



ANNALI

DELLA FACOLTA' DI AGRARIA DELL' UNIVERSITA'
SASSARI

studi sassaresi

Sezione III

1982

Volume XXIX

ANNALI

DELLA FACOLTA' DI AGRARIA DELL' UNIVERSITA'

————— SASSARI —————

DIRETTORE: G. RIVOIRA

COMITATO DI REDAZIONE: M. DATILO - S. DE MONTIS - F. FATICHENTI
C. GESSA - L. IDDA - F. MARRAS - A. MILELLA - P. PICCAROLO - A. PIETRACAPRINA
R. PROTA - G. TORRE - A. VODRET

studi sassaresi

ORGANO UFFICIALE
DELLA SOCIETÀ SASSARESE DI SCIENZE MEDICHE E NATURALI



Istituto di Patologia vegetale dell'Università di Sassari

(Direttore: Prof. F. Marras)

M. FIORI · C. CARTA · A. FRANCESCHINI

IL «MARCUME MOLLE» DEI FRUTTI DI POMODORO
DA *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA* (BURKHOLDER) DOWSON *

RIASSUNTO

Si riferisce sui risultati di osservazioni e ricerche su un grave «marciume molle» che colpisce i frutti di pomodoro nelle serre fredde della Sardegna meridionale.

Vengono descritti la malattia ed il patogeno che, in base ai caratteri morfologici, colturali, biochimici e sierologici, è stato identificato con *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson.

SUMMARY

The soft rot of tomato by *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson.

The Authors report on the results of researches about a serious soft rot of greenhouse tomato fruits in southern Sardinia (Italy).

The disease symptoms and the characteristics of the causal agent, identified by its morphological and cultural characters, and by biochemical and serological tests, as *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson, are described.

L'espandersi in questi ultimi anni del pomodoro in coltura protetta, peraltro molte volte in un ambiente non certo ottimale — soprattutto per l'insufficiente apporto calorico, dati gli elevati costi energetici, e il conseguente eccessivo grado di umidità — nonché l'impiego di nuove cultivar ed ibridi per soddisfare meglio le esigenze del mercato, hanno esaltato l'aggressività di parassiti che nel passato, in condizioni meno favorevoli, non esplicavano tutta la loro potenzialità patogena. Ed è appunto in quest'ottica che va visto l'insorgere ed il diffondersi in forma grave, specialmente nelle serre a copertura in polietilene della Sardegna meridionale, di un «marciume molle» batterico dei frutti di pomodoro.

* Lavoro eseguito con il contributo finanziario del M.P.I.

Dalla letteratura fitopatologica risulta che il «marciume molle» dei frutti di pomodoro può essere indotto oltre che, comunemente, dai batteri coliformi pectolitici (cfr., tra gli altri, WINGARD, 1924; RAINIO, 1932; BARTZ e CRILL, 1972; BATSON, 1973; JONES e Mc CARTER, 1974; BARZIC *et al.*, 1976) anche da specie di *Pseudomonas*: *P. marginalis* (Brown) Stevens, *P. viridilivida* (Brown) Bergey *et al.*, (BROWN, 1926 rispettz. *sub Bacterium marginale* Brown e *Bact. viridilividum* Brown), *P. syringae* Van Hall (BROWN, *l.c. sub Bact. savastanoi* Smith; VOLCANI, 1954), *P. syringae* pv. *capsici* (ARSENIJEVIC e RADUSIN, 1981); di *Xanthomonas*: *X. malvacearum* (Smith) Dowson (BROWN, *l.c. sub Bact. malvacearum* Smith), *X. Lycopersici* var. *vitiati* Strzalk. (STRZALKOWSKA, 1930 *sub Bact. lycopersici vitiati* Strzalk.; ABD-EL-REHIM, 1965); e da *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn (BROWN, *l.c. sub Bact. tumefaciens* Smith et Townsend), *Bacillus frutodestruens* Madhok et Ud-Din (MADHOK e UD-DIN, 1943) e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (VOLCANI e WAHL, 1954).

Per quanto riguarda l'Italia, a quel che ci consta, non sono mai stati segnalati batteri agenti di «marciumi molli» di frutti di pomodoro né in coltura protetta né in pieno campo. Pertanto, abbiamo creduto opportuno occuparci da vicino della malattia e del batterio responsabile. In questa nota riferiamo appunto i risultati delle nostre ricerche.

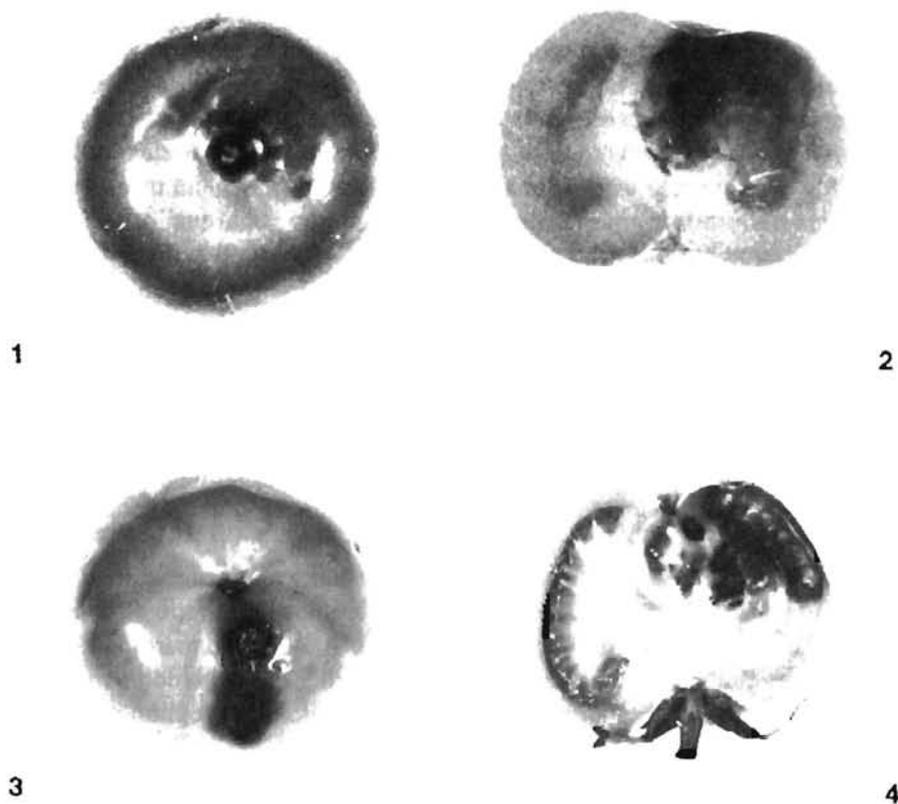
CARATTERI GENERALI DELLA MALATTIA — SINTOMATOLOGIA

La malattia è stata riscontrata nelle colture invernali degli ibridi «Flamingo» e «Fandango», soprattutto, come già detto, nelle serre fredde con copertura di polietilene nelle quali si interviene con apporti calorici di soccorso. Essa compare all'inizio della raccolta e colpisce esclusivamente le bacche, tanto quelle ancora verdi come quelle già invaliate.

L'affezione è caratterizzata dalla presenza sulla superficie del frutto, di solito in corrispondenza dell'estremità stilare, di una macchia necrotica di colore marrone scuro, leggermente depressa e con alone traslucido, di forma più o meno tondeggiante e di dimensioni variabili a seconda dello stadio dell'infezione.

L'imbrunimento interessa anche, e soprattutto, i tessuti interni sottostanti sino alle logge. A mano a mano che l'infezione si estende il frutto diviene sempre meno consistente ed infine marcisce.

Le osservazioni al microscopio di frammenti di tessuto imbrunito mostrano la presenza di numerosi batteri mobili.



Il «marciume molle» dei frutti di pomodoro da *Pseudomonas viridiflava*: infezioni naturali (Figg. 1-2) e artificiali (Figg. 3-4).

Symptoms of «soft rot» by *Pseudomonas viridiflava* on tomato fruits naturally (Figs. 1-2) and artificially (Figs. 3-4) infected.

ISOLAMENTO DEL PATOGENO — PROVE DI PATOGENICITÀ

Sospensioni in acqua sterile di frammenti di tessuto infetto sono state strisciate, direttamente o mediante opportuna diluizione, su piastre di agar nutritivo. Dopo 48 ore di incubazione a 25° C si sviluppavano colonie batteriche trasparenti, biancastre, di consistenza viscosa, piatte, circolari con margine dentato e diametro da 2 a 3 mm.

La patogenicità degli isolati è stata saggiata su bacche di «Flamingo» e «Fandango» ancora verdi e all'inizio dell'invasatura.

La tecnica dell'inoculazione consisteva nel ferire con un ago sterile le bacche in prossimità dello stilo e nel contaminare le ferite con una goccia di sospensione batterica (10^8 cell/ml) ottenuta da strisci di 24 ore su agar nutritivo. I controlli sono stati inoculati con acqua sterile. Ad ultimo le bacche sono state poste sotto campana di vetro e tenute a temperatura ambiente. A quattro giorni dall'inoculazione tutte le bacche infettate manifestavano sintomi del tutto simili a quelli riscontrati in natura. I caratteri del batterio reisolato erano identici a quelli dell'isolato da bacche naturalmente infette.

IDENTIFICAZIONE DEL PATOGENO

Caratteri morfologici e colturali

I batteri, allevati a 25° C per 24 ore su agar nutritivo, si presentano a forma di bastoncino diritto, di dimensioni 1,2 - 2,7 x 0,43-0,65 μ m, singoli o accoppiati, Gram negativi, aerobi e mobili per la presenza di 2-3 flagelli polari.

Su brodo nutritivo semplice essi mostrano un buon accrescimento e torbidità omogenea dopo 48 ore a 25° C. Su agar nutritivo glucosato, dopo 48 ore a 25° C, le colonie sono di forma circolare con diametro di 1,5-2 mm e margine dentato, di colore bianco giallino, traslucide, rilevate, a superficie liscia e consistenza viscida. Su agar nutritivo al 5% di saccarosio, dopo tre giorni, si formano colonie mucoidi, convesse, biancastre con centro verde, levano negative; dopo sette giorni esse assomigliano a colonie levaniformi. Su YDC-agar (glucosio 2%; Yeast Extract 1%; CaCO₃ 2%; agar 1,5%) le colonie producono dopo 48 ore un pigmento verdastro che col tempo diviene marrone scuro.

Il batterio cresce a 4° C ma non a 37° C; l'*optimum* è compreso tra 25 e 27° C.

Attività fisiologiche e biochimiche

I batteri sono ossidasi negativi (KOVACS, 1956) e catalasi positivi; sul substrato «B» di KING *et al.* (1954) producono un pigmento fluorescente visibile alla luce ultravioletta; provocano entro 24 ore la reazione di ipersensibilità su tabacco «White Burley» (sec. KLEMENT, 1963); non liquefanno il gel pectico (PATON, 1959) e causano, entro 48 ore, la marcescenza completa dei tasselli di patata *in vitro*; liquefanno la gelatina dopo sei giorni in infissioni a 22° C; non riducono i nitrati e non producono alcali dall'arginina (THORNLEY, 1960); non producono 2-chetogluconato (LELLIOTT *et al.*, 1966); idrolizzano la caseina, la tirosina, l'escu-

lina, l'urea (CHRISTENSEN, 1946) e il Tween 80 (SIERRA, 1957) ma non l'amido; non producono indolo da triptofano né acido solfidrico da cisteina; alcalinizzano e peptonizzano il latte tornasolato entro dieci giorni. Nel terreno di Simmon utilizzano dopo quattro giorni acetato, citrato, formiato, lattato, malato e succinato di sodio ma non ossalato e tartrato. Crescono bene su brodo nutritivo contenente il 2% di NaCl ma debolmente quando la concentrazione del sale viene portata al 5%; metabolizzano il glucosio in maniera ossidativa (HUGH e LEIFSON, 1953). Producono acido senza gas da arabinosio, fucosio, galattosio, glicerina, glucosio, mannosio e xilosio ma non da cellobiosio, lattosio, maltosio, ramnosio, saccarosio, salicina e trealosio (AYERS *et al.*, 1919). I dati relativi a tali saggi diagnostici sono riportati nella tabella 1.

I risultati ottenuti indicano che il nostro isolato, sia per i caratteri principali (LO-PAT) come per quelli sussidiari, va collocato senz'altro nel gruppo II dello schema determinativo di LELLIOTT *et al.* (*l.c.*) e che è assimilabile a *P. viridiflava* (Burkholder) Dowson. Tra l'altro, nei saggi sierologici effettuati con i metodi della precipitazione in provetta e della doppia diffusione in agar, l'antisiero al nostro isolato (titolo: 2048) ha reagito positivamente con 3 isolati di *P. viridiflava*: NCPPB¹ 1250 da prezzemolo, NCPPB 1382 da pomodoro ed NCPPB 1810 da fagiolo nano.

Dalla letteratura fitopatologica risulta che su pomodoro *P. viridiflava* è stata riscontrata per la prima volta in Kenia da ROBINSON (cfr. BILLING, 1970). Successivamente essa è stata reperita in Nuova Zelanda quale agente di un «marciume del fusto» in colture di pieno campo (WILKIE *et al.*, 1973) e, più recentemente, in Giappone su foglie, fusti e sepali (NISHIYAMA *et al.*, 1979). Sembrerebbe pertanto che il nostro sia il primo reperto di *P. viridiflava* quale agente di un «marciume molle» di frutti di pomodoro in natura.

¹ NCPPB = National Collection Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden (U.K.).

Tab. 1 Risultati dei principali saggi diagnostici
Results of main diagnostic tests

Saggi	Periodo di osservazione in giorni							
	1	2	3	4	5	6	7	15
Produzione di levano			—					—
Fluorescenza su KB	+	+						
Produzione di ossidasi	—							
Marciume patata	+	+						
Arginina deidrolasi	—	—	—	—	—	—	—	—
Ipersensibilità su tabacco	+							
Produzione di 2-chetogluconato			—					—
Riduzione dei nitrati			—					—
Metabolismo del glucosio:								
fermentativo	—	—	—	—	—	—	—	—
ossidativo	—	±	±	+	+	+	+	+
Idrolisi: gelatina	—	—	—	—	—	+	+	
esculina	+							
tirosina	+							
amido	—	—						
pectato	—	—	—					
caseina	—	—		+				
urea	—	±	+	+	+	+	+	
Produzione di: indolo		—						—
H ₂ S		—						—
Lipolisi del Tween 80	—	—	—	—	+			
Utilizzazione di: acetato	—	±	±	+				
citrato	—	±	±	+				
formiato	—	±	±	+				
lattato	—	±	±	+				
malato	—	±	±	+				
succinato	—	±	±	+				
ossalato	—	—	—	—	—	—	—	—
tartrato	—	—	—	—	—	—	—	—
Acidità da: arabinosio	—	—	—	+	+	+	+	+
fucosio	—	—	—	+	+	+	+	+
galattosio	—	—	—	—	+	+	+	+
glicerina	—	—	+	+	+	+	+	+
glucosio	—	—	—	+	+	+	+	+
mannosio	—	—	+	+	+	+	+	+
xilosio	—	+	+	+	+	+	+	+
cellobiosio	—	—	—	—	—	—	—	—
lattosio	—	—	—	—	—	—	—	—
maltosio	—	—	—	—	—	—	—	—
ramnosio	—	—	—	—	—	—	—	—
saccarosio	—	—	—	—	—	—	—	—
salicina	—	—	—	—	—	—	—	—
trealosio	—	—	—	—	—	—	—	—

Reazione positiva +; Reazione debolmente positiva ±; Reazione negativa —.

BIBLIOGRAFIA

- ABD-EL-REHIM M.A., 1965 — Two bacterial rots of tomato fruits. *Alex. J. agric. Res.*, 12, 73-80.
- ARSENIJEVIC M., RADUSIN N., 1981 — Etioloska proučavanja bakteriozne pegavosti i truleži paradajza. *Zastita Bilja*, 32, 293-305.
- AYERS S.H., RUPP P., JOHNSON W.T., 1919 — A study of the alkali-forming bacteria found in milk. *Bull. U.S. Dept. Agric. n. 782*.
- BARZIC M.R., SAMSON R., TRIGALET A., 1976 — Pourriture bactérienne de la tomate cultivée en serre. *Ann. Phytopath.*, 8, 237-240.
- BARTZ J.A., CRILL J.P., 1972 — Tolerance of fruit of different tomato cultivars to soft rot. *Phytopathology*, 62, 1085-1088.
- BATSON W.E. Jr., 1973 — Characterization and control of tomato fruit rots. *Plant Dis. Repr.*, 57, 453-456.
- BILLING E., 1970 — *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder, 1930; Clara, 1934). *J. appl. Bact.*, 33, 492-500.
- BROWN N.A., 1926 — A stem-end and center rot of tomato caused by various unrelated organisms. *J. Agric. Res.*, 33, 1009-1024.
- CHRISTENSEN W.B., 1946 — Urea decomposition as a mean of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bact.*, 52, 461.
- HUGH R., LEIFSON E., 1953 — The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24-26.
- KING E.O., WARD M.K., RANEY D.E., 1954 — Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 301-307.
- KLEMENT Z., 1963 — Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*, 199, 299-300.
- KOVACS N., 1956 — Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.
- JONES C.W., MCCARTER S.M., 1974 — Etiology of tomato fruit rots and evaluation of cultural and chemical treatments for their control. *Phytopathology*, 64, 1204-1208.
- LELLIOTT R.A., BILLING E., HAYWARD A.C., 1966 — A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470-489.
- MADHOK M.R., UD-DIN F., 1943 — Bacterial soft rot of tomatoes caused by a spore forming organism. *Indian J. agric. Sci.*, XII, 2, 129-133.
- NISHIYAMA K., YAMAMOTO T., UMEKAWA M., EZUKA A., 1979 — [Bacterial black spot of tomato caused by *Pseudomonas viridiflava*]. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 45, 221-227.
- PATON A.M., 1959 — An improved method for preparing pectate gels. *Nature*, 183, 1812-1813.
- RAINIO A.J., 1932 — Untersuchungen über ein Fäulnisbakterium der Tomatenfrüchte (*Bacillus aroideae* Townsend). *Valtion Maatalouskoetöiminnan Julkaisuja*, 45, 29 pp.
- SIERRA G., 1957 — A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23, 15.
- STRZALKOWSKA H., 1930 — Zgnilizna wodnista Pomidora. *Acta Soc. Bot. Pol.*, VII, 4, 599-614.
- THORNLEY M.J., 1960 — The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. appl. Bact.*, 23, 37-52.
- VOLCANI Z., 1954 — An onion and tomato disease caused by a variety of *Pseudomonas syringae*. *Bull. Res. Counc. Israel*, 4, 171-175.
- VOLCANI Z., WAHL I., 1954 — Bacterial Soft Rot on Tomato Fruits affected by the Late Blight Fungus. *Phytopathology*, 44, 274-275.
- WILKIE J.P., DYE D.W., WATSON D.R.W., 1973 — Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *N.Z.J. Agric. Res.*, 16, 315-323.
- WINGARD S.A., 1924 — Bacterial soft-rot of tomato. *Phytopathology*, 14, 451-459.