Studi sull'eziologia dell'ingiallimento dell'ostricone (*Pleurotus ostreatus*)

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

La caratterizzazione dei batteri ottenuti da carpofori di ostricone (Pleurotus ostreatus) *con diversi sintomi della batteriosi nota come "ingiallimento" ha indicato che la maggior parte di essi sono delle pseudomonadi fluorescenti, comunque, differenti per alcuni caratteri nutrizionali, per la risposta nel saggio della linea bianca e per la patogenicità. In particolare, da lesioni di colore bruno-arancio, depresse e circondate da aloni giallastri presenti su carpofori di* P. ostreatus, *sono stati sempre isolati batteri che hanno formato precipitato biancastro quando fatti accrescere vicino a ceppi di* Pseudomonas "reactans". *Gli stessi batteri hanno causato imbrunimento, necrosi e successivo disfacimento di blocchetti di pseudotessuto di* Agaricus bisporus *e, inoltre, lesioni depresse e giallastre su carpofori interi di* P. ostreatus. *I suddetti caratteri, quelli biochimici (LOPAT) e nutrizionali sono tipici di ceppi di* P. tolaasii. *Inoltre, negli stessi isolamenti sono stati ottenuti anche altri batteri capaci di alterare blocchetti di pseudotessuto di* A. bisporus *e di causare lesioni giallastre e superficiali su carpofori interi di* P. ostreatus. *Comunque, l'intensità delle suddette alterazioni è risultata sempre inferiore a quella causata da ceppi di* P. tolaasii. *Tali isolati sono stati identificati, rispettivamente, come ceppi di* P. "reactans" *e di* Pseudomonas *sp. del V gruppo delle pseudomonadi fluorescenti. Questi ultimi hanno dato una risposta negativa nel saggio della linea bianca e si sono differenziati da* P. "reactans" *e* P. tolaasii *per alcuni caratteri nutrizionali.*
Da basidiocarpi di ostricone con lesioni giallastre e superficiali sono stati generalmente isolati batteri identificati come ceppi di Pseudomonas *sp. Da tali lesioni sono stati ottenuti, solo in alcuni casi, anche batteri identificati come ceppi di* P.

"Pani" di substrato infungato con Pleurotus ostreatus, *messi in produzione in serra.*

The characterization of bacteria isolated from altered sporocarps of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) *with symptones of bacterial dsease known as "yellowing" showed that the majority of them were fluorescent pseudomonads which, however, differed in biochemical and nutritional characters, in their reaction in white line assay and in pathogenicity features. In particular, from reddish-brown blotches on* P. ostreatus *sporocarps, bacteria which formed whitish precipitate in agar when grown next to* Pseudomonas "reactans" *were consistently isolated. The above isolates caused pitted brown lesions on blocks of* Agaricus bisporus *flesh and, furthermore, sunken yellowish lesions on whole sporocarps of* P. ostreatus. *The above features, the biochemical (LOPAT) and nutritional characters were typical of* Pseudomonas tolaasii. *Furthermore, from the same specimens, other fluorescent pseudomonads capable of causing the alteration of* A. bisporus *tissues and whole sporocarps of oyster mushrooms were also obtained. However, the intensity of the alterations was less pronounced than those caused by strains of* P. tolaasii. *These isolates were identified as strains of* P. "reactans" *and* Pseudomonas *sp., respectively. The latter were negative in the white line assay and differed in some nutritional characters from both* P. tolaasii *and* P. "reactans".
From sporocarps of P. ostreatus *showing yellowish superficial lesions, bacteria identified as strains of* P. "reactans" *and* Pseudomonas *sp. were generally isolated. Only in a few cases bacte-*

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

"reactans" *e/o di* P. tolaasii.
I risultati ottenuti indicano che i batteri descritti possono essere considerati responsabili dell'"ingiallimento" di P. ostreatus. *In particolare,* P. tolaasii *sembra causare lesioni di colore bruno-arancio depresse e decolorazioni giallastre, mentre* P. "reactans" *e* Pseudomonas *sp. causerebbero decolorazioni giallastre sul pileo dei carpofori infetti.*
Parole chiave: *funghi coltivati,* Pleurotus ostreatus, *malattie batteriche, ingiallimento,* Pseudomonas tolaasii, P. "reactans", Pseudomonas *sp.*

ria identified as P. tolaasii *and/or* P. "reactans" *were also obtained.*
These results clearly show that the above-described bacteria account for yellowing in P. ostreatus. *In particular,* P. tolaasii *seems to cause brown-orange blotches and yellow discolorations whereas* P. "reactans" *and* Pseudomonas *sp. appear to be mainly responsible for yellow discoloration of oyster mushroom pilei.*
Key words: *cultivated mushrooms,* Pleurotus ostreatus, *bacterial diseases, yellowing,* Pseudomonas tolaasii, P. "reactans", Pseudomonas *sp.*

Introduzione

La produzione italiana di funghi coltivati è, secondo i dati ISTAT riferiti al 1993, pari a 655.731 q (**1**). Il fungo oggetto di più intensa coltivazione è il prataiolo (*Agaricus bisporus*), la cui produzione costituisce, infatti, circa l'80% di quella totale. La restante quota è costituita essenzialmente da ostricone (*Pleurotus ostreatus*) e poche altre specie (**9**).

La produzione dell'ostricone è destinata esclusivamente al mercato fresco e ha avuto negli ultimi tempi un notevole incremento. Tale fenomeno è dovuto ad una richiesta di mercato abbastanza sostenuta ed alla sostanziale semplicità della tecnica produttiva, che, infatti, non richiede impianti sofisticati o strutture costose necessari, viceversa, per la coltivazione del prataiolo.

Figura 1 - Carpofori di Pleurotus ostreatus *ingialliti e con arresto dello sviluppo.*

Durante la coltivazione, in serre condizionate o in tunnel, l'ostricone può essere attaccato da una serie di patogeni e parassiti che sono causa di perdite di produzione. Sebbene non siano disponibili dati attendibili a tale riguardo si ritiene che le malattie ad eziologia batterica ne siano la causa principale (**3**, **4**). Tra di esse l'"ingiallimento" causato da *Pseudomonas tolaasii*, agente eziologico anche della maculatura bruna del prataiolo, è certamente la più dannosa (**3**, **4**).

La malattia interessa tutti gli stadi di sviluppo dei carpofori. Quando essa interessa la coltura all'atto della differenziazione dei primordi, i giovani carpofori presentano una colorazione giallo-arancio, quindi manifestano un arresto dello sviluppo ed avvizziscono. L'alterazione può interessare tutto un gruppo di giovani carpofori o solo parte di essi (fig. 1).

Sul cappello di carpofori maggiormente sviluppati, la malattia si manifesta con maculature depresse di colore bruno-arancio, spesso, circondate da aree ingiallite (fig. 2). Simili lesioni sono presenti anche sul gambo (fig. 3). Talvolta, i carpofori presentano aree ingiallite superficiali che possono interessare interamente o in parte il carpoforo (fig. 4).

In condizioni di elevata temperatura ed umidità i carpofori alterati marciscono rapidamente ed emanano odore sgradevole.

La frequente comparsa della batteriosi nelle coltivazioni di *P. ostreatus* in molte fungaie della Puglia e della Basilicata, le conseguenti perdite di prodotto e, in particolare, la varietà dei sintomi osservati ci ha indotti ad avviare studi volti a definire l'agente/i responsabile/i delle diverse alterazioni osservate.

Qui di seguito sono riportati i risultati ottenuti.

Materiali e metodi

Isolamenti batterici

Gli isolamenti di batteri da carpofori di *P. ostreatus* con sintomi di ingiallimento sono stati effettuati sul substrato B di King (KB) seguendo le tecniche usuali (**8**). 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* (**2**) e per la risposta nel saggio della linea bianca (**13**). 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 di Ercolani (**2**). Alcuni degli isolati batterici capaci di alterare tali tessuti sono stati utilizzati nei saggi di patogenicità su carpofori di *Pleurotus ostreatus*. Sulla superficie del pileo di carpofori a diverso livello di sviluppo sono state deposte gocce di 10 µl di sospensioni batteriche contenenti circa 10^8 ufc/ml. In alcuni saggi nell'area di applicazione delle gocce sui pilei sono state effettuate delle ferite con un ago sterile. Inoltre, aliquote delle suddette sospensioni sono state iniettate nei pseudotessuti dei carpofori mediante siringhe ipodermiche.

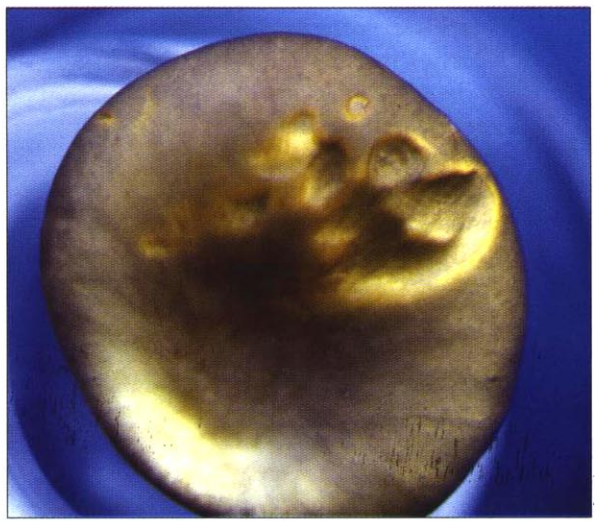

Figura 2 - Maculature bruno-arancio, depresse e circondate da aloni giallastri su pileo di carpoforo di Pleurotus ostreatus.

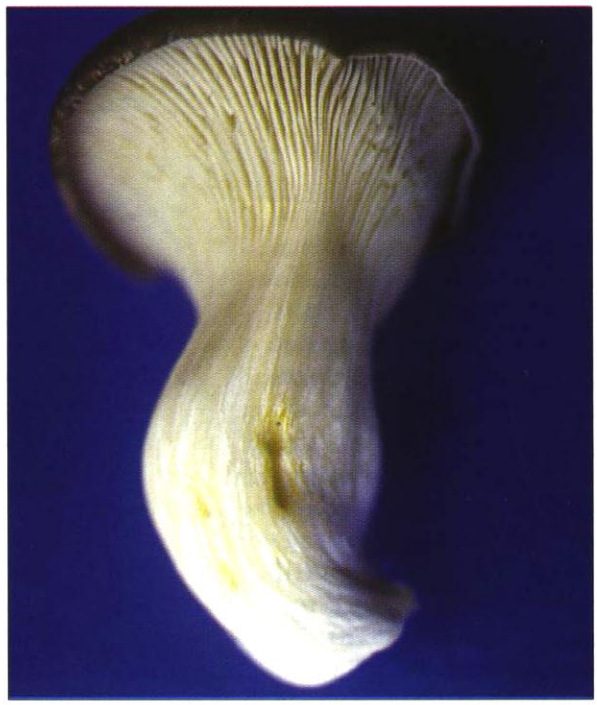

Figura 3 - Lesioni bruno-arancio e depresse su stipite di carpoforo di Pleurotus ostreatus.

In altri saggi la sospensione batterica è stata spruzzata sulla superficie di gruppi del fungo in sviluppo.

Ceppi autentici di *Pseudomonas tolaasii* e di *P. "reactans"* e trattamenti con acqua distillata sterile sono stati utilizzati come confronto.

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"* (saggio della linea bianca) è stata valutata seguendo la procedura di Wong e Preece (**13**). Gli isolati batterici risultati positivi nei diversi saggi di patogenicità e rappresentativi dei diversi isolamenti sono stati valutati per i caratteri LOPAT (**8**) e per quelli nutrizionali differenziali per i batteri patogeni dei funghi coltivati (**5**). Ceppi autentici di batteri patogeni dei funghi coltivati sono stati utilizzati come confronto.

Risultati e discussione

La quasi totalità dei tentativi di isolare batteri dai carpofori di ostricone con i diversi tipi di lesioni sono risultati positivi. Comunque, nelle piastre di isolamento, contenenti il substrato B di King (**8**), sono state osservate colonie con diversa morfologia. La maggior parte degli isolati batterici hanno prodotto sul suddetto substrato pigmenti fluorescenti mentre solo una parte di essi non hanno mostrato tale capacità.

Tutti gli isolati batterici che hanno prodotto pigmenti fluorescenti, hanno mostrato i caratteri LOPAT del V gruppo delle pseudomonadi fluorescenti (**8**). Comunque, essi sono risultati diversi per i caratteri nutrizionali differenziali dei batteri patogeni dei funghi coltivati (**5**), per la risposta nel saggio della linea bianca (**13**) e per la capacità patogenetica su blocchetti di pseudotessuto di *A. bisporus* (**2**) e su carpofori di ostricone.

In particolare, dalle maculature bruno-arancio, depresse e circondate da aloni giallastri presenti sui pilei e/o stipiti di *P. ostreatus* sono stati sempre isolati batteri che hanno formato precipitato in agar (**13**) quando fatti accrescere vicino al ceppo NCPPB1311 di *P. "reactans"*. Tali isolati hanno causato imbrunimento, necrosi e successivo disfacimento dei blocchetti di pseudotessuto di *A. bisporus* (**2**) e, inoltre, quando inoculati su carpofori di *P. ostreatus*, hanno causato sintomi di tipo diverso in relazione alla modalità di inoculazione. In particolare, essi hanno causato lesioni depresse sui carpofori inoculati quando aliquote delle loro sospensioni sono state introdotte all'interno degli stessi attraverso ferite o mediante siringhe ipodermiche (fig. 5). Al contrario, quando le stesse sospensioni sono state deposte sulle superfici integre del pileo, è stato successivamente osservato un ingiallimento dell'area inoculata che è risultata solo leggermente depressa. Le sospensioni del patogeno, quando nebulizzate su famigliole giovani di *P. ostreatus*, hanno causato ingiallimento, arresto della crescita e quindi avvizzimento delle stesse. In alcuni casi, nello stesso tipo di saggio, i carpofori hanno mostrato maculature depresse di colore bruno-arancio. Non è escluso che tali lesioni siano state causate dalla penetrazione del batterio all'interno del fungo attraverso microferite già presenti sui carpofori.

I suddetti caratteri, e quelli biochimici e nutrizionali (**5**), indicano che gli isolati batterici in considerazione sono ceppi di *P.*

Figura 4 - Lesione superficiale di colore giallastro su pileo di carpoforo di Pleurotus ostreatus.

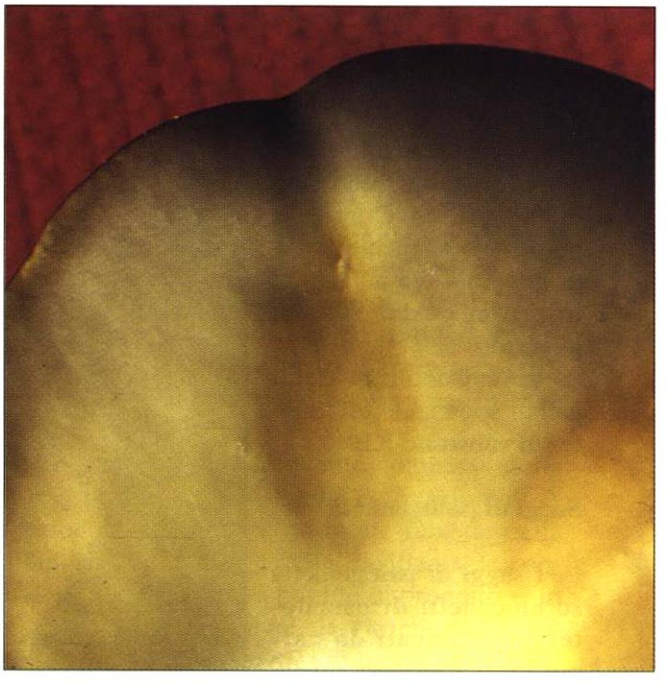

Figura 5 - Sintomi su carpoforo di Pleurotus ostreatus *inoculato, mediante siringa ipodermica, con sospensione batterica di* Pseudomonas tolaasii.

tolaasii. Alle stesse conclusioni si è giunti quando tali isolati sono stati valutati per la capacita di utilizzare 95 diversi composti organici con il sistema computerizzato "Biolog".

Dagli stessi campioni patologici sono stati sempre isolati, oltre a *P. tolaasii*, altri batteri con i caratteri biochimici del V gruppo delle pseudomonadi fluorescenti (**8**), che hanno causato imbrunimento di blocchetti di pseudotessuto di *A. bisporus* e, inoltre, hanno causato ingiallimento dei carpofori di *P. ostreatus*. Comunque, i sintomi sono risultati sempre meno intensi di quelli causati da ceppi di *P. tolaasii* utilizzati come confronto.

Taluni di tali isolati sono stati identificati come ceppi di *P. "reactans"*, una entità batterica non ancora classificata e ritenuta una forma saprofitaria (**13**). Infatti, essi hanno mostrato capacità di formare precipitato in agar quando fatti accrescere vicino al ceppo tipo NCPPB2192 di *P. tolaasii* (**13**) e gli stessi caratteri nutrizionali (**5**) di ceppi autentici di *P. "reactans"*. Essi, inoltre, hanno causato un marcato imbrunimento dei blocchetti di pseudotessuto di *A. bisporus* sebbene, al contrario di ceppi di *P. tolaasii* non ne abbiano determinato il disfacimento. Questi ceppi, quando inoculati su carpofori di *P. ostreatus*, hanno causato sempre l'ingiallimento (fig. 6) dei tessuti inoculati e, al contrario di *P. tolaasii,* non hanno mai causato sugli stessi lesioni depresse. La capacità di *P. "reactans"* di causare l'ingiallimento dei tessuti, osservato nei diversi saggi di patogenicità, è risultata inferiore a quella dei ceppi di *P. tolaasii* usati come testimone. Tale comportamento è stato osservato, in particolare, quando l'inoculazione è stata effettuata mediante nebulizzazione delle sospensioni del batterio su famigliole del fungo.

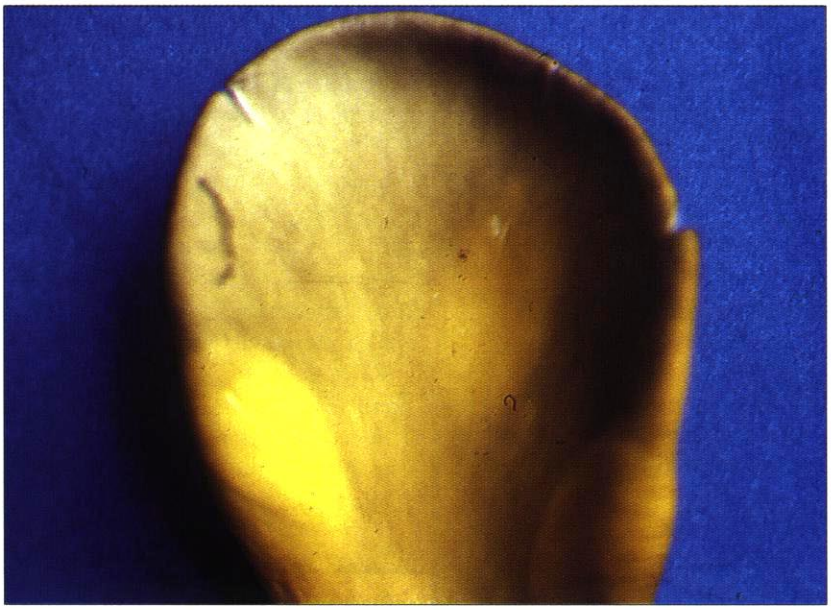

Figura 6 - Sintomi su carpoforo di Pleurotus ostreatus *inoculato, mediante siringa, con sospensione batterica di* Pseudomonas "reactans".

La presenza di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"* nei tessuti alterati è stata dimostrata dalla presenza di precipitato tra colonie di diversa morfologia nelle piastre di isolamento.

Gli altri isolati, con i caratteri patogenetici su blocchetti di pseudotessuto di *A. bisporus* simili a quelli di *P. "reactans"*, sono risultati negativi nel saggio della linea bianca (**13**) e diversi, inoltre, per alcuni caratteri nutrizionali (**5**), da quelli di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"*. In ogni caso, essi hanno condiviso più caratteri nutrizionali con *P. tolaasii* che con *P. "reactans"*, *P. agarici, P. "gingeri"* e ceppi di *Pseudomonas* sp. agenti causali del "mal della mummia" su *A. bisporus*. Solo alcuni di tali isolati hanno mostrato gli stessi caratteri biochimici e nutrizionali di *P. tolaasii* (**5**, **8**). Essi si sono differenziati da *P. tolaasii* per l'incapacità di produrre precipitato in agar quando fatti accrescere vicino al ceppo NCPPB2192 e al ceppo NCPPB1311, rispettivamente, di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"*. Essi inoltre, hanno causato l'imbrunimento dei blocchetti di *A. bisporus* senza determinare il disfacimento dei pseudotessuti inoculati. Tali ceppi sembrano essere ceppi ipovirulenti di *P. tolaasii* (**10**).

La dimostrazione che *P. "reactans"* sia patogeno per *P. ostreatus* è una novità. Questo batterio è utilizzato per la identificazione di *P. tolaasii* nel saggio della linea bianca e non è considerato un parassita (**13**). Solo recentemente è stato riportato che esso è in grado di causare imbrunimento di carpofori di *A. bisporus* (**7**, **12**). La capacità di pseudomonadi fluore-

scenti diverse da *P. tolaasii* di causare alterazioni dei funghi coltivati *A. bisporus* e *P. ostreatus* è stata già osservata (**3**, **6**, **11**).

Dalle lesioni gialle e superficiali presenti su carpofori di *P. ostreatus* e da piccoli carpofori ingialliti e mummificati, sono state ottenute principalmente pseudomonadi fluorescenti, che non hanno formato precipitato quando fatte accrescere vicino al ceppo NCPPB2192 e al ceppo NCPPB1311, rispettivamente, di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"*. Questi isolati batterici hanno mostrato gli stessi caratteri patogenetici di *P. "reactans"* e delle pseudomonadi fluorescenti descritti in precedenza. Solo in alcuni casi, insieme con i suddetti batteri, sono stati ottenuti anche batteri identificati come *P. tolaasii* e/o *P. "reactans"*.

I ceppi di *P. "reactans"* e le pseudomonadi fluorescenti negativi al saggio della linea bianca sebbene siano differenziabili per alcuni caratteri nutrizionali (**5**), per la patogenicità e per la risposta nel saggio della linea bianca, (**13**), sembrano tassonomicamente molto prossimi a *P. tolaasii*. Infatti, gli stessi valutati per la capacita di utilizzare 95 diversi composti organici con il sistema computerizzato "Biolog", sono stati identificati come ceppi di *P. tolaasii*.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che tutte le forme batteriche qui descritte contribuiscono, sebbene in misura diversa, allo sviluppo dei sintomi dell'"ingiallimento" di *P. ostreatus*. In particolare, *P. tolaasii* sembra di colore bruno aranciato, capace di provocare sia lesioni depresse e circondate da aree ingiallite sia l'ingiallimento dei carpofori inoculati, mentre *P. "reactans"* e le pseudomonadi fluorescenti negative al saggio della linea bianca sembrano essere principalmente responsabili dell'ingiallimento dei carpofori del fungo.

Ringraziamenti

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

BIBLIOGRAFIA

1) ANONIMO, 1995. *Statistiche dell'agricoltura, zootecnica e mezzi di produzione.* ISTAT, anno 1993, annuario n° 41, edizione 1995.

2) 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.

3) FERMOR T. R., 1986. *Bacterial diseases of edible mushrooms and their control.* Proceedings of International Symposium Scientific and Technical Aspects of Cultivation Edible Fungi. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA, July, 1986, 361-370.

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

5) 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.

6) GYÖRFI J., 1989. *Present plant protection problems in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus *and its hybrid strains) growing in Hungary.* Mushroom Science XII (Part II). Proceedings of the Twelfth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Braunschweig, Germany; International Society for Mushroom Science, 603-609.

7) IACOBELLIS N.S. and LO CANTORE P., 1997. *Bacterial diseases of cultivated mushrooms in southern Italy.* Proceedings of X Congress of M. P. U., Montpellier, 2-6 Giugno, 33-37.

8) 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.

9) PARISI L., 1989. *Fungicoltura: L'Aif si rinnova ecco i suoi programmi.* Terra e Vita, 30 (19), 81-83.

10) RAINEY P. B., BRODEY C. L. and JOHNSTONE K., 1992. *Biologiy of* Pseudomonas tolaasii, *cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom.* Advances in Plant Pathology, Vol 8, Academic Press, London, 96-117.

11) RICHARDSON P. N., 1993. *Stipe necrosis of cultivated muhrooms (*Agaricus bisporus*) associated with a fluorescent pseudomonad.* Plant Pathology, 42 (6) 927-929.

12) 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.

13) 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.