estratto da:

micologia italiana

Rivista di sistematica, ecologia, fisiologia, biochimica, tossicologia e coltivazione dei funghi

Pàtron editore

Organo ufficiale dell'Unione Micologica Italiana

anno XXXI, n. 2, agosto 2002 MICOLOGIA ITALIANA

Recenti acquisizioni sulla eziologia delle malattie batteriche dei funghi coltivati del genere *Agaricus* e *Pleurotus**

Recent advances on bacterial diseases of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*

PIETRO LO CANTORE
NICOLA SANTE IACOBELLIS
Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, C.da Macchia Romana, 85100, Potenza, (Italia).

Riassunto

Sono riportati i risultati di recenti acquisizioni sulla eziologia di alcune malattie batteriche dei funghi coltivati in Italia meridionale. In particolare, è stato osservato che la "Maculatura bruna" di Agaricus bisporus *(prataiolo) e l'"Ingiallimento" di* Pleurotus ostreatus *(ostricone), il cui agente eziologico è* Pseudomonas tolaasii, *sono due micopatie causate da diverse entità batteriche. Infatti, oltre a* P. tolaasii, *che può essere considerato l'agente principale delle due malattie, anche* P. "reactans" *e pseudomonadi fluorescenti, non ancora caratterizzate, partecipano all'espressione dei sintomi delle suddette malattie. Infine, è stato dimostrato che* P. "reactans" *è l'agente eziologico dell'"Ingiallimento" di* P. eryngii *(cardoncello). La dimostrazione che* P. "reactans" *è un patogeno dei funghi coltivati del genere* Agaricus *e* Pleurotus *è una novità. L'insorgenza di varianti fenotipiche avirulente e non produttrici del WLIP (White Line Inducing Principle) nelle colture pure di* P. "reactans" *potrebbe spiegare la variabilità e/o la perdita del carattere nei saggi della "linea bianca", di patogenicità e di antagonismo in piastra osservata per i ceppi del batterio. Un alto rapporto di varianti avirulente nelle colture dei ceppi di* P. "reactans" *potrebbe spiegare la non corretta valutazione della patogenicità del batterio nel passato.* P. agarici *è risultato responsabile della formazione di lesioni brune e superficiali sui carpofori di* A. bisporus. *La malattia comunque è stata osservata sporadicamente.*

* Lavoro eseguito in parte con fondi MURST (Ex 60%), della Regione Basilicata e del MIRAF.

Parole chiave

Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus, P. eryngii, Pseudomonas tolaasii, P. "reactans", P. agarici;

Key words

Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus, P. eryngii, Pseudomonas tolaasii, P. "reactans", P. agarici;

Abstract

Recent advancements on the cause of some bacterial diseases of cultivated mushrooms in southern Italy are reported. In particular, it has been observed that brown blotch of Agaricus bisporus *and the yellowing of* Pleurotus ostreatus, *caused by* Pseudomonas tolaasii, *are actually complex diseases. In fact, besides* P. tolaasii, *which may be considered the main causal agent of the above diseases, also* P. "reactans" *and not yet characterised fluorescent pseudomonads participate to the expression of the diseases symptoms. Furthermore,* P. "reactans" *has been demonstrated to be the causal agent of* P. eryngii *yellowing. The demonstration that* P. "reactans" *is a pathogen of* Agaricus *spp. and* Pleurotus *spp. cultivated mushrooms is a novelty. The formation of phenotypic variants, which are avirulent and unable to produce WLIP (White Line Inducing Principle), in pure cultures of* P. "reactans" *may explain the variability and/or the loss of the character in the "white line", pathogenicity and plate antagonistic assays shown by strains of the bacterium. The high ratio of avirulent variants in the cultures of* P. "reactans" *strains may explain the not correct evaluation of the bacterium pathogenicity in the past.* P. agarici *was found responsible of brown discoloration of* A. bisporus *sporophores but the disease was observed only in a few cases.*

Introduzione

La produzione mondiale dei funghi coltivati è in continua crescita e, infatti, da poco più di 1.500.000 tonnellate del 1985 (Anonimo, 1988) essa è passata secondo dati FAO a 2.411.556 tonnellate nel 2000. Di tale produzione, costituita soprattutto da *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (prataiolo), poco meno della metà è di provenienza europea (1.002.223 t). La produzione italiana di funghi coltivati è pari a 61.623 t ed il fungo più coltivato è, anche in questo caso, il prataiolo seguito da *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum (ostricone) e da poche altre specie fungine tra cui *P. eryngii* (D.C. ex Fr.) Quél (cardoncello) (Parisi, 1989; Castelluccio, 1998).

I funghi coltivati, durante la loro crescita, sono attaccati da una serie di parassiti che sono causa di notevoli perdite della produzione (Fermor, 1986). Tali evenienze sono dovute alle particolari condizioni ambientali dove vengono generalmente effettuate le coltivazioni che, tra l'altro, vengono effettuate in maniera continuata. Sebbene a tale riguardo non siano disponibili dati attendibili, si ritiene che le malattie ad eziologia batterica siano le cause principali delle perdite del prodotto (Fermor, 1986). La maggior parte delle malattie batteriche dei funghi coltivati del genere *Agaricus* e *Pleurotus* sono causate da pseudomonadi fluorescenti (Fermor, 1986; Gill, 1995). Questo è il caso della "Maculatura bruna" del prataiolo (Paine, 1919) e l'"Ingiallimento" dell'ostricone (Ferri, 1985; Fermor, 1986) entrambe causate da *P. tolaasii*, della "Maculatura rossa" (Wong *et al.*, 1982) causata da *P. "gingeri"*, del "Mal della mummia" causata da *Pseudomonas* spp. (Tucker e Routien, 1942; Fletcher *et al.*, 1989) e del "Gocciolamento delle lamelle" (Young, 1970), causata da *P. agarici*, che sono malattie che interessano il prataiolo. *P. agarici* è stato riportato anche come l'agente responsabile della "Maculatura gialla" di *P. ostreatus*, osservata per la prima volta in California nel 1983 (Bessette *et al.*, 1985), e, più recentemente, della "Decolorazione bruna" del prataiolo (Geels *et al.*, 1994; Iacobellis e Lo Cantore, 1997).

Anche l'"Ingiallimento" del cardoncello, un fungo la cui coltivazione si è diffusa in questi anni in alcune regioni del meridione, è causata da pseudomonadi fluorescenti (Ferri, 1985; Iacobellis e Lavermicocca, 1990).

Le uniche malattie batteriche dei funghi coltivati causate da batteri diversi dalle suddette pseudomonadi fluorescenti sono il "Marciume molle" di *Agaricus spp.*, causato da *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* (ex *Pseudomonas gladioli* pv. *agaricicola*) (Lincoln *et al.*, 1991), e la "Necrosi interna" del gambo del prataiolo causato *Ewingella americana* (Richardson, 1993; Inglis *et al.*, 1996).

La frequente comparsa di una varietà di alterazioni, a volte estremamente dannose e probabilmente causate da infezioni batteriche, nelle coltivazioni di funghi coltivati del genere *Agaricus* e *Pleurotus*, in diverse fungaie ubicate in Puglia e Basilicata, ci hanno stimolati ad avviare una serie di studi volti a definire l'agente/i responsabile/i delle diverse alterazioni osservate. Il fatto che nelle piastre di isolamento ottenute dai carpofori alterati di prataiolo, ostricone e cardoncello sono state sempre osservate colonie con diversa morfologia ci ha indotto ad accertare la capacità patogenetica delle forme batteriche rappresentative dell'isolamento. Di seguito sono riportati alcuni dei risultati ottenuti. Risultati preliminari sono stati riportati (Iacobellis e Lo Cantore, 1997; 1998a; 1998b; Lo Cantore e Iacobellis, 2000; 2001).

Maculatura bruna del prataiolo

La "Maculatura bruna", causata dal batterio *Pseudomonas tolaasii*, è stata osservata per la prima volta in alcune fungaie negli Stati Uniti d'America (Tolaas, 1915) e la sua eziologia è stata definita qualche anno dopo (Paine, 1919). In Italia la malattia è stata riportata per la prima volta nel 1970 in una fungaia in Puglia (Ercolani, 1970). La malattia prende il nome dalle caratteristiche lesioni di forma irregolare, più o meno depresse, e di colore bruno nei tessuti superficiali del cappello e/o del gambo. In condizioni ambientali favorevoli, le lesioni dapprima piccole e separate, possono confluire, interessando ampie superfici del cappello che assumono una colorazione bruno-marrone. Talvolta i carpofori infetti, soprattutto quelli più giovani, possono essere interessati da una graduale marcescenza che è accompagnata da un odore forte e sgradevole. Ne sono colpiti sia funghi giovani che funghi pronti per la raccolta. Al tatto i funghi malati sono untuosi e viscidi. I sintomi della malattia possono comparire sui carpofori anche dopo la raccolta durante la conservazione in frigo o nella fase di commercializzazione (Wells *et al.*, 1996).

Gli isolamenti di batteri da maculature brune su carpofori di prataiolo riconducibili a quelle causate da *P. tolaasii*, osservate in diverse fungaie in Puglia e Basilicata, hanno sempre dato esito positivo. Comunque nelle piastre di isolamento sono state sempre osservate colonie con diversa morfologia. In particolare, dai pseudotessuti alterati sono stati sempre isolati batteri che hanno formato un precipitato bianco in agar (Wong e Preece, 1979) quando fatti accrescere vicino al ceppo NCPPB1311 di *P. "reactans"*. Tali isolati hanno causato un marcato imbrunimento con affondamento del plectenchima dei blocchetti di prataiolo. Inoltre, essi quando inoculati su carpofori interi di prataiolo sono risultati capaci di riprodurre i tipici sintomi della "Maculatura bruna". I suddetti caratteri patogenetici, e quelli biochimici e nutrizionali (Goor *et al.*, 1986; Lelliott e Stead, 1987), indicano che gli isolati batterici considerati sono ceppi di *P. tolaasii*.

Dagli stessi isolamenti sono stati sempre ottenuti, oltre a *P. tolaasii*, altri batteri con i caratteri biochimici del V gruppo delle pseudomonadi fluorescenti (Lelliott e Stead, 1987). Parte di tali isolati sono stati identificati come ceppi di *P. "reactans"*, una entità batterica non ancora classificata, e ritenuta una forma saprofitaria utilizzata per la identificazione specifica di *P. tolaasii* nel saggio della "linea bianca" (Wong e Preece, 1979). Infatti, essi hanno mostrato la capacità di formare precipitato in agar quando fatti accrescere vicino al ceppo tipo NCPPB2192 di *P. tolaasii* (Wong e Preece, 1979) e hanno mostrato i caratteri nutrizionali di *P. "reactans"* (Goor *et al.*, 1986). Essi, inoltre, hanno causato un marcato imbrunimento dei blocchetti di prataiolo sebbene, al contrario di ceppi di *P. tolaasii*, non ne abbiano determinato il disfacimento. Quando saggiati su carpofori interi di prataiolo i sintomi osservati sono risultati simili, anche se meno intensi, a quelli causati da ceppi di *P. tolaasii* utilizzati come confronto.

La contemporanea presenza di *P.*

tolaasii e di *P. "reactans"* nei tessuti alterati di prataiolo è stata dimostrata dalla presenza nella stessa piastra di isolamento di precipitati bianchi, riconducibili a quelli tipici osservati nel saggio della "linea bianca" (Wong e Preece, 1979), tra colonie di diversa morfologia.

Parte degli altri batteri con i caratteri biochimici del V gruppo delle pseudomonadi fluorescenti (Lelliott e Stead, 1987), non ancora caratterizzate, hanno causato alterazioni dei blocchetti di prataiolo in maniera comparabile a quelle determinate da ceppi di *P. "reactans"*.

Decolorazione bruna del prataiolo

Recenti indagini effettuati in Olanda hanno accertato che le coltivazioni di *Agaricus bisporus* sono interessate da una decolorazione bruna altamente dannosa in quanto i funghi con sintomi di imbrunimento non sono collocabili sul mercato (Geels *et al.*, 1994). I sintomi della malattia, al contrario della "Maculatura bruna" causata da *P. tolaasii*, sono costituiti da aree imbrunite e superficiali sul carpoforo. Da tali lesioni i suddetti autori hanno isolato in maniera predominante batteri identificati come ceppi di *Pseudomonas agarici* che è conosciuto come l'agente eziologico del "Gocciolamento delle lamelle" di *A. bisporus*, osservato e descritto per la prima volta nel 1970 in Nuova Zelanda (Young, 1970). Nei casi descritti (Geels *et al.*, 1994) non sono stati osservati i sintomi tipici del "Gocciolamento delle lamelle". In questo caso il batterio, infatti, attacca le lamelle del fungo, dopo la rottura del suo velo secondario, ed esse spesso non si sviluppano completamente o comunque subiscono un ritardo nello sviluppo con possibili conseguenti distorsioni del cappello (Young, 1970). Dalle piccole lesioni brune presenti su di esse trasudano goccioline bianco cremose di essudato batterico da cui è derivato il nome della malattia. Spesso possono essere osservate spaccature lungo il gambo da cui fuoriescono essudati batterici. Il "Gocciolamento delle lamelle", al contrario della "Decolorazione bruna" (Geels *et al.*, 1994), è considerata una malattia sporadica anche se in alcune aziende fungicole essa può manifestarsi con una certa intensità (Gill, 1995). *P. agarici* è stato riportato anche come responsabile della "Maculatura gialla" di *P. ostreatus*, osservata per la prima volta in California nel 1983 (Bessette *et al.*, 1985).

Da isolamenti effettuati da lesioni brune e superficiali su carpofori di prataiolo sono stati ottenuti batteri che hanno mostrato i caratteri biochimici, nutrizionali e patogenetici di *P. agarici* (Goor *et al.*, 1986; Lelliott e Stead, 1987). Essi sono stati in grado di causare l'imbrunimento dei blocchetti di prataiolo e di riprodurre la decolorazione bruna su carpofori interi di prataiolo. Questi risultati confermano che *P. agarici* è in grado di causare, oltre al "Gocciolamento delle lamelle", (Young, 1970), decolorazioni brune superficiali su pilei e stipiti di carpofori di prataiolo (Geels *et al.*, 1994). È da sottolineare che in Italia è la prima volta che *P. agarici* è risultato responsabile di malattia su prataiolo sebbene essa, sulla base delle esperienze acquisite in questi studi, sembra poco diffusa.

Ingiallimento dell'ostricone

L'"Ingiallimento" dell'ostricone è una malattia, causata da *Pseudomonas tolaasii*, di recente comparsa che interessa tutti gli stadi di sviluppo dei carpofori (Ferri, 1985; Fermor, 1986).

Quando la malattia insorge all'atto della differenziazione dei primordi, i giovani carpofori assumono una colorazione nocciola-giallastra e manifestano un rallentato sviluppo a cui ben presto segue un graduale "avvizzimento". L'alterazione può interessare tutto il gruppo dei giovani carpofori o solo parte di essi. In condizioni di elevata temperatura ed umidità i carpofori marciscono rapidamente con la produzione di un odore sgradevole.

Sul cappello di carpofori sviluppati compaiono maculature depresse, di colore giallo nocciola chiaro o arancio, talvolta, circondate da aree ingiallite. Talvolta, i carpofori presentano aree ingiallite che possono interessare anche tutto il carpoforo.

La malattia ha un andamento imprevedibile. In una stessa coltivazione tutte le confezioni di composto oppure solo parte di esse possono essere interessate dalle suddette alterazioni. In alcune confezioni la malattia appare in forma grave con un notevole calo produttivo mentre in altre si osserva solo un cambiamento di colore dei carpofori. La malattia interessa alle volte la prima volata e scompare nelle successive. In altre occasioni la prima volata è normale mentre con il procedere della produzione aumenta sempre più il numero dei carpofori con i sintomi della malattia. L'andamento della stessa talvolta non è soggetto a variazioni e rimane grave per tutto il periodo della produzione. Nulla si conosce sui fattori che determinano lo strano andamento della malattia.

Dalle maculature bruno-arancio, depresse e circondate da aloni giallastri presenti sui cappelli e/o gambi di *P. ostreatus* sono stati sempre isolati batteri che hanno formato precipitato in agar (Wong e Preece, 1979) quando fatti accrescere vicino al ceppo NCPPB1311 di *P. "reactans"*. Tali isolati hanno causato l'imbrunimento, necrosi e successivo disfacimento dei blocchetti di prataiolo e, inoltre, quando inoculati su carpofori di ostricone, 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. Al contrario, quando le stesse sospensioni sono state deposte sulle superfici integre del pileo, è stato 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 l'ingiallimento, l'arresto della crescita e quindi l'avvizzimento delle stesse. In alcuni casi, nello stesso tipo di saggio, i carpofori inoculati hanno mostrato maculature depresse di colore bruno-arancio. Non è escluso che tali lesioni siano state causate dalla penetrazione del batterio all'interno dei pseudotessuti del carpoforo attraverso soluzioni di continuità già presenti sulla superficie degli stessi. I suddetti caratteri, e quelli biochimici e nutrizionali (Goor *et al.*, 1986; Lelliott e Stead, 1987), indicano che gli isolati batterici in considerazione sono ceppi di *P. tolaasii*.

Dagli stessi isolamenti sono stati anche ottenuti altri batteri identificati come ceppi di *P. "reactans"*. Questi, quando inoculati su carpofori di ostricone, hanno causato sempre l'ingiallimento dei pseudotessuti 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.

Anche in questo caso, nella stessa piastra di isolamento, sono stati osservati precipitati bianchi tra colonie di diversa morfologia successivamente dimostrati essere ceppi di *P. tolaasii* e *P. "reactans"*.

Altri pseudomonadi fluorescenti, ottenuti insieme ai suddetti batteri e con i caratteri patogenetici su blocchetti di prataiolo simili a quelli dei ceppi di *P. "reactans"*, sono risultati negativi nel saggio della "linea bianca" (Wong e Preece, 1979) e diversi per alcuni caratteri nutrizionali (Goor *et al.*, 1986) da *P. tolaasii* e *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* spp. agenti causali del "Mal della mummia" utilizzati per confronto (Iacobellis e Lo Cantore, 1998b; risultati non pubblicati). Solo in alcuni casi oltre ai batteri riconducibili a *P. tolaasii* e *P. "reactans"* sono stati ottenuti batteri che, pur negativi nel saggio

della "linea bianca" e con una virulenza simile ai precedenti isolati, hanno mostrato gli stessi caratteri biochimici e nutrizionali di *P. tolaasii* (Goor *et al.*, 1986; Lelliott e Stead, 1987). Tali isolati sembrano essere varianti ipovirulenti di *P. tolaasii* (Rainey *et al.*, 1992; Iacobellis e Lo Cantore, 1998b; risultati non pubblicati).

Tali risultati indicano che tutte le forme batteriche qui descritte contribuiscono, sebbene in misura diversa, allo sviluppo dei sintomi dell'"Ingiallimento" dell'ostricone. In particolare, *P. tolaasii* sembra capace di causare lesioni bruno-arancio depresse e circondate da aree ingiallite e l'ingiallimento dei carpofori. *P. "reactans"* e/o le pseudomonadi fluorescenti, negative al saggio della "linea bianca", sembrano essere principalmente responsabili dell'ingiallimento dei carpofori di ostricone.

Tale evenienza viene supportata dal fatto che da lesioni gialle e superficiali presenti su carpofori di *P. ostreatus* e da piccoli carpofori ingialliti e mummificati, sono state ottenute principalmente batteri riconducibili a *P. "reactans"* e/o pseudomonadi fluorescenti negative al saggio della "linea bianca". Solo in alcuni casi da tali campioni patologici, insieme ai suddetti batteri, sono stati ottenuti anche batteri identificati come *P. tolaasii*.

Ingiallimento del cardoncello

L'"Ingiallimento" o più comunemente la "batteriosi" 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 *P. tolaasii* (Ferri, 1985), ma altri studi, se pur non definitivi, avevano indicato che ai funghi alterati erano associate delle pseudomonadi fluorescenti diverse da *P. tolaasii* (Iacobellis e Lavermicocca, 1990).

La malattia si manifesta sul cappello con una colorazione nocciola chiaro che poi vira verso i toni del marrone, marrone-rosso ruggine. Sul gambo i sintomi sono rappresentati da aree idropiche, spesso allungate, con tonalità di colore simili a quelle del cappello. Molto spesso tali aree confluiscono e l'alterazione interessa allora tutto il gambo. In condizioni di elevata umidità sul pileo e sullo stipite, compaiono gocciole di essudato batterico. Internamente i funghi ammalati presentano aree idropiche sparse che, confluendo, interessano estese aree del pileo e dello stipite. Gradualmente le aree idropiche necrotizzano determinando la comparsa di estesi nuclei necrotici. I funghi sono colpiti in ogni stadio del loro sviluppo. Sintomi della malattia sono presenti sia sui primordi, quando sono ancora nello spessore del terreno di copertura, sia sui funghi completamente sviluppati. L'infezione in ogni caso determina l'arresto dello sviluppo dei carpofori infetti, che marciscono ed emanano un odore sgradevole. L'andamento della malattia ha aspetti del tutto particolari. L'alterazione può comparire in maniera distruttiva in prima volata per poi scomparire del tutto in seconda con conseguente normale produzione. In altri casi avviene l'opposto. Altre volte la malattia ha uno sviluppo tale da compromettere completamente l'intera produzione. La malattia inizialmente può interessare aree ristrette, talvolta solo una parte di una famigliola, per poi estendersi a tutto il letto di coltivazione. È noto che una elevata umidità relativa e, soprattutto, la persistenza di acqua di condensa sulla superficie dei funghi aumenta l'insorgenza della batteriosi.

Da carpofori di cardoncello con sintomi di "Ingiallimento" sono state ottenute diverse forme morfologiche di pseudomonadi fluorescenti. La maggior parte di essi hanno alterato i blocchetti di prataiolo (Ercolani, 1970) sebbene l'intensità delle alterazioni è risultata inferiore a quella causata da ceppi autentici di *P. tolaasii* utilizzati come confronto. Una parte di tali isolati batterici, ottenuti costantemente nei diversi isolamenti, sono risultati positivi nel saggio della "linea bianca" (Wong e Preece, 1979) e, in particolare, hanno formato un precipitato in agar quando fatti accrescere vicino al ceppo tipo NCPPB2192 di *P. tolaasii*.

Tutti gli isolati batterici virulenti hanno presentato

i caratteri LOPAT del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti (Lelliott e Stead, 1987). Gli isolati batterici positivi nel saggio della "linea bianca", quando saggiati per i caratteri nutrizionali differenziali dei batteri patogeni dei funghi coltivati, hanno presentato i caratteri tipici di *P. "reactans"* (Goor *et al.*, 1986).

I saggi di patogenicità sulle confezioni di substrato infungato in produzione di cardoncello con ceppi di *P. "reactans"* non sempre hanno dato un esito chiaro e definitivo. Infatti, tali ceppi sono risultati capaci di riprodurre i sintomi della batteriosi ma, talvolta, gli stessi sintomi sono stati osservati nei pani del fungo non inoculati e/o trattati con acqua distillata sterile. Dai funghi alterati provenienti dai suddetti pani sono stati sempre isolati batteri con i caratteri biochimici, nutrizionali e patogenetici di *P. "reactans"* ed altri batteri con i caratteri LOPAT del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti. Evidentemente tali batteri sono già presenti o comunque si sono insediati nelle confezioni di substrato infungato in produzione e/o nel terriccio utilizzato per coprire la superficie delle confezioni; essi, nelle condizioni di saggio, sembrerebbero, quindi, capaci di causare la malattia.

L'uso nelle stesse prove di patogenicità del ceppo NCPPB1311 di *P. "reactans"* naturalmente resistente alla rifampicina ha permesso di dimostrare, almeno in parte, i postulati di Koch. In questo caso, dai carpofori inoculati artificialmente con il suddetto ceppo di *P. "reactans"* e che mostravano i sintomi di "Ingiallimento", sono stati isolati diversi batteri. In particolare, sono stati ottenuti batteri resistenti alla rifampicina con le stesse caratteristiche del ceppo di *P. "reactans"* utilizzato nelle inoculazioni artificiali ed altri batteri non resistenti all'antibiotico, rispettivamente, con i caratteri di *P. "reactans"* e di quelli del gruppo V delle pseudomonadi fluorescenti (Iacobellis e Lo Cantore, 1988a; risultati non pubblicati).

Tali risultati indicano chiaramente che *P. "reactans"* può essere considerato il responsabile dell'"Ingiallimento" del cardoncello. Il fatto che in studi paralleli (Iacobellis e Lo Cantore, risultati non pubblicati) da un carpoforo di cardoncello selvatico che mostrava un'estesa area di 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 contribuiscono, come dimostrato nel caso dell'"Ingiallimento" dell'ostricone (Iacobellis e Lo Cantore, 1988b), allo sviluppo dei sintomi dell'"Ingiallimento" su cardoncello. Da carpofori di cardoncello con i sintomi di "Ingiallimento", non sono mai stati ottenuti batteri riconducibili in senso stretto a *P. tolaasii* (Goor *et al.*, 1986; Lelliott e Stead, 1987; Wong e Preece, 1979). 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" del cardoncello.

Conclusioni

I risultati riportati indicano chiaramente che la "Maculatura bruna" del prataiolo e l'"Ingiallimento" dell'ostricone, ritenute causate da *P. tolaasii* (Bradbury, 1987; Rainey *et al.*, 1992; Gill, 1995; Soler-Rivas *et al.*, 1999), in realtà sono delle malattie causate da diverse entità batteriche (Iacobellis e Lo Cantore, 1997; Iacobellis e Lo Cantore, 1988b; risultati non pubblicati). In particolare, *P. tolaasii*, che è da ritenere il patogeno principale, e *P. "reactans"* ed altre pesudomonadi fluorescenti, non ancora caratterizzate, sembrano tutte contribuire, sebbene in maniera diversa, allo sviluppo dei sintomi delle due malattie considerate. Allo stato attuale delle conoscenze *P. "reactans"*, è l'agente eziologico

del cardoncello (Iacobellis e Lo Cantore, 1988a; risultati non pubblicati).

La dimostrazione che *P. "reactans"* è un patogeno dei funghi coltivati del genere *Agaricus* e *Pleurotus* è una novità sebbene alcuni autori (Kim *et al.*, 1995; Wells *et al.*, 1996) avevano osservato che isolati di *P. "reactans"* erano positivi nei saggi di patogenicità. In generale, comunque, la capacità patogenetica del batterio non era stata valutata pienamente.

P. "reactans" è conosciuto in bibliografia come una forma batterica saprofitaria associata ai funghi coltivati del genere *Agaricus* e utile nella saggio della "linea bianca" (Wong e Preece, 1979) per la specifica identificazione di *P. tolaasii*. Il saggio consiste nella formazione di un precipitato bianco ("linea bianca") tra le colonie di ceppi di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"* accresciuti in vicinanza su substrati agarizzati (Wong e Preece, 1979). La formazione del precipitato bianco, il cui meccanismo non è ben conosciuto, è apparentemente dovuto all'interazione della tolaasina e del WLIP ("White Line Inducing Principle") (Mortishire-Smith *et al.*, 1991), lipodepsipeptidi prodotti, rispettivamente, da ceppi di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"* (Wong e Preece, 1979; Rainey *et al.*, 1992; Soler-Rivas *et al.*, 1999).

Saggi della "linea bianca", di patogenicità e di antagonismo in piastra con un numero discreto e rappresentativo di ceppi di *P. tolaasii* e di *P. "reactans"*, isolati dalle tre specie di funghi coltivati, hanno 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 (Lo Cantore e Iacobellis, 2000; Lo Cantore *et al.*, 2001). Tali varianti hanno perso i caratteri presi in considerazione. Mentre per *P. tolaasii* la formazione di varianti fenotipiche nelle colture del batterio è un fenomeno noto (Rainey *et al.*, 1992; Grewal *et al.*, 1994; Soler-Rivas *et al.*, 1999), per *P. "reactans"* è, invece una novità. Le varianti morfologiche isolate da ceppi di *P. tolaasii* sono avirulente e sono negative nel saggio della "linea bianca" (Rainey *et al.*, 1992; Grewal *et al.*, 1994; Lo Cantore e Iacobellis, 2000; 2001). Questi comportamenti sono il risultato dell'incapacità delle varianti di produrre la tolaasina I, principale metabolita tossico del batterio, responsabile dei sintomi delle malattie causate da *P. tolaasii* (Rainey *et al.*, 1992; Gill, 1995; Soler-Rivas, 1999; Lo Cantore e Iacobellis, 2000; Lo Cantore *et al.*, 2001). Anche le varianti morfologiche di *P. "reactans"* sono risultate avirulente, hanno perso l'abilità di produrre WLIP e sono risultate negative nel saggio della "linea bianca" (Lo Cantore e Iacobellis, 2000; Lo Cantore *et al.*, 2001). Tutto ciò induce a pensare che il WLIP sembra coinvolto nei fenotipi sopra elencati (Lo Cantore e Iacobellis, 2000; Lo Cantore *et al.*, 2001). La formazione di varianti avirulenti in colture di *P. "reactans"* può spiegare l'osservazione della notevole variabilità nella virulenza del batterio ed essere probabilmente responsabile, in presenza di un alto rapporto di varianti nelle colture, dell'attenuazione e/o della perdita della patogenicità. Tali evenienze, riscontrate nel corso degli studi i cui risultati (Lo Cantore e Iacobellis, 2000; Lo Cantore *et al.*, 2001) sono in parte riportati in questa nota, potrebbero spiegare anche perché la patogenicità di *P. "reactans"* non sia stata valutata correttamente nel passato.

Infine, i risultati riportati nel presente lavoro hanno confermato che *P. agarici* è responsabile, oltre al "Gocciolamento delle lamelle", (Young, 1970), della "Decolorazione bruna" del prataiolo già riportata da Geels *et al.*, (1994) in Olanda. Le aree imbrunite sui carpofori di prataiolo causate da *P. agarici*, a differenza di quelle causate da *P. tolaasii* sullo stesso fungo coltivato, sono comunque superficiali e non si affondano nel plectenchima.

Ringraziamenti

Si ringrazia L'azienda Fungo Puglia Cooperativa, Rutigliano (Ba) per la collaborazione.

Bibliografia

Anonimo, 1988 - *Studio dei settori minori dell'agricoltura con particolare riferimento a fungicoltura, apicoltura ed elicicoltura*. CENASAC, Roma, 64-87, 163-172, 176-177, 215.

Bessette A.E., Kerrigan R.W., Jordan D.C., 1985 – *Yellow blotch of Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology, 50, 1535.

Bradbury J.F., (1986) - *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Cab, Ferry Lane England, pp. 332.

Castelluccio M., 1998 - *Aggiornamenti sulla coltivazione e la commercializzazione del cardoncello*. Agricoltura Ricerca, 176, 179.

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.

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.

Ferri F., 1985 - *I funghi. Micologia, isolamento, coltivazione*. Edagricole, Bologna, 398 pp.

Fletcher J.T., White P.F., Gaze R.H., 1989 – *Mushrooms Pest and disease control*. Intercept Limited, Ponteland, Newcaslte upon Tyne, 174 pp.

Geels F.P., Hesen L.P.W., Van Griensven L.J.L.D., 1994 - *Brown discoloration of mushrooms caused by* Pseudomonas agarici. Journal of Phytopathology, 140, 249.

Gill W.M., 1995 – *Bacterial diseases of Agaricus Mushrooms*. Report Tottori Mycological Institute, 33, 34.

Goor M., Vantomme R., Swings J., Gillis M., Kersters K., 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.

Grewal S., Han B. and 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.

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

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.

Iacobellis N. S. e Lo Cantore P., 1998a - *Recenti acquisizioni sul determinismo della batteriosi del cardoncello* (Pleurotus eryngii), Agricoltura Ricerca, 176, 51.

Iacobellis N. S. e Lo Cantore P., 1998b - *Studi sull'eziologia dell'ingiallimento dell'ostricone* (Pleurotus ostreatus), Agricoltura Ricerca, 176, 55.

Inglis P.W., Burden J.L., Peberdy J.F., 1996 - *Evidence for the association of the enteric bacterium* Ewingella americana *with internal stipe necrosis of* Agaricus bisporus. Microbiology, 142, 3253.

Kim J.W., Kwon S.I., Kang H.J., 1995 - *Studies on the pathogenic* Pseudomonas *causing bacterial diseases of cultivated mushrooms in Korea 2. Bacteriological characteristics of* P. tolaasii *causing mushroom brown blotch and white line reacting organisms*. Korean Journal of Plant Pathology, 11, 4, 353.

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.

Lincon S.P., Fermor T.R., Stead D.E., Sellwood J.E., 1991 - *Bacterial soft rot of Agaricus bitorquis*. Plant Pathology, 40, 136.

Lo Cantore P. and Iacobellis N. S., 2000 - *Phenotypic variability in* Pseudomonas "reactans" *and* P. tolaasii. Book of abstracts 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology. Taormina - Giardini Naxos, Italy, 10-22 Settembre 2000, 46.

Lo Cantore P., Lazzaroni S., Evidente A., Iacobellis N. S., 2001 - Biological characterization of tolaasiin and WLIP,

lipodepsipeptides of *Peudomonas tolaasii* and *P. "reactans"*, and their possible role in the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. Journal of Plant Pathology, 236.

Mortishire-Smith R.J., Nutkins J.C., Packman L.C., Brodey C.L., Rainey P.B., Johnstone K., Williams D.H. 1991 - *Determination of the structure of an extracellular peptide produced by the mushroom saprotroph Pseudomonas reactans*. Tetrahedron, 47, 3645.

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

Paine S.G., 1919 - *A brown blotch disease of cultivated mushrooms*. Annales Aplied Biology, 5, 206.

Rainey P. B., Brodey C. L., Johnstone K., 1992 - *Biology of Pseudomonas tolaasii, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom*. Advances in Plant Pathology, Vol 8, Academic Press, London, 96-117.

Richardson P.N., 1993 - *Stipe necrosis of cultivated mushrooms* (Agaricus bisporus) *associated with a fluorescent pseudomonad*. Plant Pathology, 42, 927.

Tolaas A.G., 1915. *A bacterial disease of cultivated mushrooms*. Phytopathology, 5, 51.

Tucker C.M., Routien J.B., 1942 - *The mummy disease of cultivated mushrooms*. Bulletin Missouri Agricultural Experimental Station, 358.

Wells J. M., Sapers G. M., Fett W. F., Butterfield J. E., Jones J. B., Bouzar H., Miller F. C., 1996 - *Postharvest discoloration of the cultivated mushrooms* Agaricus bisporus *caused by* Pseudomonas tolaasii, P. "reactans" *and* P. "gingeri". Phytopathology, 86, 1098.

Wong W. C., 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.

Young J. M., 1970 - *Dryppy gill: a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by* Pseudomonas agarici n. sp. New Zealand Journal of Agricultural Research 13, 977.