Le cariossidi sono disinfettate mediante lavaggio in soluzione satura di ipoclorito di calcio ($Ca(OCl)_2$) per 1 ora o in soluzione di cloruro mercurico al 0.5% ([21]), per 5'. Dopo la disinfezione le cariossidi vengono ripetutamente lavate con acqua distillata sterile.

Per impedire la germinazione degli embrioni, le cariossidi vengono poste per 24 ore a —20°C, oppure in acido solforico concentrato per 2'.

d) *Disinfezione degli sclerozi.*

La disinfezione degli sclerozi è eseguita con le stesse modalità descritte per le cariossidi.

e) *Terreni nutritivi per la crescita delle piantine.*

I semi disinfettati vengono posti a germinare su carta da filtro inumidita con acqua di fonte sterile in capsule di Petri, oppure su terreno di White ([22]) leggermente modificato, avendo omesso l'aggiunta di amminoacidi e vitamine.

Per lo sviluppo delle piantine sono state adoperate delle comuni provette da batteriologia delle dimensioni di cm. 16 × 0,16 contenenti 8 cc. del terreno agarizzato allo 0,8%, e solidificato a becco di clarino; sulla superficie dell'agar viene posta la cariosside.

f) *Terreni di coltura.*

Sono stati impiegati i seguenti terreni colturali ([23]):

Terreno n. 1: glucosio g 20; patate g 300; agar g 15; acqua distillata 1000 cm^3; pH 7.

Terreno n. 2: glucosio g 20; estratto di malto Difco g 20; peptone Costantino g 1; agar g 20; acqua distillata 1000 cm^3; pH 6.

Il terreno n. 1 è particolarmente adatto per la produzione di conidi; il terreno n. 2 per l'isolamento ed il mantenimento delle colture. I terreni di coltura sono sterilizzati in autoclave per 20' a 100°C e per 20' a 120°C.

g) *Condizioni ambientali.*

Le condizioni ambientali di crescita sono: per le cariossidi temperatura ambiente (20-23°C) e luce diffusa. Per i ceppi di *Claviceps* incubazione per 15 giorni in termostato a 27°C e, successivamente, temperatura ambiente (20-23°C).

h) *Infezione dei semi.*

La sospensione di conidi, per l'infezione artificiale delle piantine, è ottenuta aggiungendo alla provetta contenente la coltura conidificata, 10 cc. di acqua distillata sterile. Si passa leggermente una spatola di platino sulla superficie della coltura, in modo da ottenere una sospensione di aspetto lattiginoso che risulta contenere circa 4 milioni di conidi per cc.; tale sospensione viene aspirata con una siringa da 1 o 2 cm^3. L'infezione viene praticata iniettando con ago n. 12 o n. 20, 0,1-0,2 cm^3 della sospensione di conidi in organi diversi dalla pianta, e precisamente: *a*) nell'embrione, prima della germinazione; *b*) nel germinello, dopo 24-48 ore dalla germinazione; *c*) nel culmo.

Nel primo caso, per facilitare l'introduzione dell'ago nell'embrione, si lasciano rigonfiare le cariosidi per 6-12 ore in acqua distillata.

i) *Tecniche microscopiche.*

Le misurazioni dei diametri delle ife e dei conidi sono eseguite in lattofenolo di Amann ([24]). Le sezioni dei preparati sono ottenute a mano o al microtomo (fettine di 10-12 μ) previa inclusione in paraffina. I fissativi adoperati sono: liquido di Bouin, liquido di Carnoy, FAA e Craf II ([25]) (p. 15 e p. 18).

La disidratazione è stata eseguita con alcool butilico ([25, 26]), includendo alla fine i preparati in paraffina (P. F. 48-52°C).

Per la colorazione differenziale delle ife nei tessuti sono usati i metodi della ematossilina ferrica ([25]) della tionina ed orange G ([27]), del giemsa ([28]) e del bleu di anilina ([29]).

I migliori risultati sono stati ottenuti con i fissativi FAA e Craf II,

e con il metodo di colorazione di Stougthon ([27]), che consiste nell'immersione dei preparati in una soluzione di tionina per 1 ora. La differenziazione avviene in una soluzione satura di orange G in alcool assoluto per 1': le ife assumono un'intensa colorazione azzurra, mentre i tessuti si colorano in giallo.

La colorazione delle sezioni a mano è stata invece eseguita con bleu-cotton in lattofenolo ([24]).

I disegni sono stati eseguiti al microscopio con camera lucida o a mano libera.

III - RISULTATI

A) Generalita' sull'infezione (*).

1) *Infezione delle piantine in vari stadi di sviluppo.*

L'inoculo di conidi di *Claviceps* si può eseguire nel coleoptile (dopo cioè 48-72 ore dalla germinazione) o nello embrione, prima della germinazione.

La crescita delle piantine infettate può avvenire sia su carta da filtro, inumidita con acqua distillata, in capsule Petri, sia in provette contenenti un appropriato terreno nutritivo solidificato a becco di clarino o in agar semplice; in tutti i casi le piantine crescono in condizioni controllate anche per la sterilità. Come si può vedere nella Tab. 1 la percentuale

Tabella 1

Percentuale d'infezione della segala Rosen 4n, con tecnica diversa di inoculo.

Inoculo	Terreno nutritivo di crescita		
	Carta da filtro umida	Agar di White con saccarosio	Controllo (acqua dist. agarizzata allo 0,8 %)
	%	%	%
Embrionale	40	100	70
Coleoptilare	30	50	35

Le cariossidi sono state inoculate con il ceppo F-122 di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Le piantine sono cresciute a temperatura ambiente (20-23° C) ed a luce diffusa.

(*) Per infezione si intende la produzione di micelio, conidi e sclerozi all'esterno dei tessuti ospiti; si dirà quindi che l'embrione, il coleoptile, le foglie o la piantina sono infetti, quando presentano all'esterno micelio od organi di moltiplicazione del fungo in questione.

di infezione è maggiore quando i conidi sono inoculati nell'embrione e la piantina cresce in provette contenenti terreno di White (Tab. 1).

2) *Influenza della composizione del terreno nutritivo sulle infezioni.*

Nella Tab. 1 risulta che la percentuale d'infezione aumenta quando le cariossidi germinano e si sviluppano sul terreno nutritivo di White. Tale fatto potrebbe essere dovuto od a particolari condizioni ambientali in cui la piantina viene a trovarsi nella provetta, o alla influenza dei nutriliti.

Si sono quindi seminate delle cariossidi in provette contenenti il terreno nutritivo di White senza carboidrati, o con l'aggiunta di varie fonti di carbonio. Anche in questo caso il controllo è rappresentato da provette contenenti acqua distillata allo 0,8% (Tab. II).

TABELLA II

Influenza del terreno nutritivo sulla percentuale d'infezione.

Terreno nutritivo	Percentuale d'infezione (*)	x^2	p
Agar-agar (controllo)	70		
White senza zuccheri	52	6.86	> 0.01
White con glicerina	82	3.94	> 0.05
» » mannite	78	1.64	< 0.05
» » xilosio	62	1.42	< 0.05
» » glucosio	86	7.48	> 0.01
» » maltosio	78	1.64	< 0.05
» » saccarosio	98	29.16	> 0.001
» » lattosio	100	35.28	> 0.001
» » amido	84	5.52	> 0.05

(*) n. 100 piantine circa per ogni prova.

Varietà di segala: Rosen 4n. Inoculo nell'embrione con il ceppo F-122 di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Crescita delle piantine alla luce diffusa ed a temperatura ambiente (20-23° C.).

Come si può osservare la percentuale di infezione non è sensibilmente diversa quando al terreno nutritivo base di White si aggiungono fonti di carbonio.

L'eventuale aumento della virulenza del ceppo o della recettività della pianta sembrerebbero quindi dovute, in questo caso, anche a particolari condizioni nutrizionali ([45]).

3) *Recettività di specie e varietà diverse di cereali alla infezione.*

Specie e varietà di cereali sono, in natura, diversamente recettive all'attacco delle *Claviceps* ([30, 31, 32, 33, 34]). Tale caratteristica naturale è confermata anche in queste particolari condizioni artificiali di crescita (Tab. III).

TABELLA III

Recettività di specie e varietà diverse di cereali alla infezione (*).

Cereale	Varietà	Percentuale d'infezione
Secale cereale L.	Rosen 2n	100
	Rosen 4n	100
	Stirpe 18	43
Triticum vulgare Vill. . . .	Damiano	30
Zea mais L.	Wisconsin 355	2
	Wisconsin 641-AA	2
	U.S.A. 13	0

(*) La percentuale d'infezione è calcolata sulle piantine non contaminate da funghi o bacteri.

Le cariossidi sono state inoculate nell'embrione con il ceppo F-122 di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Le piantine sono cresciute in provette contenenti il terreno nutritivo di White con saccarosio, a temperatura ambiente (20-23° C) ed a luce diffusa. N. 100 piantine circa per ogni prova.

La percentuale di infezione varia nelle diverse specie e varietà di cereali; inoltre la tecnica dell'inoculo embrionale può determinare infezioni nel mais, pianta che, in natura, non è mai risultata ospite della *Claviceps* ([5, 6]).

4) *Influenza di diversi ceppi o specie di Claviceps sulla percentuale di infezione.*

La percentuale di infezione è determinata anche dalla specie o dal ceppo di *Claviceps* inoculato (Tab. IV)

TABELLA IV

Percentuale di infezione in segala Rosen 4n, con diverse specie e ceppi di Claviceps.

Claviceps	Ceppo N.	Percentuale d'infezione
Claviceps purpurea	F-1	42
Claviceps purpurea	F-6/1	41
Claviceps purpurea	F-8/1	48
Claviceps purpurea	F-86/1	98
Claviceps paspali	F-97	20
Claviceps purpurea	F-99	100
Claviceps litoralis	F-144	62
Claviceps purpurea	F-122	100

Cariossidi inoculate nell'embrione. Crescita in terreno di White con saccarosio, a luce diffusa e temperatura ambiente (20-23° C). N. 100 piantine circa per ogni prova.

Come si osserva i ceppi F-99 ed F-122 (*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.) risultano i più patogeni con una percentuale pari al 100%; il ceppo F-97 (*Claviceps paspali* Stewens et Holl) risulta invece il meno patogeno con una percentuale del 20%.

B) CARATTERI MACROSCOPICI DELL'INFEZIONE.

1) *Sviluppo normale delle piantine.*

Le cariossidi disinfettate si pongono a germogliare sulla superficie inclinata del terreno nutritivo di White solidificato a becco di clarino. La germinazione con l'emissione dell'epicotile e della prima radichetta avviene dopo 48-72 ore, e la polarità della parte ipogea ed epigea delle piantine è sempre rispettata. Dalla prima radice si ottengono, successivamente, altre radici secondarie che si immergono nel terreno nutritivo, mentre il culmo si allunga fino a quando la prima foglia viene a contatto con la parte interna del tappo di cotone della provetta. A questo punto, che viene raggiunto generalmente dopo 10-14 giorni, continuando lo sviluppo della piantina, la foglia principale si piega per l'ostacolo costituito dal tappo. Anche le altre foglie possono subire lo stesso effetto, cosicchè dopo 20 giorni la provetta è piena di foglie avvolte irregolarmente su sè stesse. Queste condizioni di sviluppo non sembra apportino un danno notevole ai tessuti: le foglie mantengono infatti per circa un mese il loro aspetto turgido e verde. Solo dopo tale periodo si possono osservare fenomeni di clorosi che portano la pianta ad un progressivo disseccamento e quindi alla morte. La lunghezza massima raggiunta dalla pianticina in queste condizioni è di 15-20 cm (Fig. 1).

2) *Sviluppo anormale della piantina.*

Alterazioni dello sviluppo normale sopra descritto possono essere riferite a due cause: conseguenze dovute alla ferita dell'ago nell'embrione ed infezione della *Claviceps.*

Il trauma provocato con la puntura dell'ago, indipendentemente dall'infezione, può determinare le seguenti anomalie nello sviluppo: perdita della polarità del germinello, lesioni necrotiche o fessurazioni del lembo fogliare, emissione di più culmi (quando l'ago ha ferito l'apice vegetativo).

Nell'infezione vera e propria si possono invece distinguere due fasi:

nella prima, che dura circa 10 giorni, si ha lo sviluppo del micelio all'interno dei tessuti; la piantina presenta una spiccata deviazione, dall'asse di crescita normale, del germinello che si accresce in forma spiralata: questa malformazione è tipica dell'infezione e non si verifica mai come conseguenza del danno meccanico;

nella seconda fase compaiono, all'esterno dei tessuti delle foglie o del culmo, gli organi di moltiplicazione del fungo rappresentati da conidi o sclerozi (infezione fogliare).

I due stadi dell'infezione possono presentarsi più o meno ravvicinati nel tempo, fino a coincidere: cioè la produzione di conidi o sclerozi può verificarsi anche nei primi stadi di sviluppo dell'embrione o del germinello (coleoptile) (infezione embrionale ed infezione coleoptilare).

Le parti della pianta colpite dal fungo possono quindi essere: l'embrione, il germinello, il culmo e le foglie, mai le radici.

In relazione agli stadi successivi di sviluppo della piantina infettata ed al manifestarsi degli organi riproduttivi del fungo, sono stati distinti tre tipi di infezione:

I - Gruppo A: Infezione embrionale o forte (Fig. 2, 3)

II - Gruppo B: Infezione media (Fig. 9)

III - Gruppo C: Infezione fogliare o debole (Fig. 12)

3) *Infezione embrionale.*

In questo tipo di infezione l'embrione arresta la crescita ai primi stadi di sviluppo: si osservano la rottura dei tegumenti e qualche cenno di crescita, rappresentato dalla emissione della radichetta o dell'epicotile lungo 2-4 mm. L'embrione viene avvolto ben presto da uno spesso strato di micelio fioccoso, bianco, (Fig. 2) (Fig. 3) mentre il germinello

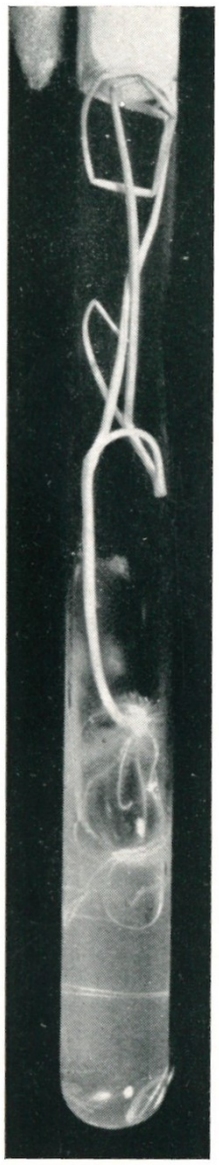


Fig. 1



Fig. 2

Fig. 1. - Piantine di Segala Rosen 4n di 15 giorni.

Fig. 2. - Cariosside di Segala Rosen 4n dopo 7 giorni dall'inoculo. Tipo d'infezione embrionale. Si noti lo sviluppo del micelio su tutto l'embrione. L'infezione è limitata nella parte embrionale della cariosside. × 10.

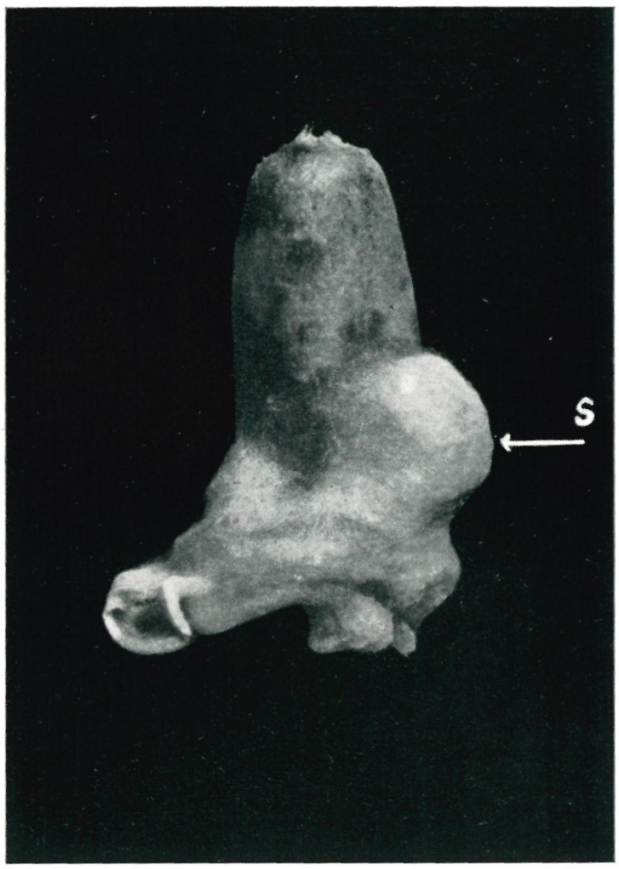


Fig. 3. - Cariosside di Segala Rosen 4n dopo 10 giorni dall'inoculo. Tipo d'infezione embrionale. Si noti lo sviluppo del micelio all'esterno dell'embrione e l'inizio della formazione dello sclerozio (s). × 10.

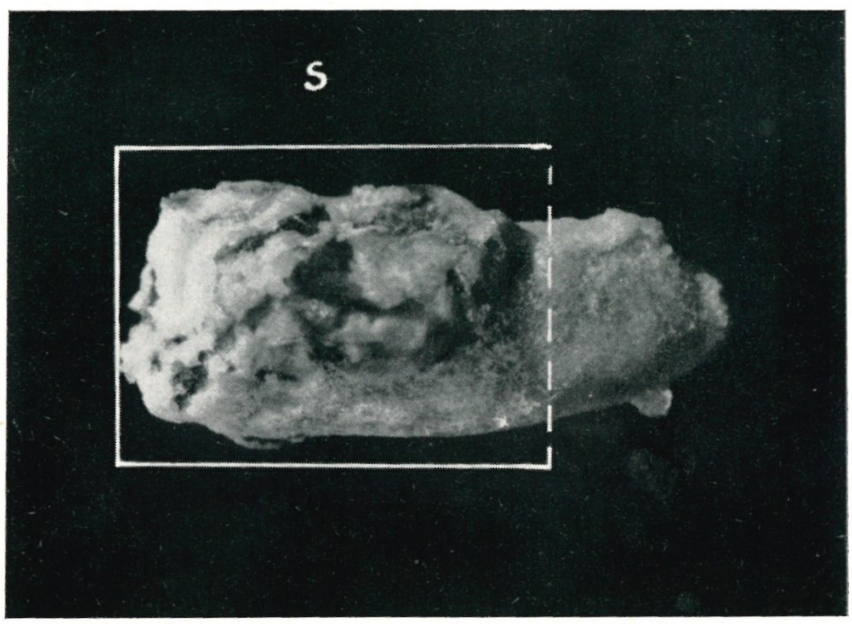


Fig. 4. - Cariosside di Segala Rosen 4n dopo un mese dall'inoculo. Si noti la presenza dello sclerozio (s) su tutta la parte embrionale della cariosside. × 10.



Fig. 5. - Embrione morto di Segala Rosen 4n separato sterilmente dalla cariosside ed inoculato con il ceppo F-122 di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.
Si noti la presenza di uno sclerozio che invade tutti i tessuti dell'embrione. × 10.



Fig. 6. - Germinello di Segala Rosen 4n dopo 7 giorni dall'inoculo. Tipo di infezione coleoptilare. Si noti l'inizio della tipica curvatura del coleoptile e lo sviluppo del micelio. × 10.



Fig. 7. - Segala Rosen 4n dopo 10 giorni dall'infezione. Si noti la caratteristica disposizione a spirale di alcuni organi della piantina. × 7.

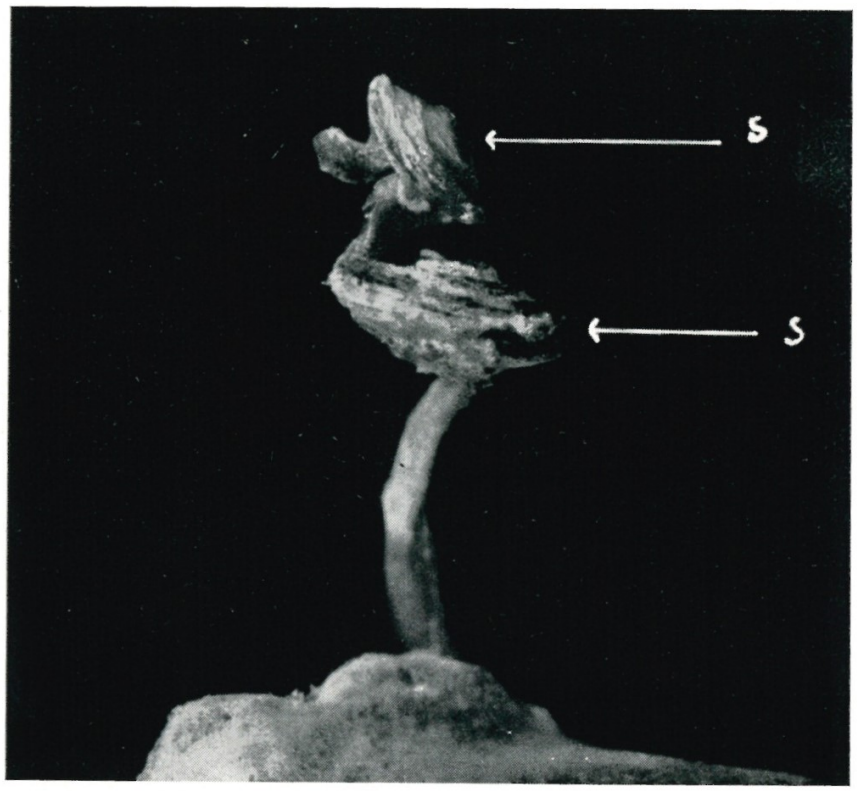


Fig. 8. - Germinello di Segala Rosen 4n dopo 20 giorni dall'inoculo. Tipo d'infezione coleoptilare. Si noti la formazione di sclerozi (s) sulle due curvature della spirale. × 10.

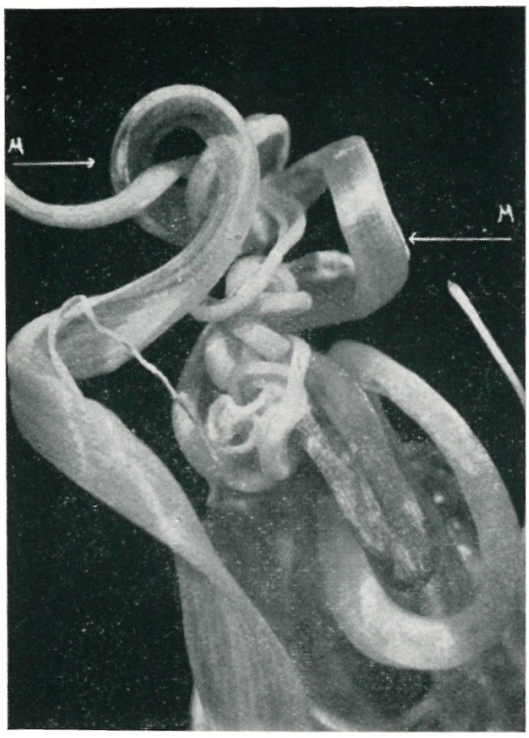


Fig. 9. - Segala Rosen 4n dopo 10 giorni dall'inoculo. Tipo d'infezione fogliare. Si noti la disposizione caratteristica delle foglie, con alterazioni della normale polarità, ed avvolgimenti a spirale. Sui margini del lembo si osserva la presenza di micelio (M). × 7.

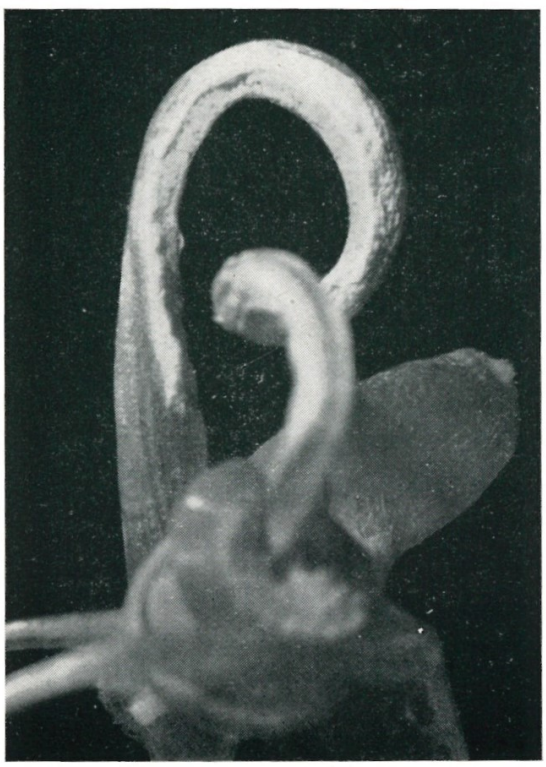


Fig. 10. - Segala Rosen 4n dopo 10 giorni dall'inoculo. Tipo d'infezione fogliare. L'infezione si propaga lungo la nervatura mediana. × 7.

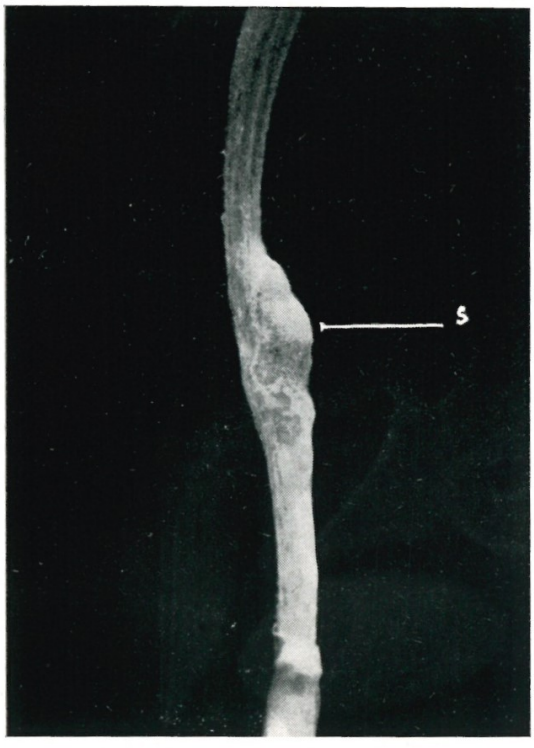


Fig. 11. - Segala Rosen 4n. Tipo d'infezione fogliare, dopo 20 giorni dall'inoculo. Si osservi la formazione di uno sclerozio (s) alla base della foglia. ×7.

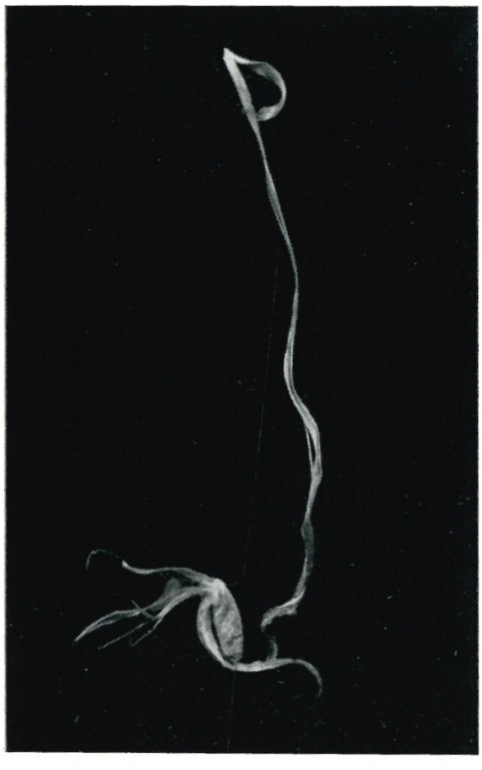


Fig. 12. - Segala Rosen 4n dopo 20 giorni dall'inoculo. Tipo d'infezione fogliare. Si noti come in questo caso la piantina abbia mantenuto una disposizione normale del culmo e della foglia.

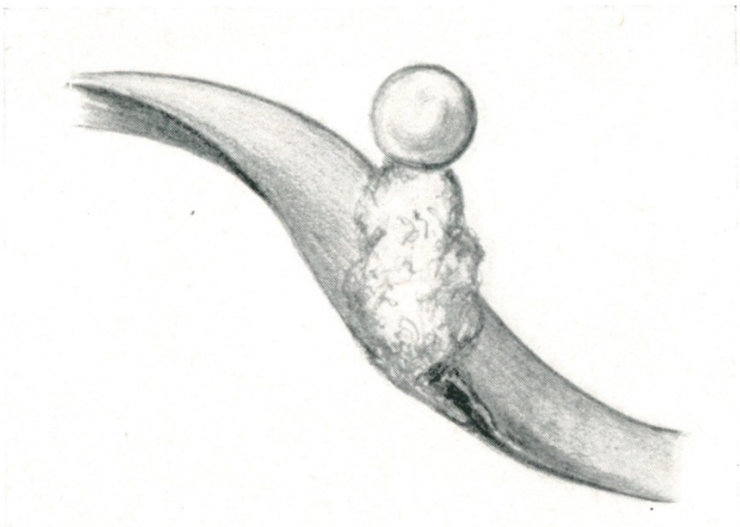


Fig. 13. - Segala Rosen 4n. Tipo d'infezione fogliare. Particolare della produzione di micelio e di una goccia di melata su una foglia. × 10.

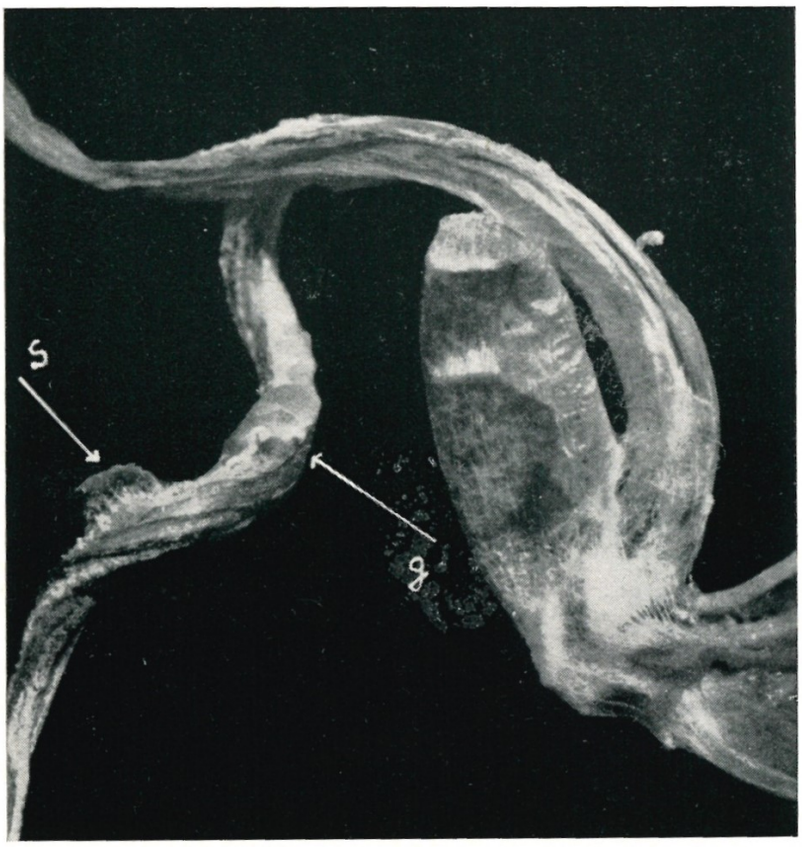


Fig. 14. - Segala Rosen 4n. Tipo d'infezione fogliare. Produzione di sclerozi (s) sul lembo fogliare. Si noti il caratteristico avvolgimento della foglia stessa ed alcune gocce di melata (g). × 10.

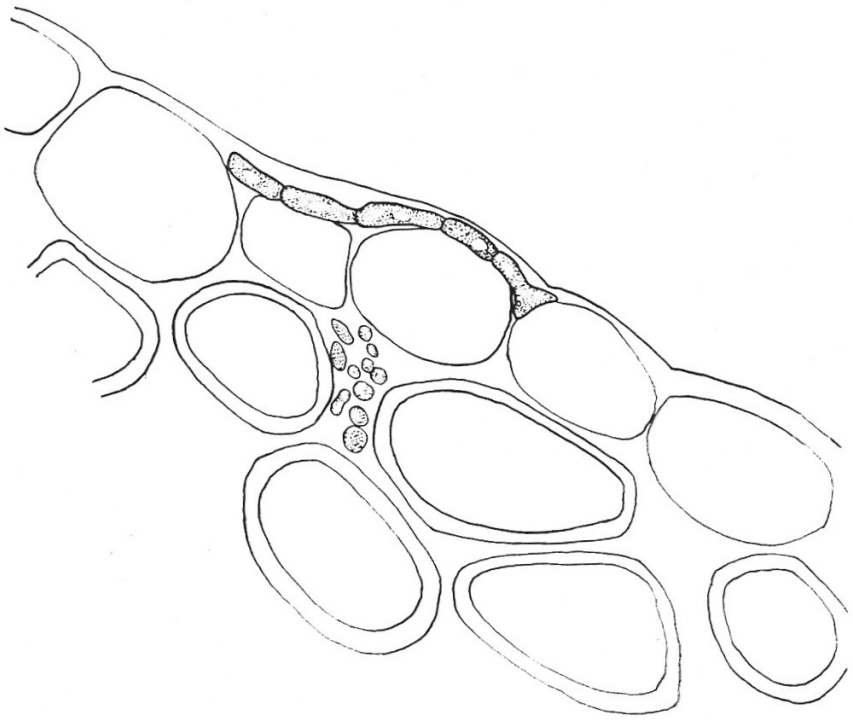


Fig. 15. - Stadio iniziale dell'infezione. Il micelio si accresce negli spazi intracellulari. × 1000.

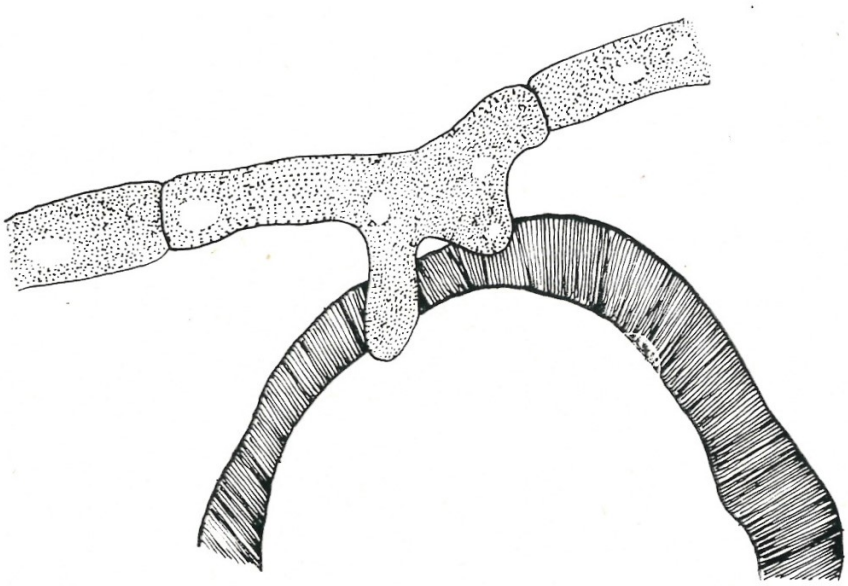


Fig. 16. - Particolari di austori. L'ifa a contatto della parete cellulare invia all'interno delle ramificazioni. × 2000.

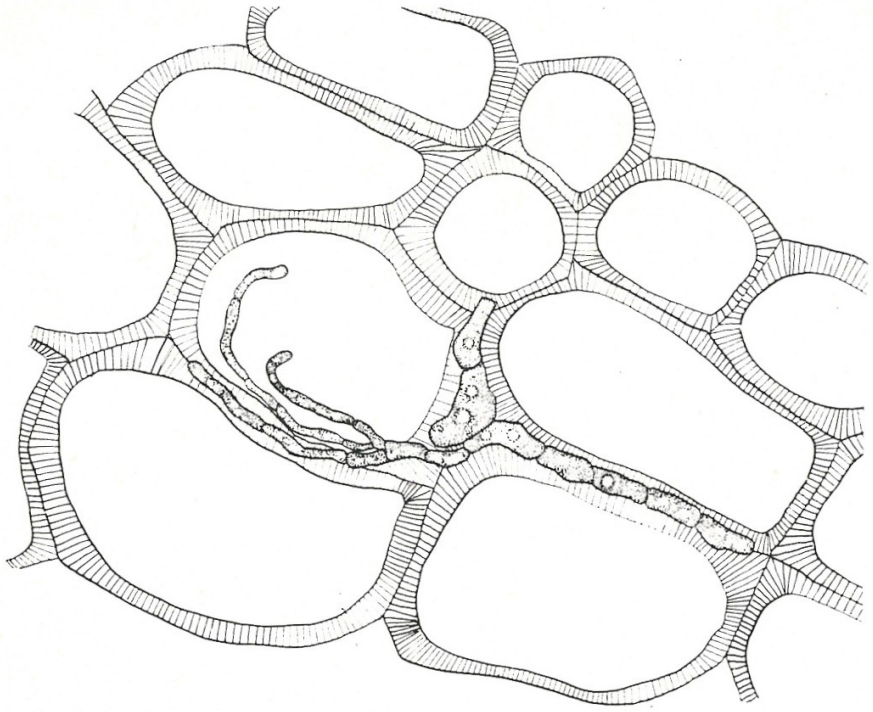


Fig. 17. - Particolari di austori. L'ifa a contatto della parete cellulare invia all'interno delle ramificazioni. × 2000.

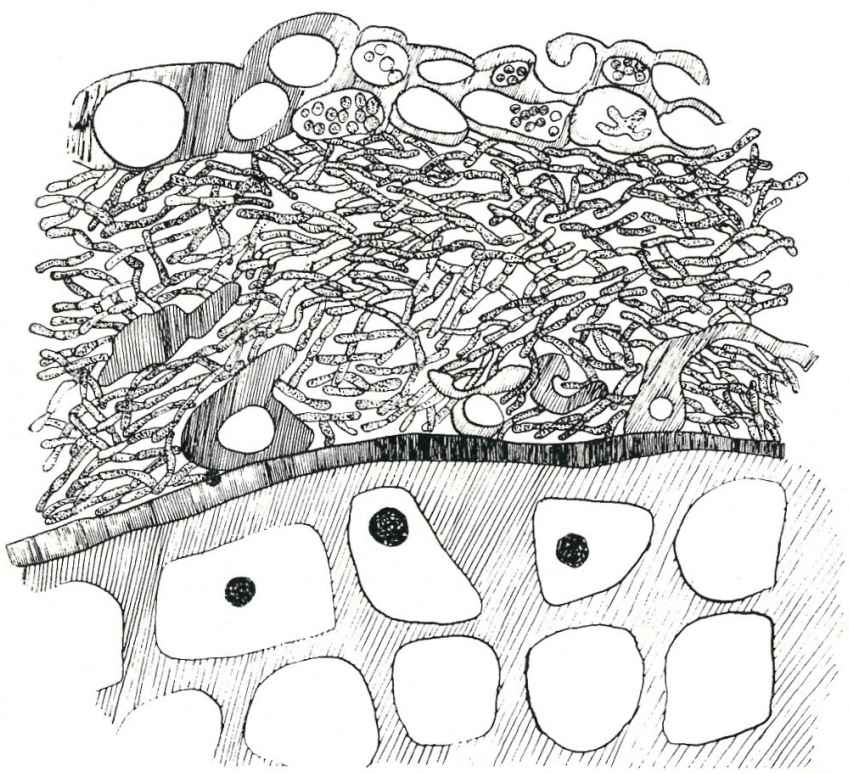


Fig. 18. - Le ife si accrescono nei tessuti che si trovano tra l'epidermide esterna ed il testa. × 500.

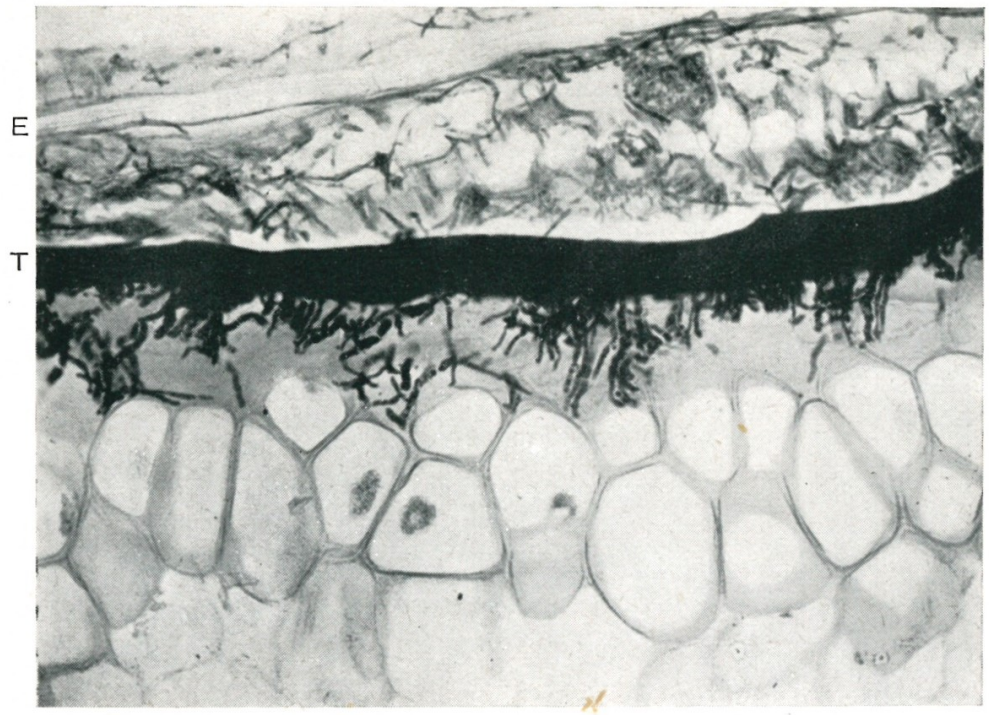


Fig. 19. - Le ife si accrescono tra le cellule dell'aleurone e dell'albume. E = epidermide esterna; T = testa. × 250.

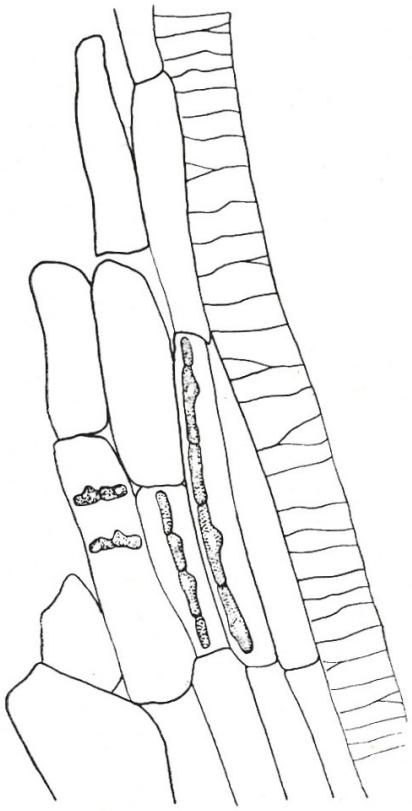


Fig. 20. - Le ife iniziano la crescita nelle cellule vasali. × 100.

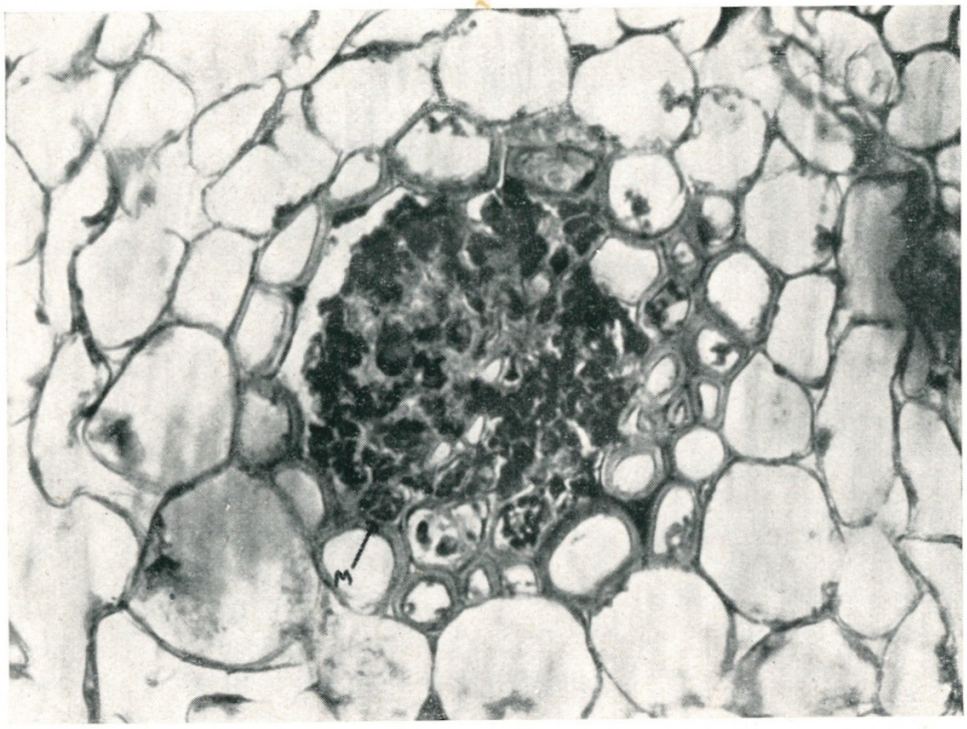


Fig. 21. - Sezione trasversale di un fascio fibrovascolare di una foglia. Il micelio (M) ha invaso tutto il fascio. × 400.

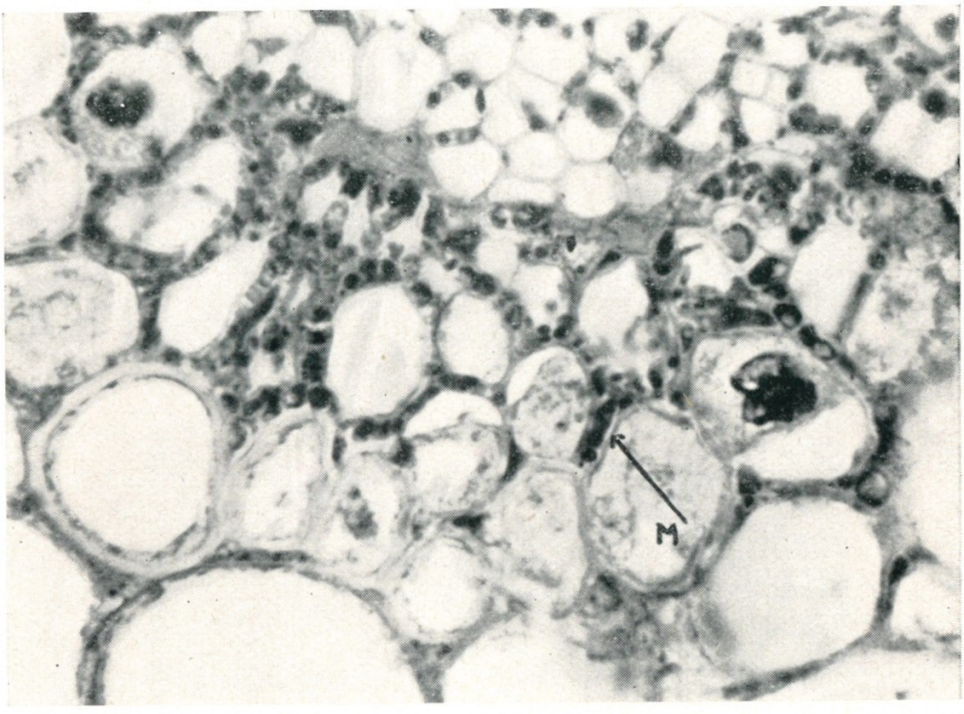


Fig. 22. - Il micelio (M) si propaga dai vasi al parenchima circostante. × 650.

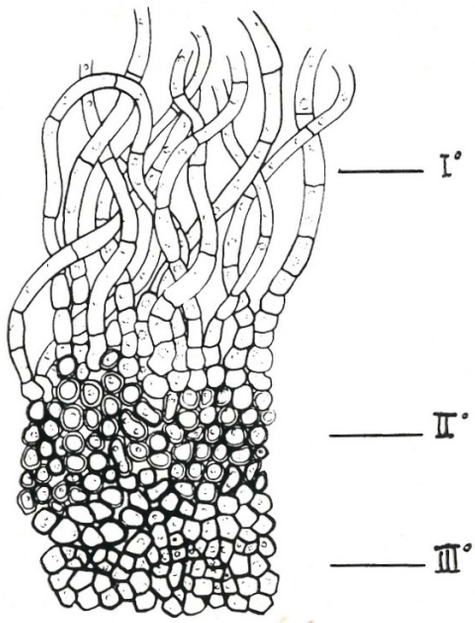


Fig. 23. - Sezione trasversale di uno sclerozio embrionale dopo 15 giorni dall'inoculo. (Schematico).
Si noti la distribuzione regolare dei tre strati. × 750.

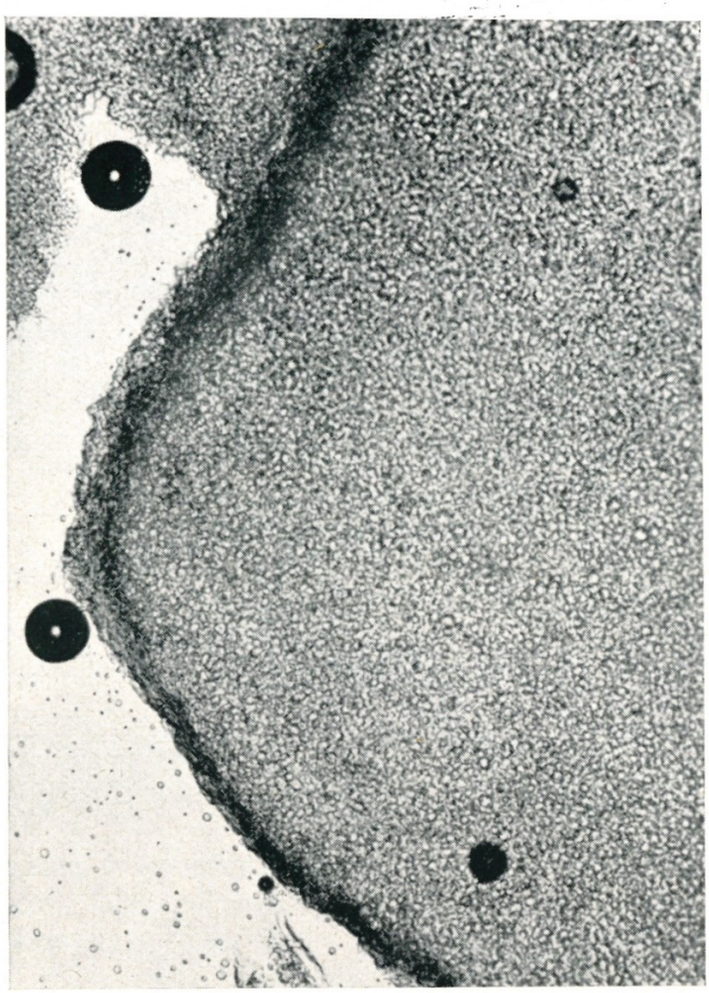


Fig. 24. - Sclerozio embrionale di 30 giorni. Sezione trasversale. Si noti lo strato corticale esterno e lo strato midollare interno. × 100.

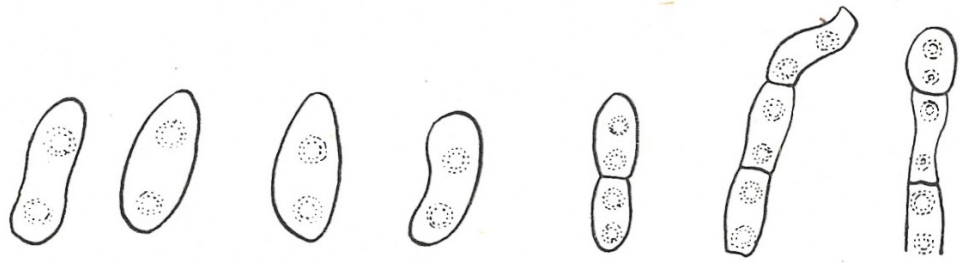


Fig. 25. - Artrospore e conidi di sclerozi embrionali. Si noti la forma diversa delle cellule e l'origine: le ife infatti producono per settazione apicale le cellule scleroziali o artrospore. × 1000.

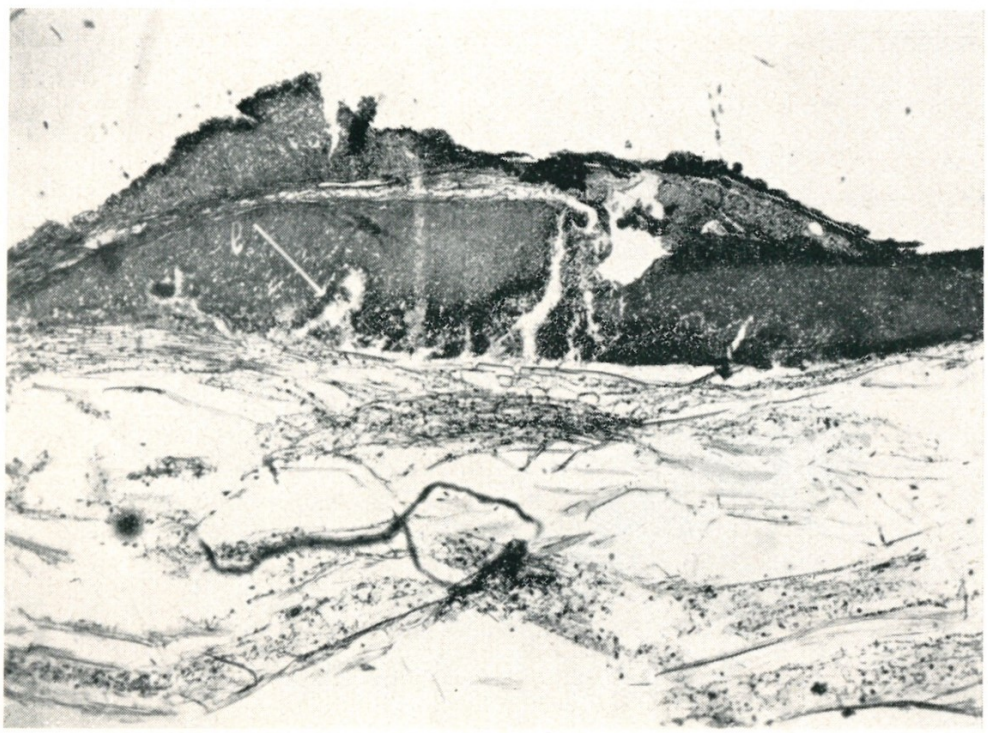


Fig. 26. - Sezione longitudinale di uno sclerozio del culmo. All'interno si osservano delle lacune (l) contenenti conidiofori e conidi. (Stadio di *Sphaecelia segetum* Lev.). × 40.

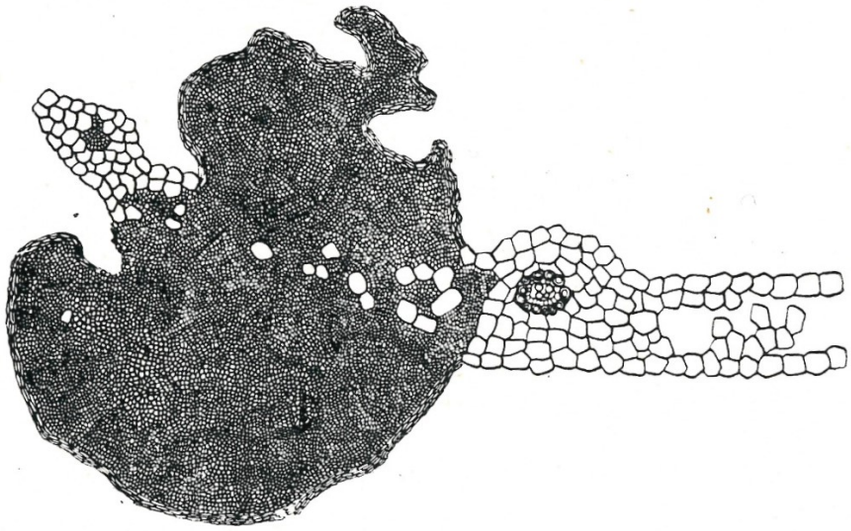


Fig. 27. - Sezione trasversale di uno sclerozio su una foglia. Lo sclerozio si è formato in corrispondenza della nervatura mediana. × 60.

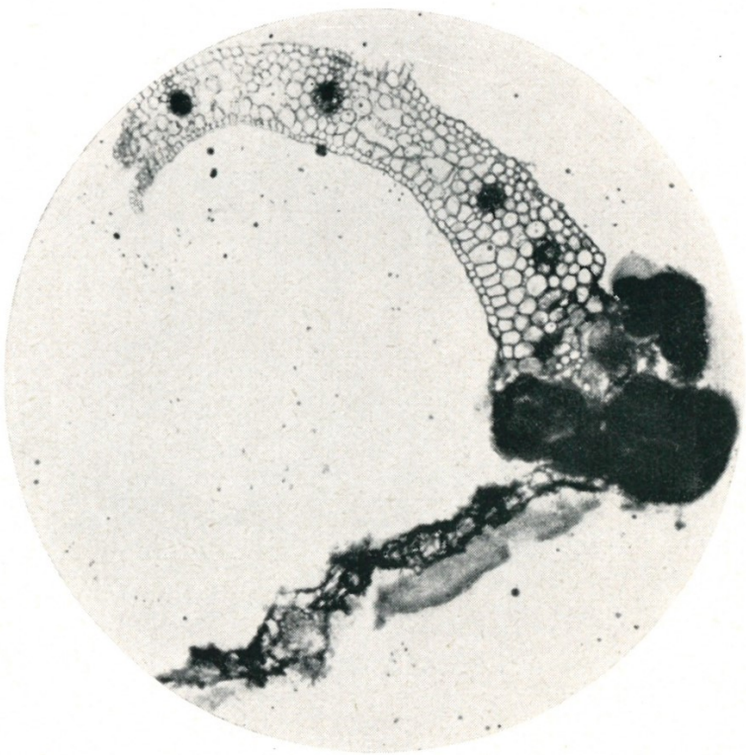


Fig. 28. - Sezione trasversale di uno sclerozio su una foglia. Lo sclerozio si è formato in corrispondenza della nervatura mediana estendendosi poi sulla faccia superiore destra della foglia. × 30.



Fig. 29. - Sezione trasversale di uno sclerozio del culmo. Si noti una lacuna (l) con conidiofori e conidi di *Sphaecelia segetum* Lev. × 250.

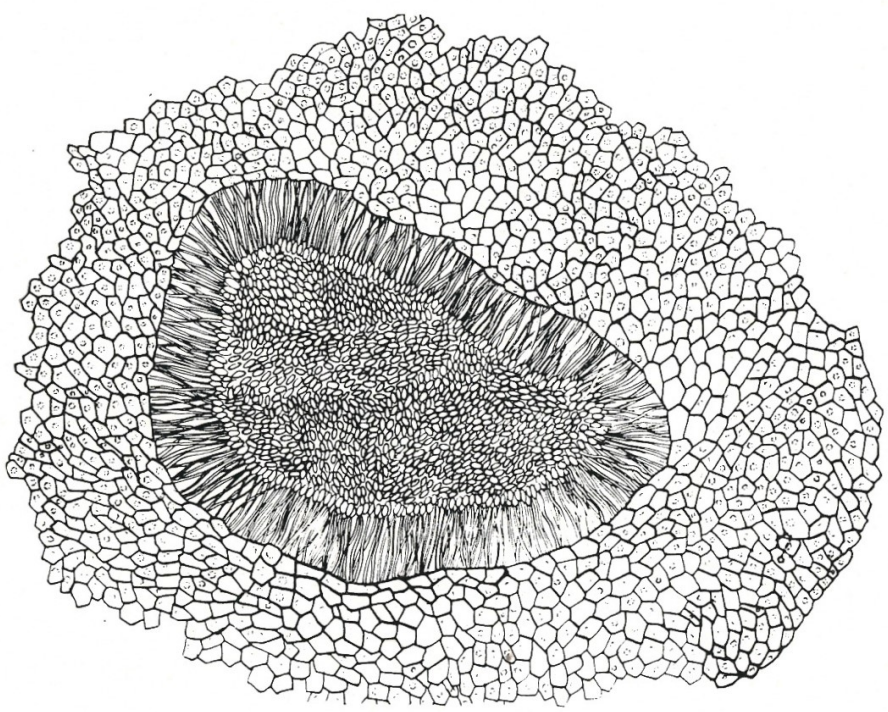


Fig. 30. - Sezione trasversale di uno sclerozio della foglia. Si noti la lacuna interna contenente conidiofori e conidi di *Sphaecelia segetum* Lev. × 1000.

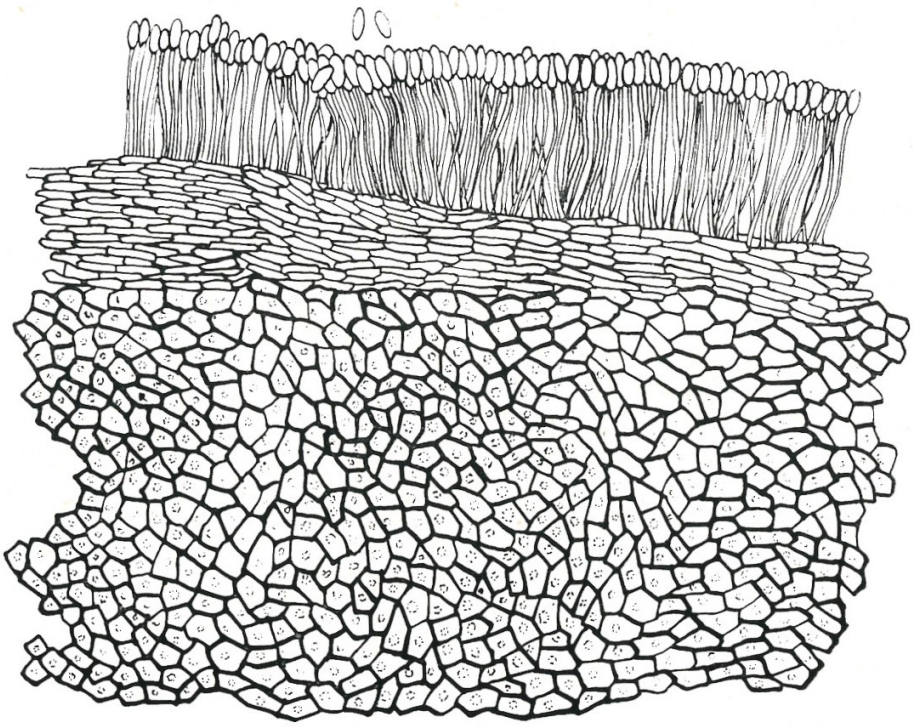


Fig. 31. - Sezione trasversale di uno sclerozio di una foglia. Si noti la regolare disposizione dello strato interno o midollare e dello strato esterno o corticale. Alla superficie si nota la presenza di uno strato di conidiofori e conidi. × 1000.

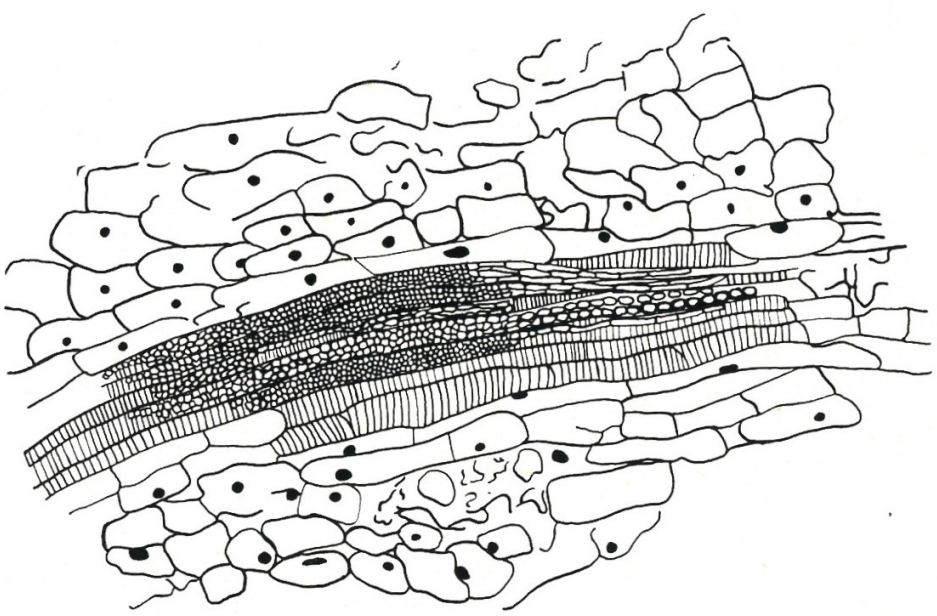


Fig. 32. - Formazioni scleroziali lungo un fascio fibrovascolare. (Tipo di sclerozio interno). × 500.

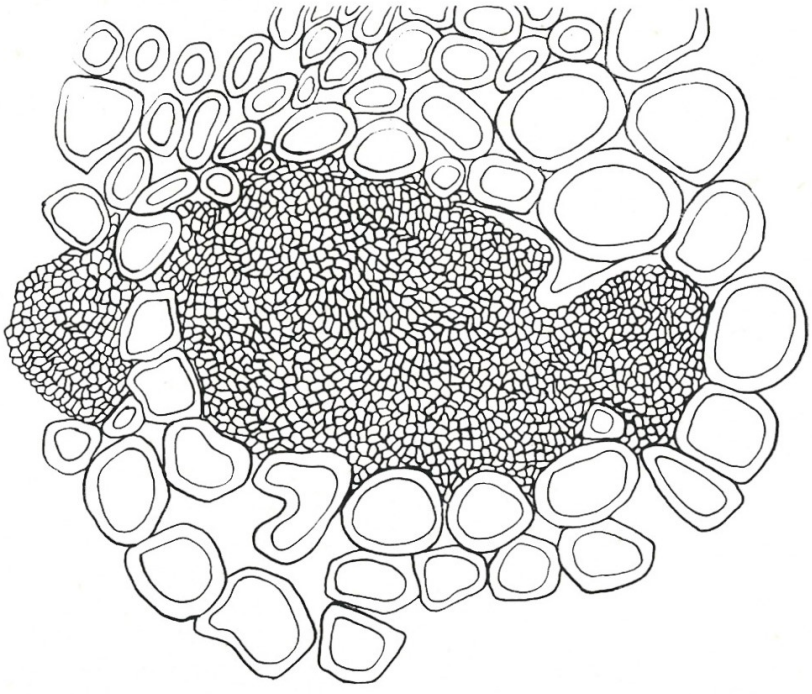


Fig. 33. - Formazioni scleroziali all'interno del parenchima del culmo. (Tipo di sclerozio interno). × 500.

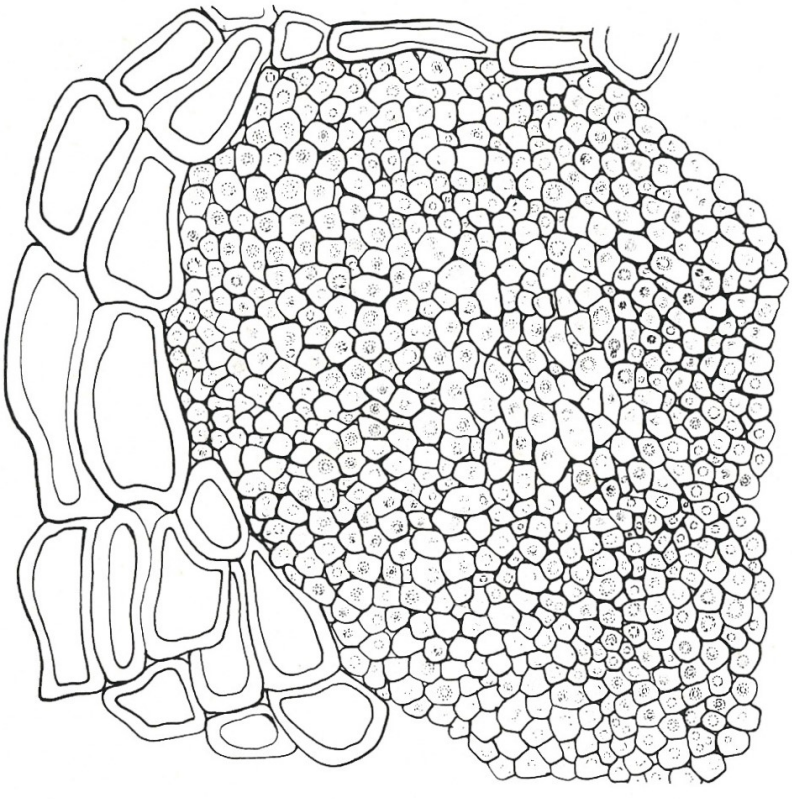


Fig. 34. - Sezione trasversale di uno sclerozio ottenuto su embrione ucciso con il freddo. × 1000.

eventualmente sviluppatosi, diventa di colore bruno pallido, che si scurisce col tempo. Dopo circa 20-30 giorni, al posto dell'embrione, si rivela la presenza di uno sclerozio con dimensioni di 2-3 × 5-3 mm di forma varia, di colore bruno nella parte midollare e violaceo nella parte corticale, con piegature, talvolta mammellonato, che si screpola alla maturità, raggiunta dopo circa due mesi (Fig. 4).

La formazione dello sclerozio è strettamente limitata alla parte embrionale: su cariòssidi senza embrione, inoculate con conidi di *Claviceps purpurea*, non si ottengono sclerozi; mentre su embrioni, separati sterilmente dalla cariosside, ed uccisi (si pongono a —20° per 48 ore) gli sclerozi si producono normalmente, qualora l'embrione stesso venga infettato (Fig. 5).

Ceppi fortemente virulenti, come l'F-99 o l'F-122, producono sclerozi in tutti i casi di infezione embrionale (Gruppo A, Diagr. 2), mentre i ceppi poco virulenti, anche se riescono ad infettare l'embrione, producono sclerozi bianchi, immaturi o « presclerozi ». (Ceppi F-97, F-114, F-6/1, F-8/1).

4) *Infezione coleoptilare.*

Le manifestazioni patologiche sono caratterizzate dall'arresto di sviluppo del germinello, che rimane esile e raggiunge una lunghezza massima di 2-4 cm (Fig. 6). Spesso presenta fenomeni di crescita a spirale (Fig. 7) (indice di una infezione in atto), oppure una alterata polarità di crescita. In quest'ultimo caso può incurvarsi nel terreno nutritivo e penetrare nell'agar, facendo un angolo di 90° con l'asse principale di crescita, oppure accrescersi in direzione opposta a quella normale, parallelo alle radici.

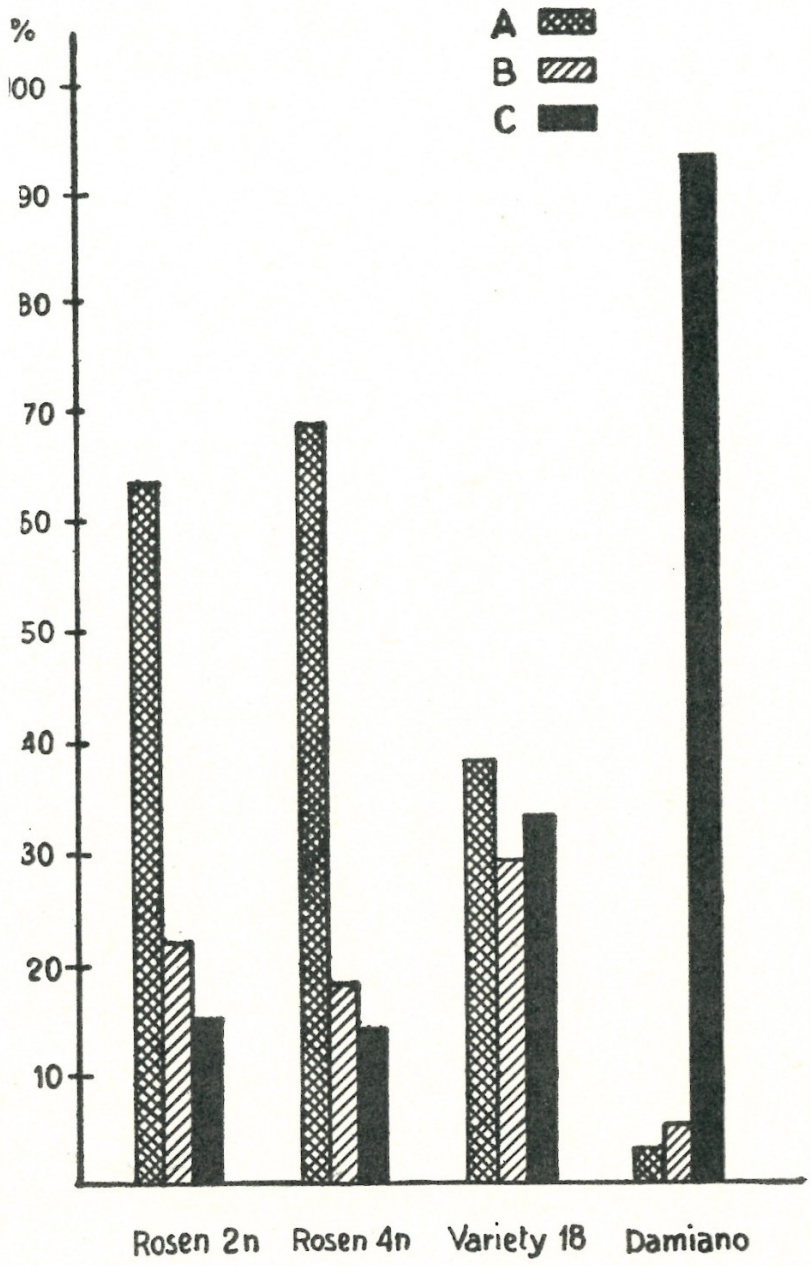
L'infezione si manifesta con la comparsa di un feltro miceliare bianco, fioccoso, che avvolge l'apice o tutto il coleoptile. Dopo 5-6 giorni, sul micelio formatosi si osservano alcune gocce bianche o bruno-scure, caratteristiche dello stadio di melata, che si trasformano dopo una settimana circa in sclerozi bruno-violacei di 2-3 mm di lunghezza (Fig. 8).

5) *Infezione fogliare.*

In questo tipo di infezione le alterazioni patologiche sono di due tipi ben distinti:

il primo tipo è caratterizzato da fenomeni irregolari di sviluppo delle foglie che si presentano avvolte a spirale, variamente intrecciate fra loro con clorosi diffusa, lacerazioni ed alterata polarità della lamina

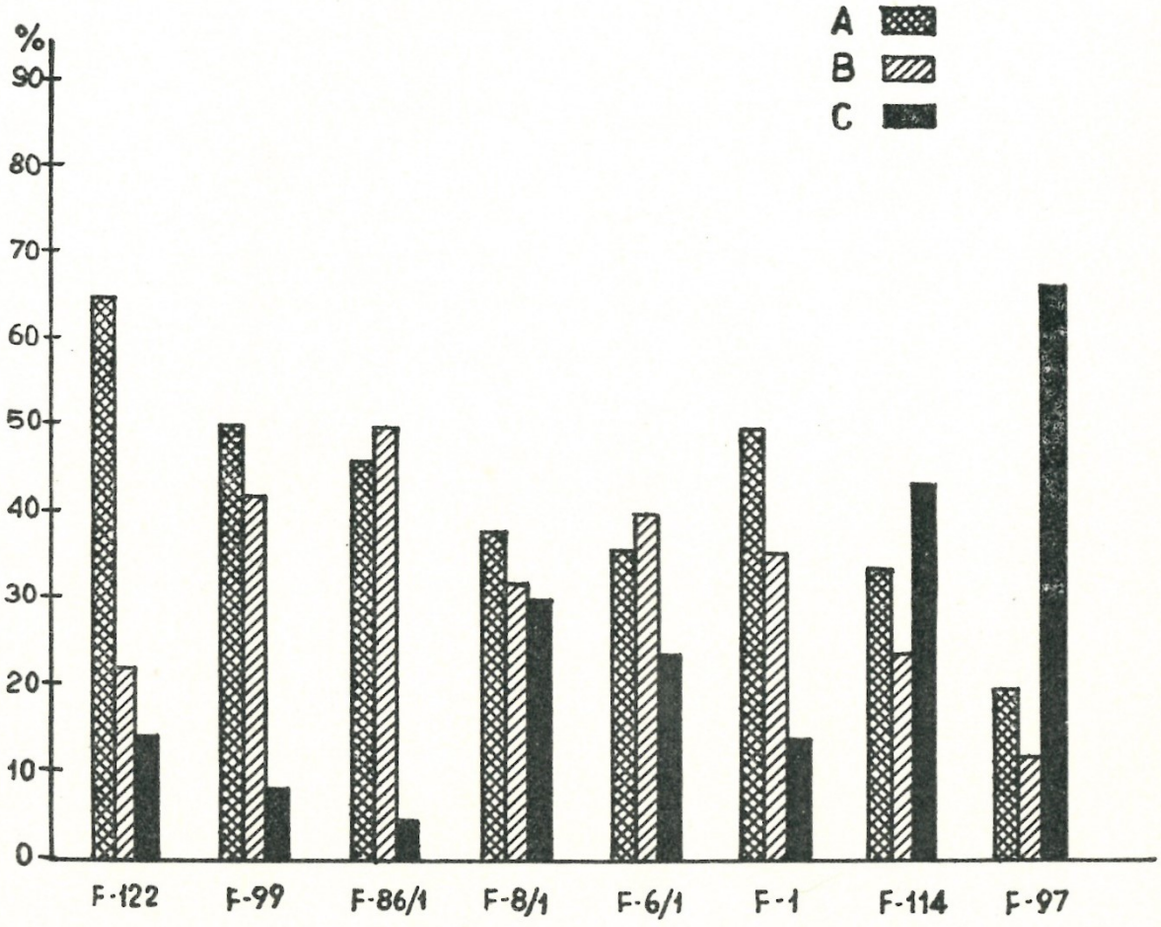
fogliare (Fig. 9). La piantina raggiunge una lunghezza di 5-8 cm. Il micelio compare alla base della foglia e si diffonde lungo la nervatura mediana (Fig. 10). La produzione di conidi avviene dopo 3-4 giorni dalla comparsa del micelio; segue la formazione degli sclerozi che possono presentarsi isolati o in serie, e raggiungono dopo 10-15 giorni una lunghez-



Graf. 1. - Influenza delle specie e varietà di cereale sulla percentuale relativa dei vari gruppi di infettività.

za di 2-3 mm (Fig. 11). Gli sclerozi sono di forma irregolare o rotondeggianti, di colore bruno-violaceo nella parte corticale e bruno chiaro nella parte midollare. Una particolare manifestazione in questo primo stadio dell'infezione consiste nella fuoriuscita dal coleoptile di una foglia aghiforme, rossa per pigmenti antocianici, e che presenta immediatamente delle formazioni miceliari esterne, con produzione di sclerozi seriati.

Il secondo tipo dell'infezione fogliare si ha quando la piantina ha raggiunto uno sviluppo avanzato ed una lunghezza di 15-20 cm (Fig. 12). Le foglie possono presentare avvolgimenti a spirale e clorosi diffuse, ma mai perdita della normale polarità, ossia sono sempre rivolte verso l'alto. Le manifestazioni patologiche possono pure essere caratterizzate da ne-



Graf. 2. - Influenza di specie e ceppi diversi di *Claviceps* sulla percentuale relativa dei gruppi di infettività di segala Rosen 4 n.

crosi o da malformazioni. Dopo 10-15 giorni dalla germinazione della cariosside il fungo produce ammassi di micelio localizzati sul culmo, oppure ai margini o sulla nervatura mediana della lamina fogliare (Fig. 13). Successivamente sono prodotti i conidi, con gocciole di melata, e sclerozi isolati o in serie (Fig. 14).

In una stessa varietà o specie di cereale e per ogni ceppo di *Claviceps* i rapporti tra il numero di piante appartenenti ai tre gruppi prima descritti (Figg. 2, 3, 9, 12) variano in funzione della recettività della varietà stessa alla infezione e della virulenza del ceppo. Si potrebbe quindi dire che quanto più grande è il numero delle piante con infezione embrionale (Gruppo A), tanto maggiore è la suscettibilità della varietà o la virulenza del ceppo (Grafici 1 e 2).

Il grafico 1 mostra chiaramente come le varietà di segala Rosen 2n e 4n (63 e 68% di piantine del Gruppo A) siano più recettive della segala Stirpe 18 (38% di piantine del Gruppo A) o del grano (3% di piantine del Gruppo A). Analogamente i ceppi più patogeni sono l'F-99 e l'F-122, rispettivamente con il 50% ed il 64% di piantine del Gruppo A.

Variazioni nelle percentuali di infezione dei diversi Gruppi si ottengono anche modificando la composizione del terreno nutritivo (Tab. V).

TABELLA V

Influenza di diverse fonti di carbonio sulla percentuale relativa di vari gruppi di infettività in segala Rosen 4n.

	Gruppi		
	A	B	C
	%	%	%
Agar-agar (*) (Controllo)	32	22	34
White senza saccarosio	40	42	18
White con glicerina	36	42	22
» » mannite	54	22	24
» » xilosio	50	16	34
» » glucosio	32	42	26
» » maltosio	44	32	24
» » saccarosio	62	28	10
» » lattosio	92	6	2
» » amido	66	14	20

(*) Acqua distillata agarizzata allo 0,8%.
Cariossidi inoculate nell'embrione con ceppo F-122 di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Il terreno nutritivo base è costituito dai sali minerali del terreno di White. La crescita delle piantine avviene a luce diffusa e temperatura ambiente (20-23° C). N. 100 piantine circa per ogni prova.

La morte delle piantine infettate può essere dovuta ad una azione diretta del fungo oppure alla produzione di particolari tossine ([35]). In molti casi infatti si osservano disseccamenti del culmo o delle foglie dovuti unicamente alla presenza del micelio nel terreno di coltura.

Il lattosio inoltre inibisce, fino dai primi stadi, la crescita delle piantine.

C) ESAME MICROSCOPICO DELL'INFEZIONE.

La sospensione di conidi, inoculati con la siringa, viene portato nell'interno dell'embrione a contatto della radichetta. Dopo 24-48 ore i conidi iniziano a germinare e formano le prime ife negli spazi intracellu-

lari, che si trovano a diretto contatto con i margini della ferita (Fig. 15). Le ife che hanno un diametro di 3-4 μ solo raramente mandano austori all'interno della cellula (Figg. 16, 17), mediante perforazione delle lamelle: gli austori hanno un diametro di 1,5-2 μ, inferiore quindi a quello delle ife vegetative.

Le zone dell'embrione interessate nella crescita del fungo sono: scutello, epiblasto, apice vegetativo, abbozzi fogliari, coleoptile e primo internodio. Il micelio quindi invade e distrugge successivamente tutti i tessuti dell'embrione ad esclusione della radichetta. Con il progredire dell'infezione le ife si sviluppano anche nei tessuti del pericarpo che derivano, come è noto, dalle pareti dell'ovario (Fig. 18) ([36, 37, 38, 39]), localizzandosi preferenzialmente tra l'epidermide esterna ed il testa. Successivamente le ife possono svilupparsi anche tra le cellule dell'aleurone e penetrare nell'albume (Fig. 19). Tale infezione è, tuttavia, molto tardiva ed avviene solo quando già tutto l'embrione è stato trasformato in uno sclerozio.

L'infezione si propaga nei primi internodi e nella foglia, attraverso i fasci cribovascolari: le ife che si sono sviluppate nei tessuti parenchimatici embrionali penetrano nelle cellule vasali ([37]) (Fig. 20) sviluppandosi prevalentemente all'interno dei vasi cribrosi che si trovano nei primi internodi o alla base della nervatura mediana della fogliolina. Successivamente possono diffondersi anche all'interno dei vasi legnosi o tra vaso e vaso (Fig. 21), da dove possono inviare delle ife laterali nel parenchima circostante (Fig. 22). Nel parenchima del culmo le ife si propagano come nell'embrione, determinando alterazioni nella normale struttura dei tessuti: le cellule parenchimatiche e del mesofillo presentano fenomeni di autolisi o rottura delle pareti cellulari con alterazione profonda della normale struttura del tessuto.

D) Formazione dello sclerozio.

Nell'embrione, dopo 10-15 giorni dall'infezione, le ife iniziano la formazione di un ammasso miceliale interno ed esterno, costituito da ife di 4-5 μ di diametro, settate, con inclusioni costituite da goccioline di grasso. In tale periodo inizia anche la formazione dello sclerozio, che si presenta di colore bianco farinoso e con una struttura a cellule poligonali, di 6-10 μ di diametro. Esso è costituito da tre strati:

Il I strato, o interno, a struttura lassa, e formato da ife di 4-5 μ di diametro, variamente intrecciate tra di loro, con setti distanziati 20-40 μ, e contenenti alcune goccioline di grasso. Il II strato, o intermedio, a

struttura più compatta, deriva dal precedente per addensamento delle ife, che si ramificano e crescono ulteriormente con setti molto più ravvicinati (6-12 μ). Il tessuto pseudo-parenchimatico che viene cosí a formarsi è

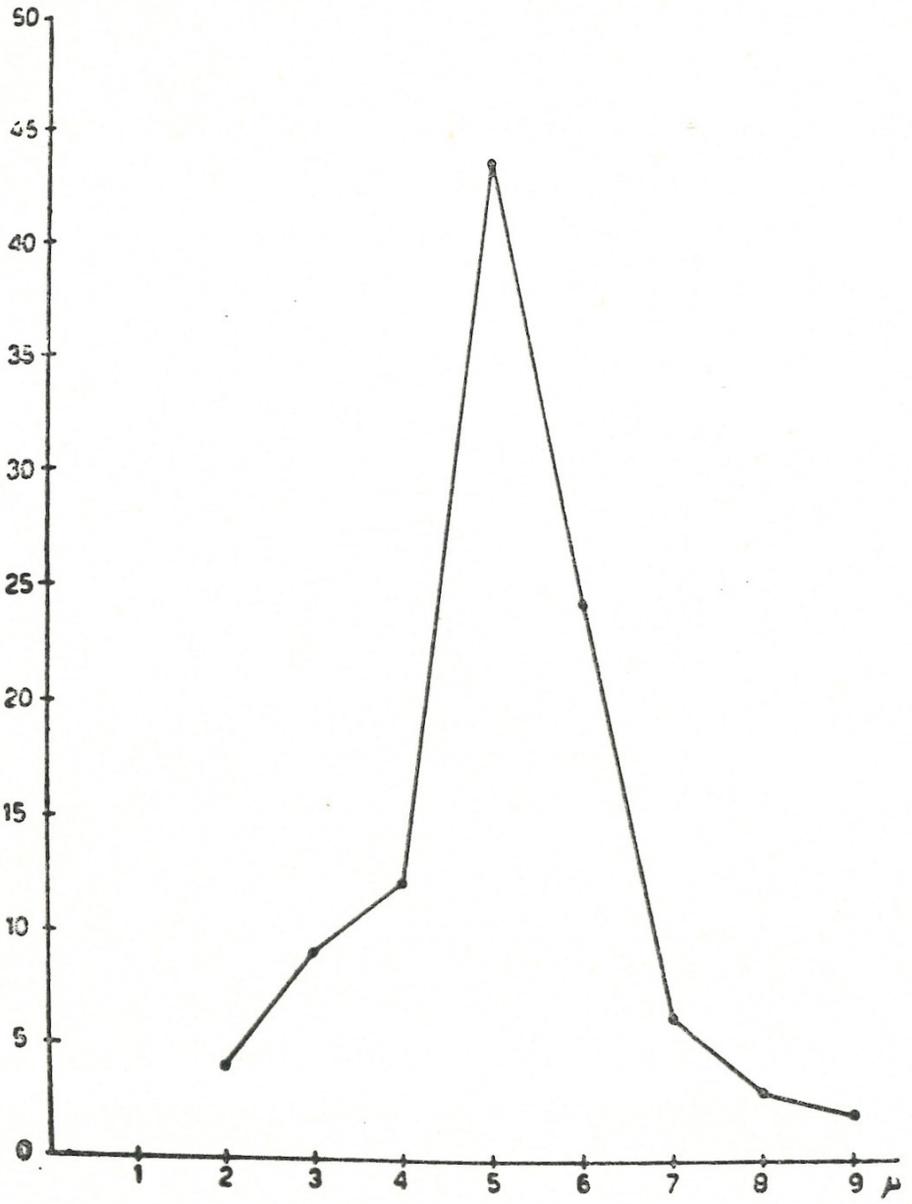


Grafico 3.

Distribuzione di frequenza della lunghezza di conidi di *Claviceps purpurea* F-122 ottenuti dallo stadio di melata della foglia.

costituito da cellule rettangolari, non ancora intimamente unite le une alle altre e contenenti una o due goccioline di grasso (Fig. 23).

Successivamente le cellule così formatesi, assieme alle ramificazioni delle ife, si addensano strettamente le une alle altre e costituiscono la struttura definitiva dello sclerozio (III strato o strato esterno (Fig. 24).

Questa successione regolare nella formazione dello sclerozio non si

presenta in tutti gli embrioni. Si osserva spesso che le ife che avvolgono e formano lo strato bianco esterno all'embrione o all'interno dei tessuti producono una grande quantità di conidi (*) di forma e dimensioni varie dai 7 ai 12 μ di lunghezza, per 5-7 μ di larghezza (Fig. 25), che contengono una o due gocciole di grasso e si differenziano dai conidi

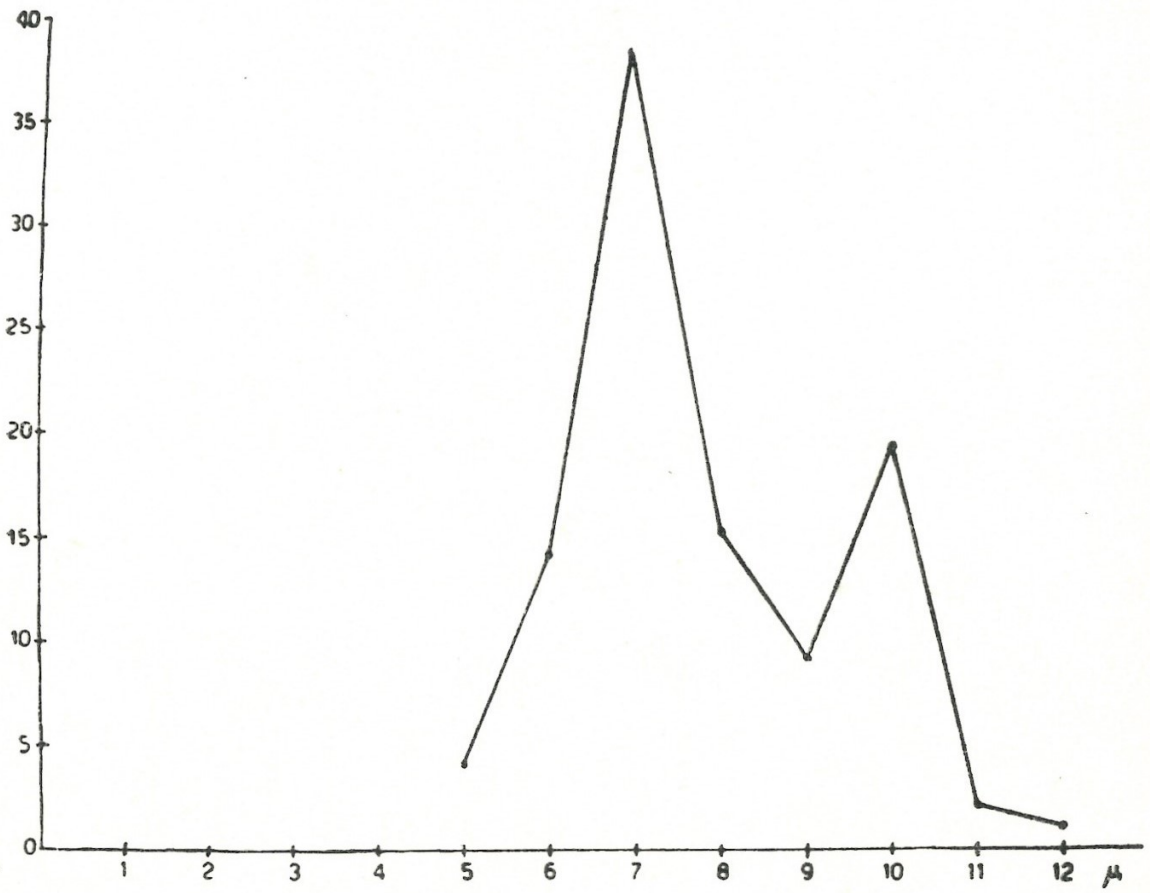


Grafico 4.

Distribuzione di frequenza della lunghezza delle Artrospore o conidi di Claviceps purpurea F-122, ottenuti da sclerozi embrionali.

di *Sphaecelia* per una diversa distribuzione della frequenza della lunghezza dei conidi (grafici 3 e 4).

Tali formazioni si originano da conidiofori lunghi 10-16 μ, riuniti in ammassi a forma di coppa, oppure per divisione diretta apicale delle ife che costituiscono lo stadio iniziale del futuro sclerozio. Questa forma, che è simile a quella ottenuta quando la *Claviceps purpurea* cresce in coltura sommersa ([40]), non è accompagnata da secrezione di particolari

(*) Il Prof. Raper è dell'opinione che queste particolari forme siano Artrospore, dal momento che si possono originare anche per settazione apicale di ife.

sostanze zuccherine, sicchè si differenzia molto bene dalla forma nota sugli organi fiorali o su altre parti della pianta. I conidi così formatisi possono rimanere inglobati tra le ife che formeranno la struttura definitiva dello sclerozio.

Lo sclerozio che si forma nell'embrione raggiunge la forma definitiva dopo circa due mesi. A quest'epoca esso è formato da una parte interna di 200-300 μ di spessore e da una parte corticale di 50-80 μ. Le cellule sono poligonali di 10-12 μ di diametro contenenti una grande quantità di gocciole di grasso, di colore bruno-violaceo nella parte corticale e bruno chiaro nella parte midollare.

Questi sclerozi non presentano mai all'interno residui di stadi conidiali di *Sphaecelia*.

Nelle parti aeree della pianta si possono distinguere tre diversi modi di formazione e di localizzazione degli sclerozi.

Sul culmo essi sono localizzati in un determinato punto e si formano per addensamento e progressivo ingrossamento delle ife. All'interno degli sclerozi, che misurano 1,5-2 × 0,3-0,5 mm, si osserva il precedente stadio di *Sphaecelia* (Fig. 26, 29).

Sulla foglia gli sclerozi possono localizzarsi al centro del lembo (Fig. 27), cioè estendendosi ai lati della nervatura mediana; oppure possono invadere e trasformare in uno sclerozio la metà di una foglia (Fig. 28). Inizialmente essi sono costituiti da ife di 4-6 μ di diametro, con setti distanziati 12-13 μ, che si addensano un po' alla volta, formando la struttura definitiva dello sclerozio (Figg. 30, 31), inglobandone la precedente fase di *Sphaecelia*.

I conidi hanno una lunghezza media di 5-6 μ e presentano uno o due vacuoli, ma non gocciole di grasso.

Una terza formazione è quella di sclerozi interni. Le ife talvolta formano degli ammassi scleroziali lungo i fasci fibrovascolari (Fig. 32) o in lacune del parenchima; lacune prodotte in seguito alla crescita del micelio che ha alterato la struttura normale dei tessuti (Fig. 33).

Negli organi aerei della pianta si possono quindi distinguere sclerozi esterni, propri del culmo o delle foglie, e sclerozi interni, proprio dei fasci fibrovascolari e delle lacune del parenchima.

Alla maturità tutti gli sclerozi hanno struttura e colore simili a quelli che si trovano negli organi fiorali delle Graminacee.

I diversi zuccheri aggiunti al terreno nutritivo di White possono influenzare in modo contrastante la formazione dello sclerozio nelle piantine infettate. Infatti sclerozi molto grandi (5-6 mm di diametro) si ottengono nelle foglie e nel germinello quando la mannite sostituisce il saccarosio. La glicerina favorisce la formazione di sclerozi a struttura

lassa, bianchi, come avviene per i ceppi poco patogeni. Il lattosio invece inibisce la crescita della segala favorendo quindi uno sviluppo miceliale abbondante di tipo embrionale o coleoptilare, mentre il glucosio favorisce una abbondante produzione di melata e di sclerozi.

Le piantine, infine, cresciute in acqua distillata agarizzata, presentano un gran numero di sclerozi particolarmente sulle foglie.

IV - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. ha la possibilità di infettare l'embrione e tutte le parti aeree della pianta ospite. L'inoculo di conidi nell'embrione permette inoltre una maggiore percentuale d'infezione, mentre la coltura della piantina in condizioni sterili e controllate di nutrizione favorisce lo studio dell'infettività e del modo di propagazione del micelio nei tessuti della pianta ospite. Il fungo trova inoltre nell'embrione tutte le condizioni nutrizionali necessarie alla formazione degli sclerozi. Questi risultati si discostano da quelli illustrati da Garey ([41]), che non ha ottenuto sclerozi su radici o embrioni distaccati dal seme. Molto probabilmente ciò potrebbe essere dovuto alla varietà di segala, o ai diversi ceppi di *Claviceps purpurea* impiegati.

Nelle radici, il fungo non si sviluppa. Anche nell'embrione stesso il micelio arresta la crescita a contatto della radichetta e della coleoriza.

Sclerozi si possono ottenere, oltre che sul culmo, anche sulle foglie.

Nell'embrione lo sclerozio si origina per progressivo ingrossamento e ravvicinamento di ife. Il micelio che formerà lo sclerozio presenta inoltre setti più ravvicinati. Nelle foglie e nel culmo il processo di formazione dello sclerozio è fondamentalmente lo stesso; tuttavia si osserva uno stadio intermedio conidico, rappresentato da gocce di melata, con produzione di conidi delle dimensioni normali di 4-6 × 2-3 μ, portati da conidiofori di 15-20 μ di lunghezza, esterni alla superficie dello sclerozio o raccolti in lacune interne di 60-100 μ di larghezza. Questi conidi rappresentano lo stadio tipico di *Sphaecelia segetum* Lev. Nell'embrione, invece, tale stadio è rappresentato da conidi o artrospore di maggiori dimensioni (7-12 × 4-7 μ), che contengono una o due gocce di grasso, e che si originano o per divisione apicale delle ife (la distanza tra i setti delle ife è infatti di 6-12 μ, uguale cioè alle dimensioni dei conidi), o da conidiofori, ravvicinati tra di loro in numero variabile da 10 a 30, in forma di coppa.

Alla maturità questi conidi rimangono inglobati tra le cellule isodiametriche o poligonali dello sclerozio. Questi conidi potrebbero essere con-

siderati come forme particolari o aberranti di cellule sclerozíali o forme intermedie e prescleroziali del vero sclerozio.

Schweizer (1941) riuscì ad ottenere sclerozi su embrioni sterilizzati chimicamente a freddo, risultati non confermati da Michener e Snell (1950). Bonns (1922), McCrea (1931), Baldacci (1946) e Abe (1951) descrivono forme sclerozíali di *Claviceps purpurea* ottenute in particolari terreni nutritivi agarizzati, o in coltura sommersa (Sim e Youngken, 1954).

Bermann e Youngken ([42]) usano invece omogenati di segala per favorire la crescita della *Claviceps purpurea*, non ottenendo tuttavia formazioni sclerozíali.

Sembrerebbe quindi che gli embrioni possano contenere sostanze formative dello sclerozio, sebbene tali formazioni siano state descritte anche in colture completamente artificiali.

A questo proposito sembra opportuno rilevare, come si è riferito più sopra, che embrioni morti in seguito a trattamento con il freddo (—20°C per 48 ore) offrono ancora al fungo possibilità di formare veri sclerozi (Fig. 34). D'altra parte la cariosside, privata dell'embrione non rivela questa condizione.

Infine su embrioni vitali, distaccati dalla cariosside, inoculati con conidi di *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. e posti germinare su terreno nutritivo di White, non si producono sclerozi.

Dobbiamo inoltre ricordare che gli sclerozi ottenuti su embrioni vivi, non distaccati dalla cariosside, sono molto più grandi di quelli ottenuti su embrioni morti.

Da questi dati sembrerebbe quindi di poter concludere che le sostanze formative dello sclerozio sono contenute e limitate nell'embrione. Queste sostanze potrebbero formarsi durante i primi stadi di sviluppo della piantina (gli sclerozi si formano infatti anche sul coleoptile o sul culmo o sulle foglie) tuttavia potrebbero essere utilizzate dalla piantina qualora l'embrione non abbia più a disposizione le sostanze di riserva contenute nella cariosside: in questo caso non si formerebbero gli sclerozi.

Riassumendo si potrebbe proporre il seguente schema:

Formazione di sclerozi in varie parti della pianta (Segala Rosen 4n).

Parti della piantina	Sviluppo del fungo
Cariossidi con embrione	Sclerozio grande (2-3 × 3-3 mm)
Cariossidi senza embrione	Micelio
Embrione morto senza cariosside	Sclerozio piccolo (1-2 × 1-2 mm)
Embrione vitale senza cariosside	Micelio

Inoculo nell'embrione con ceppo F-122 di *Claviceps purpurea* (Fr. Tul.) Gli embrioni o le cariossidi sono poste sulla superficie inclinata del terreno nutritivo di White con saccarosio. Crescita a temperatura ambiente (20-23° C) ed a luce diffusa.

Sembrerebbe inoltre che la patogeneità di un ceppo sia direttamente proporzionale alla capacità di formare sclerozi maturi. Infatti sia i ceppi poco virulenti (F-1, F-8/1, F-99) sia le varietà resistenti (Segala Stirpe 18) presentano sclerozi bianchi, immaturi, mentre i ceppi fortemente patogeni (F-122) producono sclerozi, con la parte corticale di colore violaceo, del tutto uguale a quella presentata dagli sclerozi naturali.

Sembra infine interessante far rilevare come anche in « vitro » sia possibile osservare tanto una diversa resistenza di specie e varietà di cereali all'attacco del fungo patogeno, quanto una diversa virulenza di vari ceppi di *Claviceps*.

Lo studio della composizione chimica del terreno nutritivo ([43, 44, 45]) potrebbe quindi favorire l'interpretazione di molti fenomeni di fisiopatologia.

Ringrazio sentitamente il Prof. E. B. Chain F.R.S. per gli utili consigli e per il costante, vivo interessamento; il Prof. V. Grasso per i vari ceppi di *Claviceps* e per i suggerimenti datimi; il Prof. R. W. Lewis per un ceppo di *Claviceps purpurea* e per i semi di Segala Rosen 2n e 4n inviatimi.

Un particolare ringraziamento desidero esprimere al Dr. A. Carilli per le utili critiche e le correzioni apportate al manoscritto oltre che per l'aiuto durante lo svolgimento di queste ricerche.

Ringrazio inoltre il Sig. M. Carugno per l'esecuzione dei disegni; il Sig. G. Bocci per l'aiuto materiale e tecnico; il Comm. A. Piccirilli per le fotografie.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internazionale di Chimica Microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

([1]) Gaüman E. - Plant infection - Crosby Lockwood & Son. Ltd., London (1950).
([2]) Atanasoff D. - Ergot of grains and grasses. Office of Cereal Investigations. Bureau of Plant Industry, United States Department of Agriculture, 127: (1920).
([3]) Barger G. - Ergot and ergotism. London-Guerney & Jackson (1931).
([4]) Gaüman E. - The Fungi - Hafner Publishing Company, London (1952).
([5]) Grasso V. - Ann. Sper. agr. (Nuova Serie) (1952).
([6]) Grasso V. - Ann. Sper. agr., 8: 1 (1954).
([7]) Stoll A. e Brack A. - Schweiz. Bot. Gesan. Ber., 54: 252 (1944).
([8]) Cherewick J. W. - Phytopathology, 43: 461 (1953).
([9]) Lewis R. W. - Phytopathology, 46: 295 (1956).
([10]) Tulasne L. R. - Ann. Sci. nat., 3 Sér. Bot., 20: 5 (1853).
([11]) Kirchoff H. - Zbl. Bakt., Parasiten., Infektionsk. Abt., 2, 77: 310 (1929).
([12]) Békésy N. - Phytopath. Z., 26: 49 (1956).
([13]) Milovidov P. - Preslia, 26: 425 (1954).

(14) Bonns V. - Am. J. Bot., 9: 339 (1922).
(15) McCrea A. - Am. J. Bot., 18: 50 (1931).
(16) Badacci E. - Farmaco, 1: 110 (1946).
(17) Michener H. D. e Snell N. - Am. J. Bot., 37: 52 (1950).
(18) Abe M. - Ann. Rep. Takeda Research Laboratory, 10: 73 (1951).
(19) Schweizer G. - Phytopath. rankh., 13: 317 (1941).
(20) Sim S. K. e Younggren H. W. - J. am. Pharm. Ass. sci. Ed., 43: 429 (1954).
(21) Nitsch J. P. - Amer. Jour. Bot., 38: 566 (1951).
(22) White P. R. - The cultivation of animal and plant cells. The Renald Press Company, New York (1954).
(23) Raper K. B. e Thom C. - Manual of Penicillia. The William & Wilkins Company. Baltimore (1949).
(24) Langéron M. - Précis de Mycologie, Masson et Cie Editeurs, Paris (1952).
(25) Sass J. E. - Botanical microtechnique, II Edition, The Iowa State College Press. Ames. (1951).
(26) Ball E. - Am. J. Bot., 28: 233 (1941).
(27) Stougthon R. A. - Ann. Appl. Biol., 17: 162 (1930).
(28) Wright W. A. e Skoric V. - Phytopathology, 18: 803 (1928).
(29) Cartwright K. H. G. - Ann. Bot. Lond., 43: 412 (1929).
(30) Walker J. C. - Plant pathology. McGraw Hill Book Co. Inc. (1950).
(31) Krabs J. - Ber. Schweizer Bot. Gesell., 47: 71 (1936).
(32) Lewis R. W. - Phytopathology, 35: 353 (1945).
(33) Mastenbroeck C. e Oort A. J. P. - Tijderschr. over Plantenziekten, 47: 165 (1941).
(34) Lewis R. W. - J. Amer. Pharm. Assoc., 37: 511 (1948).
(35) Gaüman E. - Advances in Enzymology, 11: 401 (1951).
(36) Wardlaw C. W. - Embriogenesis in plants. London, Methuen & Co. Ltd. (1954).
(37) Gola G., Negri G. e Cappelletti C. - Trattato di Botanica. II Edizione, UTET, Torino (1946).
(38) Hector J. M. - Introduction to the botany of field cropos. Vol. I. Cereals. (1936).
(39) Percival J. - The weath plant. London, Duckworth & Co. (1921).
(40) — Osservazioni non pubblicate.
(41) Garay A. St. - Physiologia Plantarum, 9: 350 (1956).
(42) Berman M. L. e Youngken H. W. - J. Am. Pharm. Ass., 43: 200 (1954).
(43) Forsyth F. R. - Nature, 179: 217 (1951).
(44) Kerr A. e Flentye N. T. - Nature, 179: 204 (1957).
(45) Lewis R. W. - The American Naturalist, 87: 273 (1953).