Necrosi corticale e del midollo del pomodoro causata da Pseudomonas fluorescens *in Puglia*

Pietro Lo Cantore - Nicola Sante Iacobellis

RIASSUNTO

Casi di una "necrosi corticale e del midollo", che hanno interessato la maggior parte delle piante di pomodoro in alcuni tunnel riscaldati in Puglia sono stati causati da batteri assegnati a biotipi diversi di *Pseudomonas fluorescens*. Tali batteri, pur apparentemente meno virulenti di *P. corrugata* nei saggi di patogenicità, potrebbero aver infettato i tessuti corticali e midollari di piante di pomodoro attraverso le ferite esito di potatura verde. Elevate condizioni di temperatura e umidità relativa degli ambienti di coltivazione e la presenza di condensa sulle superfici delle piante potrebbero aver favorito la sopravvivenza e la moltiplicazione dei batteri, e il processo infettivo con conseguente elevata incidenza della malattia.

PAROLE CHIAVE

Necrosi corticale e del midollo, pomodoro, *Pseudomonas fluorescens*

SUMMARY

Stem and pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas fluorescens* in Apulia

Stem and pith necrosis of tomato, which interested the majority of plants in a greenhouses in Apulia, was caused by bacteria identified as biotypes of *Pseudomonas fluorescens*. These bacteria, though apparently less virulent of *P. corrugata* in the pathogenicity assay, might have infected cortical and pith tissues through wounds following green pruning. Elevate temperatures as well as high relative humidity of greenhouse and the presence of moisture on plant surfaces might have facilitate the bacteria survival and multiplication, and the infection process with consequent high incidence of the disease.

KEY WORDS

Stem and pith necrosis, tomato, *Pseudomonas fluorescens*

Introduzione

Nella primavera del 1999, in alcune coltivazioni di pomodoro da mensa cv. Naxos effettuate in tunnel riscaldato in Agro di Bitritto (BA) in Puglia, sono stati riscontrati gravi alterazioni riferibili ad infezioni batteriche. In particolare, le piante presentavano sul fusto striature longitudinali di colore brunastro che evolvevano in necrosi. In alcuni casi tali formazioni cancerose avevano una estensione di qualche centimetro (Fig. 1a) mentre nella maggior parte delle piante esse erano molto estese anche per alcuni decimetri (Fig. 1b). In corrispondenza di tali alterazioni a carico dei tessuti corticali, il midollo si presentava imbrunito ed idropico e, nella maggior parte dei casi, necrotico e svuotato (Fig. 1c). Anche i fasci vascolari si presenta-

Fig. 1 - Sintomi di necrosi corticale e del midollo su piante di pomodoro in tunnel riscaldato: striature necrotiche sul fusto (a, b) e necrosi e svuotamento del midollo (c).

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro Forestali, Università degli Studi della Basilicata, C/da Macchia Romana, 85100, Potenza iacobellis@unibas.it

Fig. 2 - Sezione longitudinale di fusto di pomodoro con necrosi del midollo ad andamento basipeto.

vano imbruniti. Gli imbrunimenti e necrosi del fusto, e le necrosi del midollo erano osservabili esclusivamente in corrispondenza dei nodi che presentavano i residui di cicatrici dovute ad interventi di potatura verde. Tali effetti presentavano un andamento basipeto. Infatti, sezioni longitudinali del fusto di piante infette mostravano che le lesioni partivano dai nodi e discendevano lungo il fusto. La maggior parte delle piante con i suddetti sintomi presentavano, infatti, la regione del colletto apparentemente sana (Fig. 2). Le piante, inoltre, in corrispondenza delle necrosi del fusto e del midollo presentavano, prima, l'avvizzimento di alcune foglie (Fig. 3a) e successivamente esse avvizzivano completamente (Fig. 3b). Al momento dei sopralluoghi, la maggior parte delle piante della coltivazione presentavano i suddetti sintomi sebbene fossero presenti anche piante che presentavano solo limitate aree necrotiche ai nodi e assenza degli altri sintomi esterni e solo limitati imbrunimenti del midollo. I frutti delle piante infette pur risultando di modesta qualità si presentavano asintomatici. Molte piante presentavano sul fusto, in corrispondenza della necrosi del midollo, abbozzi di radici avventizie (Fig. 4). Dai tessuti infetti di piante che presentano il suddetto quadro sintomatologico vengono di solito isolati batteri non fluorescenti riconducibili a *Pseudomonas corrugata* Roberts *et* Scarlett (Scarlett *et al.*, 1978). Data l'importanza economica di tale coltura in Puglia e in genere nelle Regioni meridionali del Paese e i notevoli danni provocati dalla malattia ci è sembrato utile verificare se, come in altre passate occasioni sia in Puglia che in Basilicata (Iacobellis, osservazioni non pubblicate), le alterazioni osservate fossero dovute a *P. corrugata*.

In questa nota vengono riportati i risultati di tali osservazioni e i materiali e metodi adottati.

Materiali e metodi

Isolamenti batterici

Porzioni di fusto di piante di pomodoro con necrosi del midollo sono stati immersi in ipoclorito di sodio allo 0,1% di cloro per 5 minuti e poi lavati per tre volte con acqua distillata sterile. Da sezioni longitudinali del fusto sono stati prelevati porzioni di tessuto midollare, al limite tra le zone imbrunite e quelle ancora apparentemente sane, che sono state finemente sminuzzate in acqua distillata sterile.

Aliquote delle sospensioni batteriche così ottenute sono state distribuite sulla superficie di piastre Petri contenenti il substrato B di King (KB) (King *et al.*, 1954) oppure Agar-Nutritivo (AN) (Oxoid). Le piastre inoculate sono state poste ad incubare a 25 °C per 72 ore.

Le piastre d'isolamento, dopo il periodo d'incubazione, sono state osservate allo stereomicroscopio per l'individuazione delle colonie batteriche isolate.

Alcune delle colonie batteriche isolate, rappresentative e morfologicamente diverse dalle altre, sono state prelevate e ulteriormente strisciate su piastre Petri contenenti AN. Le colture pure sono state mantenute a 4 °C in tubi da batteriologia contenenti agar nutritivo al 2% di glicerina (ANG). Inoltre, gli stessi isolati batterici sono stati liofilizzati e conservati a 4 °C.

Le sottocolture degli isolati sono state ottenute accrescendo i batteri per 48 ore su KB.

Tutti gli isolati batterici sono stati accresciuti su AN e sullo stesso substrato addizionato dell'1% di glucosio al fine di valutare la morfologia delle colonie anche in comparazione a quella del ceppo tipo NCPPB2445 di *P. corrugata*.

Saggi di patogenicità

La patogenicità degli isolati è stata valutata su piantine di pomodoro della

a

b

Fig. 3 - Sintomi di avvizzimento su alcune foglie (a) e intere piante (b).

cv. Pantano alte circa 25 cm, accresciute in vasetti e mantenute in serra alla temperatura di 22-25 °C e umidità relativa del 45-65%.

Nelle inoculazioni delle piantine di pomodoro sono state utilizzate due tecniche diverse: in un caso, sospensioni batteriche contenenti circa 10^8 u.f.c./ml sono state iniettate, mediante una siringa ipodermica, nel fusto, in corrispondenza dell'ascella della prima foglia vera; nel secondo, le piantine, dopo essere state private della prima foglia vera con un taglio radente il fusto effettuato con un bisturi sterile, sono state inoculate mediante infissione nel punto di taglio con uno stuzzicadenti sterile impregna-

Fig. 4 - Abbozzi radicali in corrispondenza di necrosi del midollo.

a

b

Fig. 5 - Necrosi del midollo su piantine di pomodoro causato da inoculazioni artificiali di sospensioni del ceppo NCPPB2445 di **Pseudomonas corrugata** *(a) e del ceppo USB 1202 di* **P. fluorescens.**

to con una massa batterica. Per ogni isolato sono state inoculate sei piantine di pomodoro.

Come controllo sono state utilizzate piantine inoculate allo stesso modo con acqua distillata sterile e con il ceppo NCPPB2445 di *P. corrugata*. Nel secondo tipo di saggio anche i ceppi ICMP5702 di *E. carotovora* subsp. *carotovora*, ICMP5707 di *P. cichorii* e DPP18 di *P. viridiflava*, generosamentefornito da Leonardo Varvaro, sono stati utilizzati come controllo.

Saggi biochimici e nutrizionali

Gli isolati batterici che sono risultati positivi nei saggi di patogenicità sono stati sottoposti a colorazione di Gram, valutati per la produzione di pigmenti fluorescenti e per i caratteri LOPAT seguendo le procedure indicate da Lelliott e Stead (1987).

Il profilo metabolico degli stessi isolati è stato valutato mediante il sistema computerizzato "Biolog" (Biolog, Inc., Hayward, CA).

Risultati e discussione

Da tutti gli isolamenti sono state ottenute colture sostanzialmente pure di batteri che dopo tre giorni di incubazione sul substrato KB producevano pigmenti diffusibili fluorescenti verdi, blu o arancione. In particolare, i ceppi USB1202, USB1203 e USB1204 oltre al pigmento blu hanno prodotto un pigmento fluorescente diffusibile arancione.

Gli isolati oggetto di interesse quando accresciuti su agar nutritivo addizionato di glucosio alla concentrazione dell'1% non hanno formato colonie con la morfologia tipica di *P. corrugata*. Le colonie dei diversi isolati, pur con differenze morfologiche apprezzabili, nella maggior parte dei casi, dopo 48 ore di accrescimento su AN addizionato dell'1% di glucosio, erano piatte, mucose, con margine irregolare e di 3 ¸ 4 mm di diametro. Gli stessi isolati, accresciuti su AN presentavano colonie piatte, traslucide e con margine irregolare.

I saggi di patogenicità su piantine di pomodoro, mediante iniezione nel fusto delle sospensioni batteriche, hanno indicato per gli isolati oggetto di interesse una minore virulenza rispetto al ceppo tipo NCPPB2445 di *P. corrugata*. Infatti, le piantine inoculate con questo ceppo presentavano, 30 giorni dopo l'inoculazione, estese aree imbrunite dei fusti ed emissione di essudati batterici al punto di inoculo. Sezioni longitudinali dei fusti mostravano il midollo completamente svuotato e necrotico per circa 15 cm (Fig. 5a).

L'isolato USB1202, che è risultato il più virulento tra gli isolati saggiati, ha determinato la comparsa di imbrunimenti dei tessuti corticali estesi per alcuni centimetri intorno al punto di inoculo. Il sezionamento longitudinale del fusto ha evidenziato l'imbrunimento del midollo che è risultato esteso per 10¸ 12 cm; non sono stati osservati apparenti fenomeni necrotici (Fig. 5b).

Le piante inoculate con gli isolati USB1203, 1204, 1205 e 1207 presentavano ridotti imbrunimenti esterni del fusto. Il midollo interno era imbrunito per 4 ¸ 7 cm con leggera necrosi e svuotamento del midollo limitati al punto di inoculazione.

Tutti gli altri isolati sono risultati meno virulenti e capaci di determinare leggeri imbrunimenti ed idropsie del midollo limitatamente al punto di inoculazione.

L'inoculazione mediante infissione della massa batterica non ha apparentemente discriminato la virulenza degli isolati. Infatti, tutti gli isolati di interesse, come pure i ceppi NCPPB2445 di *P. corrugata*, ICMP5702 di *E. c.* subsp. *carotovora*, ICMP5707 di *P. cichorii* e DPP18 di *P. viridiflava* hanno causato la comparsa di forti imbrunimenti del midollo estesi per 3 ¸ 4 cm. Nel caso dei ceppi di *P. corrugata*, *P. cichorii*, *E. c.* subsp. *carotovora* e degli isolati USB1203 e 1204 sono state osservate anche necrosi e svuotamento del fusto.

Tutti gli isolati più virulenti e il ceppo NCPPB2445 di *P. corrugata* hanno mostrato la capacità di indurre la formazione di numerosi abbozzi radicali sul fusto delle piantine inoculate.

Gli isolati sono risultati tutti Gram negativi e con il profilo biochimico LOPAT del gruppo Vb delle pseudomonadi fluorescenti (Lelliott and Stead, 1987). In particolare, essi sono risultati capaci

di produrre levano su agar nutritivo al 5% di saccarosio (ANS), di ossidare i composti organici, di non macerare i tasselli di patata, di utilizzare l'arginina e di non produrre la reazione di ipersensibilità.

Il sistema computerizzato Biolog ha identificato quattro isolati (USB1201, USB1206, USB1208, USB1209) come ceppi di *P. fluorescens*, tre isolati (USB1203, USB1204, USB1207) come ceppi di *P. fluorescens* biotipo F e un isolato, rispettivamente, come ceppo di *P. chlororaphis* (*P. fluorescens* biotipo D) (USB1202) e di *Pseudomonas* spp. (USB1205). Comunque, è stata osservata una certa variabilità nei profili metabolici, e in particolare, a carico dei ceppi di *P. fluorescens* biotipo F. I ceppi USB1201, USB1202, USB1203, USB1204, USB1205 e USB1206 sono stati depositati presso la International Collection of Micro-organisms from Plants, Auckland, New Zealand, rispettivamente con i seguenti numeri di accessione: ICMP 14360, ICMP 14359, ICMP 14361, ICMP 14362, ICMP 14356, ICMP 14363.

I saggi di patogenicità hanno evidenziato la capacità dei batteri isolati di riprodurre i sintomi della necrosi del midollo sebbene, almeno nel saggio effettuato mediante iniezione di sospensioni batteriche, la loro virulenza è risultata minore rispetto a quella del ceppo di *P. corrugata* utilizzato per comparazione. È noto che la "necrosi del midollo" è una malattia che può essere causata da più specie batteriche. Infatti, non solo *P. corrugata* (Scarlett *et al.*, 1978; Clark and Watson, 1986), ma anche *P. cichorii* in Nuova Zelanda (Wilkie and Dye, 1974), *Erwinia carotovora* in Texas (Speights *et al.*, 1967), *E. carotovora*-subsp. *carotovora* e *Pseudomonas* spp. in Canada (Dhanvantari and Dirks, 1987; Dhanvantari, 1990) e, infine, *P. fluorescens* biotipo A, *P. viridiflava* e *E. c.* subsp. *atroseptica* e *E. c.* subsp. *carotovora* a Creta (Malathrakis and Goumas, 1987) sono stati riportati come responsabili di tale malattia.

Allo stato attuale delle conoscenze non è possibile stabilire le modalità attraverso le quali tali batteri siano giunti nelle coltivazioni di pomodoro, ma essi, pur considerati ubiquitari e quindi potenzialmente già presenti nella coltivazione, potrebbero essere stati introdotti negli ambienti di coltivazione in associazione alle piantine.

Generalmente *P. fluorescens* è considerato un batterio saprofita (Bradbury, 1986) il quale, però, in condizioni ambientali di elevata umidità relativa accompagnata da sbalzi di temperatura tra il giorno e la notte e in presenza di abbondanti concimazioni azotate, può determinare danni notevoli ad alcune colture. Nel caso del pomodoro oggetto della presente nota le condizioni di elevata temperatura, di umidità relativa e, in particolare, la formazione di acqua libera sulla superficie delle piante nelle prime ore della giornata dovuta ad una gestione non corretta del riscaldamento e del regime di irrigazione, hanno sicuramente favorito il batterio che in presenza di ferite, esito di interventi di potatura verde, ha potuto insediarsi nei tessuti corticali e del midollo.

Il fatto che l'imbrunimento e successiva necrosi dei tessuti corticali e del midollo siano state osservate a partire da cicatrici presenti ai nodi supporta tale evenienza. La pericolosità di tali infezioni attraverso ferite è supportata dagli esiti delle inoculazioni artificiali mediante infissione di masserelle batteriche direttamente nelle tracce fogliari.

Infatti, con tale tecnica di inoculazione i saggi di patogenicità non hanno sostanzialmente permesso di differenziare la virulenza degli isolati oggetto di interesse da quella di ceppi di *P. corrugata*, *P. cichorii*, *P. viridiflava* ed *E. c.* subsp. *carotovora*. Tutti questi batteri hanno causato come era da attendersi la "necrosi del midollo" del pomodoro (Wilkie and Dye, 1974; Speights *et al.*, 1967; Dhanvantari and Dirks, 1987; Dhanvantari, 1990; Malathrakis and Goumas, 1987) ma l'intensità dei sintomi non è risultata sostanzialmente diversa. In conclusione, le osservazioni e i risultati riportati in questa nota confermano che diversi biotipi di *P. fluorescens* in condizioni di elevata umidità dell'ambiente colturale e presenza di acqua libera (Dhanvantari and Dirks, 1987), possono determinare la necrosi dei tessuti corticali e del midollo con una elevata dannosità.

Una buona gestione dei fattori ambientali nel caso di colture protette e l'utilizzo di battericidi cuprici e in particolare dopo eventuali interventi di potatura verde, dovrebbero limitare la densità delle popolazioni batteriche e quindi la possibilità di infezione. Nel caso specifico non è tuttavia ben chiaro il motivo per cui l'utilizzo di anticrittogamici a base di rame e formulazioni di anticrittogamici organici associati a rameici, impiegati dall'agricoltore sulla coltura, non abbiano avuto esito positivo nell'evitare e/o limitare l'insorgenza della necrosi del corticale e del midollo.

Ringraziamenti
Si ringrazia il Dott. Vittorio Fili per aver indicato il caso fitopatologico. Lavoro svolto con il contributo del Ministero della Università e Ricerca scientifica quota ex 60%.

Dedicato al Prof. Antonio Graniti in occasione del suo 75° compleanno.

LAVORI CITATI

Clark R.G., Watson D.R.W. (1986) - New plant disease record in New Zeland: pith necrosis caused by Pseudomonas corrugata. *N.Z. J. Agric. res.*, *29*: 105-109.

Bradbury J.F. (1986) - *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, England, pp. 331.

Dhanvantari B.N. (1990) - Stem Necrosis of Greenhouse Tomato Caused by a Novel Pseudomonas sp. *Plant Disease*., Vol. 74, 2, 124-127.

Dhanvantari B.N., Dirks V.A. (1987) - Bacterial stem rot of greenhouse tomato: Etiology, spatial distribution and the effect of high humidity. *Phytopathology*, *77*: 1457-1463.

King E.O., Ward M.K., Raney D.E. (1954) - Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *44*, 301-307.

Lelliott R.A., 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.

Malathrakis N.E., Goumas D.E. (1987) - Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in Crete. *Ann. Appl. Biol.*, *111*, 115-123.

Scarlett C.M., Fletcher J.T., Roberts P., Lelliot R.A. (1978) - Tomato pith necrosis caused by Pseudomonas corrugata n. sp. *Ann. Appl. Biol.*, *88*, 105-114.

Speights D.E., Halliwell R.S., Horne C.W., Hughes A.B. (1967) - A bacterial stem rot of greenhouse-grown tomato plants. *Phytopathology*, *57*: 902-904.

Wilkie J.P., Dye D.W. (1974) - Pseudomonas cichorii causing tomato and celery diseases in New Zealand. *N.Z. J. Agric. Res.*, *17*: 123-130.