Caratterizzazione di *Pseudomonas* "*reactans*" agente dell'"ingiallimento" del cardoncello (*Pleurotus eryngii*)

P. Lo Cantore e N.S. Iacobellis*
Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali,
Università degli Studi della Basilicata, C.da Macchia Romana, 85100, Potenza.
*Autore per la corrispondenza

I ceppi di Pseudomonas "reactans" e di P. tolaasii hanno confermato di possedere i tipici caratteri LOPAT del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti e i profili nutrizionali differenziali indicati da Goor et al. (1986) confermando la validità di tale schema diagnostico per l'identificazione dei batteri patogeni e/o associati dei funghi coltivati.
L'indagine delle caratteristiche nutrizionali dei due batteri mediante il sistema computerizzato Biolog Inc. ha evidenziato che i ceppi di P. tolaasii sono stati identificati come tali, sebbene sia stata osservata una certa variabilità di risposta al saggio. Circa il 50% dei ceppi di P. "reactans" sono stati identificati come ceppi di P. fluorescens mentre i restanti ceppi sono stati identificati come ceppi di P. marginalis, P. tolaasii, P. synxantha e Pseudomonas spp. Comunque, il confronto delle caratteristiche nutrizionali di P. "reactans" con il "data base" della Biolog Inc. ha indicato che i ceppi di P. "reactans" formano un "cluster" che è distinto da quelli che includono, rispettivamente, i ceppi di P. tolaasii, P. fluorescens, P. marginalis e P. synxantha.
Nel saggio della "linea bianca", tutti i ceppi di P. "reactans" e di P. tolaasii hanno formato precipitati bianchi.
I ceppi di P. "reactans" e di P. tolaasii, quando saggiati su blocchetti di prataiolo, sono risultati in grado di alterare in modo significativo lo pseudotessuto fungino, sebbene i ceppi di P. tolaasii siano risultati apparentemente più aggressivi/virulenti di P. "reactans".
I saggi di antagonismo in piastra hanno indicato che i ceppi di P. "reactans" e di P. tolaasii pro-

Strains of Pseudomonas "reactans" and P. tolaasii confirmed the typical LOPAT characteristics of group V of fluorescent pseudomonads and the nutritional profiles indicated by Goor et al. (1986). The latter results confirm the validity of the above diagnostic scheme for the identification of bacteria pathogen and/or associated to cultivated mushrooms.
The evaluation of the nutritional characteristics of the above bacterial with the computer-assisted system Biolog Inc. showed that strains of P. tolaasii presented a certain variability. About 50% of P. "reactans" strains were identified as strains of P. fluorescens whereas the others were identified as strains of P. marginalis, P. tolaasii, P. synxantha and Pseudomonas spp.. Nevertheless, the comparison of the nutritional characteristics of P. "reactans" with the data base of the Biolog Inc. system showed that strains of P. "reactans" formed a cluster which is separated from those including strains of P. tolaasii, P. fluorescens, P. marginalis e P. synxantha, respectively.
In the white line assay, all strains of P. tolaasii and P. "reactans" formed white precipitates between colonies.
Strains of both P. tolaasii and P. "reactans" caused the alteration of Agaricus tissue blocks but the former showed a higher aggressiveness/virulence when compared to those of P. "reactans".
Plate antagonistic assays showed that strains

ducono sostanze in grado di inibire la crescita di Bacillus megaterium, Rhodotorula pilimanae ed Escherichia coli.
I saggi di patogenicità, di antagonismo e della "linea bianca" hanno evidenziato una variabilità di risposta tra i ceppi batterici e, in particolare, per lo stesso ceppo, quando tali saggi sono stati ripetuti nel tempo. Tale variabilità è apparentemente dovuta alla formazione nelle colture di P. "reactans" e di P. tolaasii di varianti morfologiche che sono risultate avirulente, incapaci di produrre, rispettivamente WLIP e tolaasina I, e negative nel saggio della "linea bianca".

***Parole chiave**: funghi coltivati, Pleurotus eryngii, Pseudomonas tolaasii, Pseudomonas "reactans", Pseudomonas spp., ingiallimento, malattie batteriche.*

of P. "reactans" and P. tolaasii produced substances capable to inhibit the growth of Bacillus megaterium, Rhodotorula pilimanae and Escherichia coli.
Pathogenicity, antagonism and white line assays showed a variability among strains and, in particular, for the same strain when assays were repeated over the time. The observed variability was apparently due to the formation of phenotypic variants in the cultures of both P. "reactans" and P. tolaasii strains. The above variants were avirulent, unable to produce, respectively, WLIP or tolaasiin and negative in the "white line" assay.

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

Introduzione

Pleurotus eryngii (D.C.: Fr.) Quél, comunemente conosciuto come cardoncello, viene coltivato in alcune regioni meridionali del Paese e la sua produzione, pur limitata rispetto alla produzione di funghi coltivati del genere *Agaricus*, ha un peso economico non trascurabile e comunque suscettibile di uno sviluppo significativo (**2**).

Il cardoncello, durante la crescita, è attaccato da una serie di parassiti che sono causa di notevoli perdite di produzione e, sebbene non siano disponibili dati a tale riguardo, si ritiene che l'"ingiallimento" ne sia la causa principale (fig. 1) (**4**).

L'"ingiallimento" del cardoncello è una malattia la cui eziologia è rimasta non ben definita per molti anni. Inizialmente essa è stata attribuita a pseudomonadi fluorescenti riconducibili a *Pseudomonas tolaasii* (**4**), ma altri studi, pur se non definitivi, avevano indicato che ai funghi alterati erano associate delle pseudomonadi

Figura 1 - Sintomi di "Ingiallimento" su carpofori di Pleurotus eryngii.

fluorescenti diverse da *P. tolaasii* (**10**). Ulteriori studi hanno, recentemente, dimostrato che la batteriosi è causata da *P. "reactans"* (**12**). Inoltre, altri studi hanno dimostrato che la "maculatura bruna" di *A. bisporus* (Lange) Imbach (prataiolo) e l'"ingiallimento" di *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kum (ostricone), attribuiti, in passato, a *P. tolaasii* (**7**, **21**, **22**), sono in effetti malattie causate da diverse entità batteriche (**13**, **14**, **18**). Infatti, oltre a *P. tolaasii,* che ne è da considerare il principale agente causale, altri batteri, tra cui *P. "reactans"*, sono responsabili dei sintomi delle due malattie (**13**, **14**, **18**). Simili risultati sono stati recentemente ottenuti in studi indipendenti da altri autori (**23**). *P. "reactans"* è conosciuto in bibliografia come un batterio saprotrofo, associato a funghi coltivati del genere *Agaricus*, e utile nel saggio della "linea bianca" per la specifica identificazione di *P. tolaasii* (**24**). Il saggio consiste nel far crescere le colonie di *P. tolaasii* e *P. "reactans"* in vicinanza su substrati agarizzati. L'eventuale produzione di tolaasina I e WLIP ("White Line Inducing Principle"), lipodepsipeptidi (**19**, **20**) prodotti, rispettivamente, da ceppi di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"* (**21**, **22**), determina la formazione di un precipitato bianco (fig. 2) (**24**).

Il fatto che *P. "reactans"* sia risultato responsabile dell'"ingiallimento" del cardoncello e che partecipi all'alterazione del prataiolo e ostricone, ci ha stimolati ad avviare una serie di studi volti a caratterizzare il batterio, anche in confronto a *P. tolaasii*, per ottenere informazioni sulla sua biologia e per una sua adeguata classificazione.

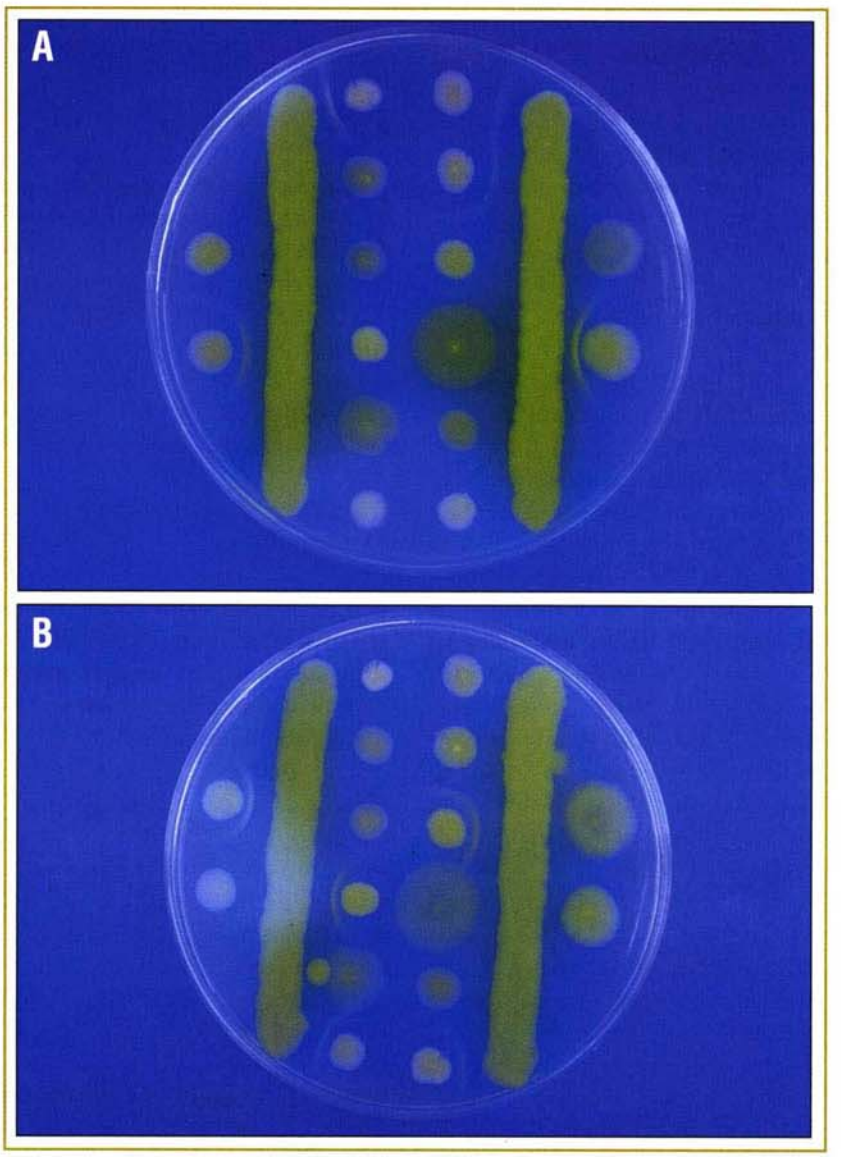

Figura 2 - Saggio della "linea bianca" tra isolati batterici, ottenuti da carpofori alterati, e ceppi autentici di Pseudomonas tolaasii (A) e P. "reactans" (B). L'assenza di precipitato bianco tra le colonie degli isolati analizzati e i ceppi indicatori dimostra che essi sono diversi, rispettivamente, da P. "reactans" e P. tolaasii.

Allo scopo 20 ceppi di *P. "reactans"* ed altrettanti di *P. tolaasii*, isolati da funghi coltivati del genere *Pleurotus* ed *Agaricus* in diverse aree geografiche, sono stati caratterizzati per una serie di caratteri fenotipici.

In questa nota sono riportati alcuni dei risultati ottenuti.

Materiali e Metodi

Colture batteriche

Colture pure di *Pseudomonas "reactans"* e *P. tolaasii*, ottenute mediante isolamento da carpofori alterati di funghi del genere *Pleurotus* e *Agaricus* e da

collezioni internazionali, sono state mantenute 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 (**15**).

Saggi di patogenicità

I saggi di patogenicità su blocchetti di pseudotessuto ricavati da carpofori di prataiolo sono stati effettuati seguendo la procedura descritta da Gandy (**6**) ed Ercolani (**3**).

I saggi di patogenicità su carpofori interi di prataiolo, sono stati effettuati utilizzando carpofori freschi di prataiolo, con pileo di circa 5 cm di diametro. Questi sono stati lavati sotto acqua corrente e collocati in vassoi di alluminio all'interno dei quali è stato posto un foglio di carta assorbente.

Gli stessi vassoi, coperti con un foglio dello stesso metallo, sono stati preventivamente sterilizzati in autoclave a 121°C per 21 min.

Per ogni ceppo batterico sono stati utilizzati almeno tre carpofori.

Gocce di 20 µl di sospensioni batteriche contenenti circa 10^8 u.f.c./ml sono state deposte sul pileo di detti carpofori. I vassoi sono stati incubati a 25°C per 48 ÷ 72 ore. Alternativamente, sospensioni batteriche contenenti circa 10^8 u.f.c./ml sono state nebulizzate sul pileo di detti carpofori. In questo caso, i vassoi sono stati incubati a 4°C per 7 giorni.

Carpofori inoculati con i ceppi NCPPB2192 e NCPPB1311, rispettivamente, di *Pseudomonas tolaasii* e di *P. "reactans"* e trattati con acqua distillata sterile sono stati utilizzati come testimoni.

Saggio della "linea bianca"

La capacità dei ceppi batterici di formare precipitati bianchi nel substrato KB quando accresciuti vicino a colonie dei ceppi NCPPB2192 e NCPPB1311, rispettivamente, di *Pseudomonas tolaasii* e di *P. "reactans"*, è stata valutata seguendo la procedura di Wong e Preece (**24**).

Caratteri biochimici e nutrizionali

I ceppi batterici risultati positivi nei diversi saggi di patogenicità e nel saggio della "linea bianca" sono stati valutati per i caratteri LOPAT (**17**) e per quelli nutrizionali differenziali dei batteri patogeni dei funghi coltivati e/o ad essi associati (**8**). Inoltre, essi sono stati saggiati per la capacità di utilizzare 95 fonti di carbonio con il sistema computerizzato Biolog (Biolog, Inc., Hayward, CA).

Saggi di antagonismo in piastra

I ceppi batterici sono stati valutati seguendo le procedure precedentemente riportate (**11**, **16**), in saggi di antagonismo in piastra per la capacità di produrre in coltura sostanze con attività antimicrobica.

In particolare, i ceppi sono stati valutati per la capacità di inibire la crescita del ceppo ITM100 del batterio Gram positivo *Bacillus megaterium*, del ceppo ITM103 del batterio Gram negativo *Escherichia coli* K12 e del ceppo ATCC26423 del lievito *Rhodotorula pilimanae*.

Risultati e discussione

Quando gocce di sospensioni batteriche contenenti 10^8 u.f.c./ml di ceppi di *P. tolaasii* sono state deposte sulla superficie di blocchetti di pseudotessuto di prataiolo, questi hanno mostrato, dopo 48 ore di incubazione a 25°C, un marcato imbrunimento con depressione e leggera deliquescenza del plectenchima. Nello stesso saggio, tutti i ceppi di *P. "reactans"* hanno causato un imbrunimento degli stessi ma non hanno determinato la deliquescenza del plectenchima. Ulteriori saggi di patogenicità su blocchetti di pseudotessuto hanno mostrato che la concentrazione della sospensione batterica necessaria per causare alterazioni visibili è di circa 10^6 u.f.c./ml nel caso di ceppi di *P. tolaasii* ed è compresa tra 10^7 e 10^8 u.f.c./ml, anche in relazione al ceppo utilizzato, per i ceppi di *P. "reactans"*.

Nei saggi di patogenicità su carpofori interi di prataiolo, i ceppi di *P. tolaasii* sono risultati più virulenti rispetto a quelli di *P. "reactans"*. I ceppi di *P. tolaasii*, quando inoculati su pilei di carpofori sani, mediante nebulizzazione di sospensioni batteriche contenenti circa 10^8 u.f.c./ml, hanno causato la comparsa, dopo 7 giorni di incubazione a 4°C, di lesioni brune e depresse del plectenchima. Nelle stesse condizioni di saggio, i pilei dei carpofori nebulizzati con sospensioni batteriche di isolati di *P. "reactans"* hanno presentato sintomi simili a quelli causati da *P. tolaasii* ma di intensità inferiore. I carpofori trattati con acqua distillata sterile sono rimasti sostanzialmente inalterati. I ceppi di *P. tolaasii*, quando inoculati su pilei di carpofori sa-

ni, mediante deposizione di gocce di sospensioni batteriche con circa 10^8 u.f.c./ml, hanno causato, dopo 48 ore di incubazione a 25°C, maculature brune e depresse nel plectenchima. Nello stesso saggio, i ceppi di *P. "reactans"* hanno determinato sintomi meno intensi ma sostanzialmente simili a quelli causati da *P. tolaasii*.

I ceppi di *P. tolaasii* e *P. "reactans"*, come atteso, hanno presentato i caratteri LOPAT del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti (**17**).

I ceppi di *P. tolaasii* e *P. "reactans"*, valutati per i caratteri nutrizionali differenziali dei batteri patogeni dei funghi coltivati (**8**), hanno presentato i profili tipici delle due entità batteriche, confermando la validità ed affidabilità di tale schema diagnostico. In particolare, i ceppi di *P. tolaasii* si sono accresciuti sui substrati minimali contenenti eritritolo, sorbitolo, L-arabitolo, 2-chetogluconato e *n*-valerato ma non su quelli contenenti L-arabinosio, L-ramnosio, D-tartrato e istamina. I ceppi di *P. "reactans"* si sono accresciuti sui substrati minimali contenenti eritritolo, sorbitolo, L-arabinosio, L-ramnosio, L-arabitolo, 2-chetogluconato e *n*-valerato ma non su quelli contenenti D-tartrato e istamina.

I ceppi di *P. tolaasii*, saggiati con il sistema computerizzato Biolog (Biolog Inc., Hayward, Ca, USA), sono stati identificati, come atteso, come ceppi di *P. tolaasii* anche se è stata osservata una certa variabilità di risposta al saggio.

I ceppi di *P. "reactans"*, batterio ancora non classificato e, quindi, non presente nella banca dati della Biolog Inc., sono stati identificati in modo diverso. Nove di essi sono stati identificati come ceppi di *P. fluorescens*, tre come ceppi di *P. marginalis*, due come ceppi di *P. tolaasii*, due come ceppi di *P. synxantha* e, infine, due come ceppi di *Pseudomonas* spp. Altri due ceppi non sono stati identificati probabilmente a causa delle interferenze nel saggio causate dai polisaccaridi capsulari (**1**, **5**). L'analisi del comportamento nutrizionale dei ceppi di *P. "reactans"* con il sistema computerizzato Biolog ha permesso, infine, di creare un "data base". Questo è stato confrontato, sempre tramite analisi "cluster", con il "data base" della Biolog Inc. in cui sono presenti i profili nutrizionali di 501 batteri Gram negativi. Tale analisi ha indicato che i ceppi di *P. "reactans"* formano un "cluster" che è distinto da quello che include i ceppi di *P. tolaasii*, *P. fluorescens*, *P. marginalis* e *P. synxantha*.

Nel saggio della "linea bianca" (**24**), tutti i ceppi di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"* hanno mostrato la capacità di formare precipitati bianchi in agar quando fatti accrescere, vicino ai ceppi NCPPB2192 e NCPPB1311, di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"*.

I saggi di antagonismo in piastra (**11**, **16**), hanno indicato, che i ceppi di *P. tolaasii* inibiscono la crescita dei ceppi ITM100, ATCC26423 e K12 ITM103, rispettivamente, di *Bacillus megaterium*, *Rhodotorula pilimanae* ed *Escherichia coli*, mentre i ceppi di *P. "reactans"* solo la crescita di *B. megaterium* e di *E. coli*.

I saggi di patogenicità, della "linea bianca" e di antagonismo in piastra hanno, comunque, evidenziato una notevole variabilità per tali caratteri. Questa è risultata apparentemente dovuta alla formazione nelle colture di un elevato numero di varianti morfologiche, che, infatti, sono state osservate nella quasi totalità dei ceppi di *P. "reactans"* e di *P. tolaasii* quando accresciuti su substrati agarizzati. Tali varianti hanno perso i suddetti caratteri. Infatti, le varianti isolate da ceppi di *P. tolaasii* hanno perso l'abilità di produrre metaboliti tossici e sono risultate avirulente e negative nel saggio della "linea bianca". Questi effetti sono dovuti all'incapacità delle varianti di produrre la tolaasina I, un metabolita tossico responsabile dei sintomi delle malattie causate da *P. tolaasii* (**21**, **22**). Anche le varianti morfologiche di *P. "reactans"* hanno perso l'abilità di produrre metaboliti tossici e sono risultate avirulente e negative nel saggio della "linea bianca". Tutto ciò indica che il WLIP sembra coinvolto nei fenotipi sopra elencati. Mentre per *P. tolaasii* la formazione di varianti fenotipiche nelle colture del batterio è un fenomeno noto (**9**), per *P. "reactans"* è invece una novità. Tale fenomeno, in presenza di un alto rapporto di varianti nelle colture, potrebbe essere responsabile della variabilità di risposta osservata nei suddetti saggi e, in particolare, dell'attenuazione e/o della perdita della patogenicità dei ceppi del batterio. Tale evenienza potrebbe spiegare perché la patogenicità di *P. "reactans"* non sia stata valutata correttamente nel passato e indica che il WLIP, al pari della tolaasina I nel caso di *P. tolaasii*, sembra essere impor-

tante nella virulenza del batterio produttore.

Lavoro eseguito in parte con fondi MURST (Ex 60%), della Regione Basilicata e del Mi.PA.F. Si ringrazia L'azienda Fungo Puglia Cooperativa, Rutigliano (Ba) per la collaborazione. Dedicato al Prof. Antonio Graniti in occasione del suo 75° compleanno.

BIBLIOGRAFIA

1) ANONIMO, 1999. Biolog Microlog™ System, Release 4.01A, User Guide, Biolog. Inc.

2) CASTELLUCCIO M., 1998. *Aggiornamenti sulla coltivazione e la commercializzazione del cardoncello.* Agricoltura Ricerca, 176, 79-82.

3) 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.

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

5) FRANCO-BUFF A., P. DOMENICO e BOOHNER B.R., 1998. *Inhibition of Capsule Production in Bacteria by Thioglycolate.* Reprinted from the 98th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, May 1998.

6) GANDY D.G., 1968. *A technique for screening bacteria causing brown blotch of cultivated mushrooms.* In: report of the Glasshouse Crops Research Institute, 150-154.

7) GILL W.M., 1995. *Bacterial Disease of* Agaricus *Mushrooms.* Rep. Tottori Mycol. Inst., 33, 34-55.

8) GOOR M., VANTOMME R., SWINGS J., GILLIS M., KERSTERS K. e 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.

9) GREWAL S., HAN B. e JOHNSTONE K., 1994 - *Regulation of toxin synthesis and phenotypic varation in* Pseudomonas tolaasii, *cause of brown blotch disease of mushroom.* Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, 3, 25.

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

11) IACOBELLIS N.S., LAVERMICOCCA P., GRGURINA I., SIMMACO M. e BALLIO A., 1992. *Phytotoxin properties of* Pseudomonas syringae *pv.* syringae *toxins.* Physiol. Mol. Plant Pathol., 40, 107-116.

12) IACOBELLIS N.S. e LO CANTORE P., 1998a. *Recenti acquisizioni sul determinismo della batteriosi del cardoncello* (Pleurotus eryngii). Agricoltura Ricerca, 176, 51-54.

13) IACOBELLIS N.S. e LO CANTORE P., 1998b. *Studi sull'eziologia dell'ingiallimento dell'ostricone* (Pleurotus ostreatus) *e del cardoncello* (Pleurotus eryngii). Atti VI Convegno Annuale SIPaV, Campobasso, 17-18 Settembre 1998, 45.

14) IACOBELLIS N.S. e LO CANTORE P., 1998c. *Studies on the etiology of yellowing of* Pleurotus ostreatus *and* Pleurotus eryngii. Journal of Plant Pathology, 80, 258.

15) KING E.O., WARD M.K. e RANEY D.E., 1954. *Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein.* Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44, 301-307.

16) LAVERMICOCCA P., IACOBELLIS N.S., SIMMACO M. e GRANITI A., 1997. *Biological properties and spectrum of activity of* Pseudomonas syringae *pv.* syringae *toxins.* Physiol. Mol. Plant Pathol., 50, 129-140.

17) LELLIOTT R.A. e 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.

18) LO CANTORE P. e IACOBELLIS N.S., 2001. *Aspetti eziologici delle malattie batteriche dei funghi coltivati del genere* Agaricus *e* Pleurotus. Atti XIV Convegno Nazionale di Micologia. Selva di Fasano - Fasano, Brindisi, 22-27 Ottobre 2001, 20.

19) MORTISHIRE-SMITH R.J., NUTKINS J.C., PACKMAN L.C., BRODEY C.L., RAINEY P.B., JOHNSTONE K. e WILLIAMS D.H., 1991. *Determination of the structure of an extracellular peptide produced by the mushroom saprotroph* Pseudomonas "reactans". Tetrahedron, 47, 3645-3654.

20) NUTKINS J.C., MORTISHIRE-SMITH R.J., PACKMAN L.C., BRODEY C.L., RAINEY P.B., JOHNSTONE K. e WILLIAMS D.H., 1991. *Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen* Pseudomonas tolaasii *Paine.* Journal of the American Chemical Society, 113, 2621-2627.

21) RAINEY P.B., BRODEY C.L. e JOHNSTONE K., 1992. *Biology of* Pseudomonas tolaasii, *cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom.* Plant Pathology, 8, 95-117.

22) SOLER-RIVAS C., JOLIVET S., ARPIN N., OLIVIER J.M. e WICHERS H.J., 1999. *Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of* Agaricus bisporus. FEMS Microbiology Reviews, 23, 591-614.

23) WELLS J.M., SAPERS G.M., FETT W.F., BUTTERFIELD J.E., JONES J.B., BOUZAR H. e 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.

24) WONG W.C. e 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.