Recenti acquisizioni sul determinismo della batteriosi del cardoncello (*Pleurotus eryngii*)

N. S. Iacobellis e P. Lo Cantore
Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro Forestali, Università degli Studi della Basilicata.

*Da carpofori di cardoncello (*Pleurotus eryngii*) con sintomi tipici di "ingiallimento" sono stati sempre isolati batteri appartenenti al gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti. La maggior parte di essi sono risultati capaci di alterare, sia pure con minore intensità dei ceppi di* P. tolaasii, *blocchetti di pseudotessuto ricavati da carpofori di* Agaricus bisporus. *Una parte di essi, nel saggio della linea bianca, hanno formato precipitato in agar quando fatti accrescere vicino al ceppo tipo di* P. tolaasii, *mentre i restanti isolati sono risultati negativi in tale saggio. Gli isolati batterici risultati positivi nel saggio della linea bianca, quando valutati per i caratteri nutrizionali differenziali dei batteri patogeni dei funghi coltivati, hanno presentato i caratteri tipici di* P. "reactans", *una entità batterica non ancora tassonomicamente definita.*

Tali ceppi, nei saggi di patogenicità su carpofori di P. eryngii *hanno causato lesioni brune e superficiali e, quando inoculati in confezioni di substrato infungato con micelio di* P. eryngii *ed in produzione, hanno riprodotto i sintomi della batteriosi. Talvolta, però, la malattia è stata osservata anche su carpofori sviluppatisi su confezioni trattate con acqua distillata sterile. Da tali funghi alterati sono stati sempre isolati batteri identificati come ceppi di* P. "reactans" *e di* Pseudomonas *sp. del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti. Apparentemente tali batteri possono essere già presenti nelle confezioni di substrato infungato e/o nel terriccio utilizzato per la copertura delle stesse e risultare, quindi, capaci di causare, come successo nelle condizioni di saggio, la malattia.*

I risultati ottenuti indicano chiaramente che P. "reactans" *è l'agente causale dell' "ingiallimento" di* P. eryngii.

Parole chiave: *funghi coltivati,* Pleurotus eryngii, Pseudomonas tolaasii, Pseudomonas "reactans",

From the sporocarps of Pleurotus eryngii *showing the typical symptoms of yellowing, bacteria belonging to the group V of fluorescent pseudomonads have been consistently isolated. The majority of the above isolates caused the alteration of blocks of* Agaricus bisporus *flesh although the intensity of symptoms was lower than that caused by strains of* Pseudomonas tolaasii. *One group of the above isolates, when assayed for the white line reaction, formed a precipitate in agar when grown near the type strain of* P. tolaasii *whereas another group was negative in the assay. The bacteria resulted positive in the white line assay had the nutritional characters of* P. "reactans", *a bacterial entity not yet classified.*

In the pathogenicity assays carried out inoculating either whole sporocarps or compost bags during the differention of primordia of P. eryngii, strains of P. "reactans" *induced superficial brown lesions and the typical symptoms of yellowing, respectively. In the latter assay however, in some cases the disease was also observed on sporocarps that developed from control compost bags treated with distilled sterile water. From the latter sporocarps, bacteria identified as* P. "reactans" *and* Pseudomonas *sp. belonging to the V group of fluorescent pseudomonads were consistently isolated. These bacteria seem to be present in the compost bags of* P. eryngii *and/or in the soil or compost used to cover the producing substrate. In the assay condition, they seem to account for disease development on* P. eryngii.

The findings of this study strongly indicate that P. "reactans" *is the causal agent of the yellowing of* P. eryngii.

Key words: *cultivated mushrooms,* Pleurotus eryngii, Pseudomonas tolaasii, Pseudomonas "reactans", Pseudomonas *sp., yellowing, bacterial diseases.*

Lavoro realizzato con il contributo finanziario del Ministero per le Politiche Agricole nell'ambito del progetto "Miglioramento della produzione del cardoncello".

Introduzione

In alcune aree centro-meridionali del nostro Paese e, in particolare, in Puglia e Basilicata, si è andata sempre più diffondendo la coltivazione del cardoncello (*Pleurotus eryngii*). La produzione nazionale del fungo, stimata per oltre 500 t (**3**), è destinata esclusivamente al mercato fresco.

La coltivazione del cardoncello, realizzata in aiuole sia in serre condizionate che in tunnel, è complicata dalla frequente comparsa di alterazioni causate da batteri non ben identificati e apparentemente riconducibili a *Pseudomonas tolaasii* (**2**). Le perdite di produzione dovute a tali alterazioni possono essere notevoli e hanno spinto non pochi agricoltori ad abbandonare detta coltura.

La malattia, nota come "ingiallimento" o più comunemente "batteriosi" del cardoncello, si manifesta sul pileo con decolorazioni inizialmente di colore nocciola chiaro, che virano, poi, al marrone-rossastro. Sullo stipite i sintomi sono rappresentati da aree idropiche, spesso allungate e confluenti, che acquistano successivamente colore bruno-rossastro. In condizioni di elevata umidità, i carpofori possono essere ricoperti di essudato batterico (fig. 1). I funghi alterati presentano internamente aree idropiche che col tempo necrotizzano.

I carpofori possono essere colpiti in ogni stadio di sviluppo e manifestare, conseguentemente, arresto di crescita e marciume molle con emanazione di odore sgradevole.

Lo sviluppo della malattia e il suo andamento hanno aspetti particolari. L'alterazione può comparire, infatti, in maniera distruttiva in prima volata per, poi, scomparire del tutto nella seconda. In altri casi, la prima volata risulta normale mentre la seconda è completamente compromessa dalla batteriosi. Altre volte la malattia ha uno sviluppo tale da distruggere la produzione intera.

I primi studi sull'eziologia della malattia (**5**) hanno portato all'isolamento da carpofori alterati, provenienti da diverse fungaie della Puglia e della Basilicata, di batteri del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti (**7**), di cui, tra l'altro, fa parte *P. tolaasii*. Tali batteri, sulla base della patogenicità su blocchetti di pseudotessuto ricavati da carpofori di *Agaricus bisporus* (**1**) e della risposta nel saggio della linea bianca (**9**), sono risultati diversi da *P. tolaasii* (**5**).

Vista la notevole pericolosità dell'"ingiallimento" nella coltura del cardoncello, sono stati recentemente ripresi gli studi sulla sua eziologia e qui di seguito sono riportati i risultati ottenuti.

Materiali e metodi

Isolamenti batterici

Gli isolamenti di batteri da carpofori di *P. eryngii* con sintomi di "ingiallimento" sono stati effettuati sul substrato B di King (KB) seguendo le tecniche usuali (**7**). Le colonie batteriche con diversa morfologia e rappresentative delle piastre di isolamento sono state prelevate e ristrisciate sullo stesso substrato. Tutte le colture pure sono state valutate per la patogenicità su blocchetti di pseudotessuto ricavati da carpofori di *Agaricus bisporus* (**1**) e, per la risposta nel saggio della linea bianca (**9**). Allo scopo ceppi autentici di *Pseudomonas tolaasii* e di *P. "reactans"* sono stati utilizzati per confronto. Gli isolati batterici sono stati mantenuti a 4°C su agar nutritivo contenente il 2% di glicerolo e/o a - 80°C in presenza del 30% di glicerolo.

Le sottocolture degli isolati sono state effettuate sul substrato KB.

Saggi di patogenicità

I saggi di patogenicità su blocchetti di pseudotessuto ricavati da carpofori di *Agaricus bisporus* sono stati effettuati seguendo la procedura descritta da Ercolani (**1**). Alcuni degli isolati batterici risultati capaci di alterare tali pseudotessuti sono stati utilizzati anche nei saggi di patogenicità su carpofori di *Pleurotus eryngii* (ceppo E^+) e/o su confezioni del fungo in produzione.

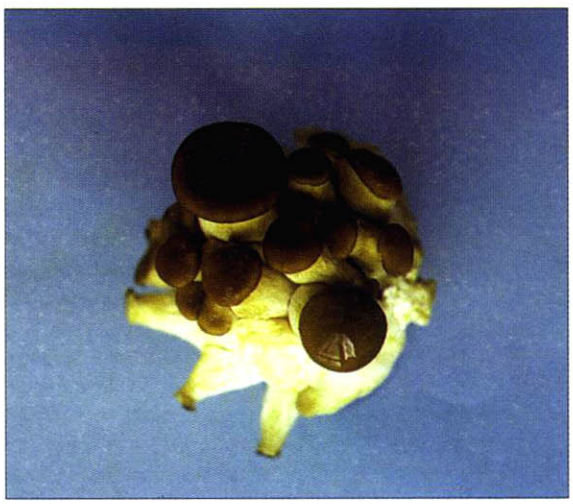

Figura 1- Carpofori di cardoncello coltivato con sintomi di "ingiallimento".

In tali prove, aliquote di 10 µl di sospensioni batteriche contenenti 10^8 u.f.c./ml sono state deposte e iniettate mediante siringhe ipodermiche sterili, rispettivamente sulla cuticola e nella carne

di carpofori del ceppo E^+ di *P. eryngii* in diverso stadio di sviluppo e sulla superficie di confezioni di substrato infungato con lo stesso ceppo del fungo, messe a dimora da circa 10 giorni e presentanti piccoli carpofori con pilei di diametro non superiore ad un cm.

Inoculazioni con ceppi autentici di *Pseudomonas tolaasii* e di *P. "reactans"* e trattamenti con acqua distillata sterile sono stati utilizzati come testimoni.

Caratterizzazione degli isolati batterici

La capacità degli isolati batterici di formare precipitato nel substrato KB quando accresciuti vicino a colonie di *Pseudomonas tolaasii* e/o di *P. "reactans"* è stata valutata seguendo la procedura di Wong e Preece (**9**). Gli isolati batterici risultati positivi nei diversi saggi di patogenicità e rappresentativi dei diversi isolamenti sono stati valutati per i caratteri LOPAT (**7**) e per quelli nutrizionali differenziali per i batteri patogeni dei funghi coltivati (**4**). Ceppi autentici dei batteri patogeni dei funghi coltivati sono stati utilizzati come confronto.

Risultati e discussione

Da carpofori di *P. eryngii* con sintomi di "ingiallimento", provenienti da fungaie ubicate in Puglia e Basilicata, sono stati ottenuti sostanzialmente batteri capaci di produrre pigmenti fluorescenti quando accresciuti sul substrato B di King. La maggior parte di essi hanno alterato i blocchetti di pseudotessuto ricavati da carpofori di *Agaricus bisporus*. L'intensità delle alterazioni è, comunque, risultata inferiore a quella causata da ceppi autentici di *P. tolaasii* utilizzati come confronto (fig. 2).

Una parte di tali isolati batterici, ottenuti costantemente nei diversi isolamenti, sono risultati positivi nel saggio della linea bianca (**9**), e, in particolare, hanno formato un precipitato in agar quando fatti accrescere vicino al ceppo tipo NCPPB2192 di *P. tolaasii*. Tale risultato non è stato ottenuto quando i suddetti isolati sono stati fatti accrescere vicino al ceppo NCPPB1311 di *P. "reactans"* (**9**). Gli altri isolati batterici, ottenuti insieme ai precedenti nei diversi isolamenti, sono risultati negativi nel saggio.

Tutti gli isolati batterici hanno presentato i caratteri LOPAT del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti (**7**). Gli isolati batterici positivi nel saggio della linea bianca, quando saggiati per i caratteri nutrizionali differenziali dei batteri patogeni dei funghi coltivati (**4**), hanno presentato i caratteri tipici di *P. "reactans"*, una entità batterica non ancora classificata (**4, 9**).

I saggi di patogenicità sulle confezioni di substrato infungato in produzione di *P. eryngii* con ceppi di *P. "reactans"*, non sempre hanno dato un esito chiaro e definitivo. Infatti, sebbene tali ceppi siano risultati capaci di riprodurre i sintomi della batteriosi, talvolta, gli stessi sintomi sono stati osservati su carpofori prodotti da confezioni di substrato non inoculate e/o trattate con acqua distillata sterile. Dai suddetti funghi alterati sono stati sempre isolati batteri con i caratteri biochimici, nutrizionali e patogenetici di *P. "reactans"* (**1, 4, 7, 9**) ed altri batteri con i caratteri LOPAT del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti (**7**). Evidentemente tali batteri sono presenti nelle confezioni di substrato infungato in produzione e/o nel terriccio utilizzato per coprirne la superficie; essi, nelle condizioni di saggio, sembrerebbero, quindi, capaci di causare la malattia.

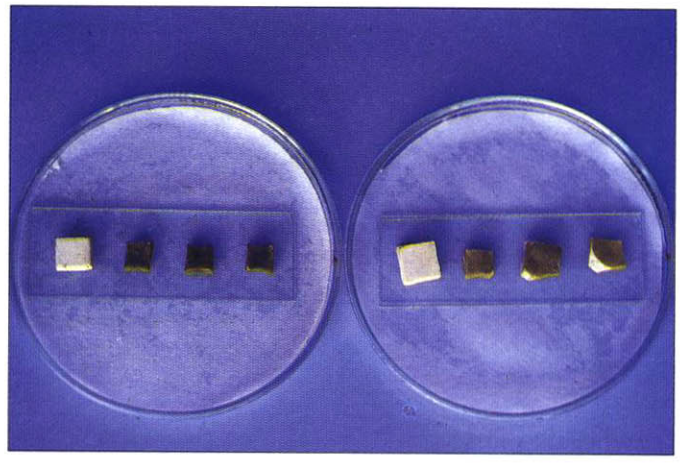

Figura 2 - Sintomi su blocchetti di pseudotessuto ricavati da carpofori di Agaricus bisporus *ed inoculati con* Pseudomonas tolaasii (a) *e* P. "reactans" (b). *I blocchetti a sinistra di ogni piastra sono stati trattati con acqua distillata sterile.*

L'uso nelle stesse prove di patogenicità di un ceppo di *P. "reactans"* naturalmente resistente alla rinfampicina ha permesso di dimostrare, almeno in parte, i postulati di Koch. In questo caso, infatti, dai carpofori inoculati artificialmente con il suddetto ceppo di *P. "reactans"* e che mostravano i sintomi di "ingiallimento", sono stati isolati, oltre a batteri Resistenti alla rinfampicina con le stesse caratteristiche del ceppo di *P. "reactans"* utilizzato nelle inoculazioni artificiali, altri batteri

non resistenti all'antibiotico, alcuni dei quali, con i caratteri di *P. "reactans"* (**4, 7, 9**) ed altri del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti (**7**).

In conclusione i risultati ottenuti indicano abbastanza chiaramente che *P. "reactans"* può essere considerato come responsabile dell' "ingiallimento" di *P. eryngii*. Il fatto che, in studi paralleli (Iacobellis e Lo Cantore, risultati non pubblicati), da un carpoforo di *P. eryngii* selvatico, che mostrava un'estesa area con ingiallimento del pileo, siano stati ottenuti batteri identificati come ceppi di *P. "reactans"*, rinforza tale possibilità. Non è escluso, comunque, che anche le pseudomonadi fluorescenti, isolate insieme con i ceppi di *P. "reactans"*, siano responsabili e/o contribuiscano, come dimostrato nel caso dell' "ingiallimento" di *P. ostreatus* (**6**), allo sviluppo dei sintomi dell' "ingiallimento" su *P. eryngii*.

P. "reactans", come in precedenza accennato, è una entità batterica non ancora classificata che viene utilizzata per l'identificazione di *P. tolaasii* nel saggio della linea bianca (**9**). Tale batterio è ritenuto un saprofita ma recentemente è stato dimostrato che esso è in grado di causare l'imbrunimento di carpofori di *A. bisporus* (**6, 8**) ed è risultato responsabile, insieme con *P. tolaasii* ed altre pseudomonadi fluorescenti, dell' "ingiallimento" di *P. ostreatus* (**6**). I ceppi di *P. "reactans"*, sebbene siano differenziabili da quelli di *P. tolaasii* per alcuni caratteri nutrizionali (**4**), per la patogenicità (**6**) e per la risposta nel saggio della linea bianca (**9**), sembrano molto prossimi a questi ultimi. Infatti, ceppi di *P. "reactans"* isolati in questo studio, valutati per la capacità di utilizzare 95 diverse sostanze organiche con il sistema computerizzato "Biolog", sono stati identificati come ceppi di *P. tolaasii*.

Da carpofori di *P. eryngii* con i sintomi dell' "ingiallimento", non sono mai stati ottenuti batteri riconducibili in senso stretto a *P. tolaasii* (**4, 7, 9**). Inoltre, quando gocce di sospensioni di ceppi di *P. tolaasii* sono state deposte sulla superficie di carpofori di detta specie di *Pleurotus* o iniettate nei carpofori mediante siringa ipodermica, sono state osservate lesioni bruno scure e depresse. In questi saggi di patogenicità, i ceppi di *P. "reactans"* hanno causato lesioni brune e superficiali. Questi sintomi, a differenza di quelli comparsi a seguito di infezione artificiale con ceppi di *P. tolaasii*, sono più verosimilmente riconducibili a quelli tipici dell' "ingiallimento" di *P. eryngii*.

Ringraziamenti

Ricerche effettuate in parte con finanziamenti del Ministero della Università e Ricerca scientifica e Tecnologica (MURST) e della Regione Basilicata.

BIBLIOGRAFIA

1) ERCOLANI G. L., 1970. *Primi risultati di osservazioni sulla maculatura batterica dei funghi coltivati* [Agaricus bisporus *(Lange) Imbach] in Italia: identificazione di* Pseudomonas tolaasii *Paine*. Phytopathologia mediterranea, 9, 59-61.

2) FERRI F., 1990. *La coltivazione del cardoncello e di altre specie fungine in Italia meridionale*. Professione Agricoltore, 2 (2), 10-11.

3) FERRI F., 1985. *I funghi. Micologia, isolamento coltivazione*. Edagricole, Bologna, 398 pp.

4) GOOR M., VANTOMME R., SWINGS J., GILLIS M., KERSTERS K. and DE LEY J., 1986. *Phenotypic and genotypic diversity of* Pseudomonas tolaasii *and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms*. Journal of General Microbiology, 132, 2249-2264.

5) IACOBELLIS N. S. e LAVERMICOCCA P., 1990. *Batteriosi del cardoncello: aspetti eziologici e prospettive di lotta*. Professione Agricoltore, 2 (2), 32-33.

6) IACOBELLIS N. S. and LO CANTORE P., 1997. *Bacterial diseases of cultivated mushrooms in southern Italy*. Proceedings of X Congress of Mediterranean Phytopathological Union, Montpellier, 2-6 june, 33-37.

7) LELLIOTT R. A. and STEAD D. E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Methods in Plant Pathology, vol 2, T. F. Preece ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 216 pp.

8) WELLS J. M., SAPERS G. M., FETT W. F., BUTTERFIELD J. E., JONES J. B., BOUZAR H. and MILLER F. C., 1996 - *Postharvest discoloration of the cultivated mushrooms* Agaricus bisporus *caused by* Pseudomonas tolaasii, P. "reactans", *and* P. "gingeri". Phytopathology, 86, 1098-1104.

9) WONG W. C. and PREECE T. F., 1979. *Identification of* Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests*. Journal of Applied Bacteriology, 47, 401-407.