

MACULATURE FOGLIARI CAUSATE DA *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA* SU PIANTE AROMATICHE ED ORNAMENTALI IN LIGURIA

M. ODASSO¹, L. REPETTO¹, S. RAPETTI¹, E. BIONDI², A. GALEONE²,
P. MARTINI¹

¹Istituto Regionale per la Floricoltura, Via Carducci 12 - 18038 Sanremo (IM)

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali - Area Patologia Vegetale,
Università di Bologna, V.le Fanin 40 - 40127 Bologna
martini@regflor.it

RIASSUNTO

In questa nota si descrivono maculature fogliari, causate dal batterio *Pseudomonas viridiflava*, di recente rinvenimento nel ponente ligure su alcune specie aromatiche, quali aneto, lavanda, prezzemolo, rosmarino, salvia, nonché su alcune specie ornamentali, quali anemone, aralia, dimorfoteca, margherita e papavero. Tale malattia è molto preoccupante non solo per la gravità dei danni che può causare alle colture colpite, ma, soprattutto, per la singolare rapidità dimostrata nel diffondersi su ospiti appartenenti a diverse specie vegetali, a prescindere dalle condizioni colturali.

Parole chiave: batteriosi, *Anemone coronaria*, *Anethum graveolens*, *Argyranthemum frutescens*, *Fatsia japonica*, *Osteospermum* spp., *Papaver nudicaule*, *Petroselinum sativum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *S. officinalis* "Icterina"

SUMMARY

BACTERIAL LEAF SPOT CAUSED BY *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA* ON AROMATICS AND ORNAMENTAL PLANTS IN LIGURIA REGION

An overview of bacterial leaf spots caused by *Pseudomonas viridiflava* on aromatic as *Anethum graveolens*, *Petroselinum sativum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *S. officinalis* "Icterina" and ornamental crops as *Anemone coronaria*, *Fatsia japonica*, *Argyranthemum frutescens*, *Osteospermum* spp., *Papaver nudicaule*, in Liguria (Northern Italy), is provided. This bacterial disease has to be considered significant not only for the severe damages caused, but especially, for the quick spread within different host plant species, regardless the crop conditions.

Keywords: bacterial disease, *Anemone coronaria*, *Anethum graveolens*, *Argyranthemum frutescens*, *Fatsia japonica*, *Osteospermum* spp., *Papaver nudicaule*, *Petroselinum sativum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *S. officinalis* "Icterina"

INTRODUZIONE

Nella Riviera Ligure di ponente, le maculature fogliari causate dal batterio *Pseudomonas viridiflava* su piante aromatiche ed ornamentali sono avversità di recente osservazione. I primi rinvenimenti risalgono al 2001 su ranuncolo (Rapetti *et al.*, 2002; Zoina *et al.*, 2005), poi, nel 2007, su basilico (Minuto *et al.*, 2008) e, nel 2008, su *Lavandula stoechas* (Minuto A., comunicazione personale). Sempre nel 2008 maculature fogliari provocate da *Pseudomonas* spp. sono state osservate su piante aromatiche quali salvia e rosmarino (Martini *et al.*, 2009), nonché su margherita a fiore rosa (Minuto A., comunicazione personale).

Recentemente, in soli 2-3 anni, sintomi molto simili a quelli descritti nelle segnalazioni sopra citate, sono stati rinvenuti su molte altre specie vegetali coltivate sia in vaso (come salvia e rosmarino fra le aromatiche, dimorfoteca e margherita a fiore bianco fra le floricole) sia in piena terra (come aralia, anemone, papavero fra le floricole; prezzemolo e aneto fra le

orticole) molte delle quali di grande interesse per l'agricoltura del ponente ligure. In tutti questi casi la sintomatologia osservata - sia pure con modeste variazioni imputabili alla diversa consistenza e struttura delle varie specie interessate - era molto simile a quella causata da *Pseudomonas viridiflava* su ranuncolo e basilico. Si trattava di alterazioni costituite da piccole maculature (2-3 mm di diametro) inizialmente idropiche, a contorno angolare, di colore bruno scuro/nero e, in condizioni di elevata umidità relativa, confluenti a formare maculature più estese; nei casi più gravi le foglie colpite disseccavano. Su tutte le specie oggetto della ricerca le alterazioni fogliari sono sempre state osservate nel periodo invernale-primaverile (tabella 1), con la sola eccezione di un caso osservato su rosmarino a fine estate.

Tabella 1. Data di comparsa dei sintomi della malattia, specie ospiti, tipo di coltivazione e località

Comparsa sintomi	Specie	Famiglia	Coltivazione	Località
Gennaio 2008	<i>Osteospermum</i> spp.	<i>Asteraceae</i>	Vaso	Albenga SV
Marzo 2008 Settembre 2010	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Labiatae</i>	Vaso	Albenga SV
Maggio 2008	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Labiatae</i>	Vaso	Albenga SV
Aprile 2009	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Labiatae</i>	Vaso	Albenga SV
Marzo 2010 Marzo 2011	<i>Agyranthemum frutescens</i> "Stella 2000"	<i>Asteraceae</i>	Vaso	Albenga SV
Maggio 2010	<i>Salvia officinalis</i> "Icterina"	<i>Labiatae</i>	Vaso	Albenga SV
Dicembre 2010	<i>Anemone coronaria</i>	<i>Rranunculaceae</i>	Piena terra	Sanremo IM
Gennaio 2011	<i>Anethum graveolens</i>	<i>Apiaceae</i>	Piena terra	Albenga SV
Gennaio 2011	<i>Fatsia japonica</i>	<i>Araliaceae</i>	Piena terra	Sanremo IM
Febbraio 2011	<i>Papaver nudicaule</i>	<i>Papaveraceae</i>	Piena terra	Sanremo IM
Marzo 2011	<i>Petroselinum sativum</i>	<i>Apiaceae</i>	Piena terra	Albenga SV

MATERIALI E METODI

I campioni, appartenenti alle varie specie indicate in tabella 1, che manifestavano i sintomi descritti sono stati sottoposti ad analisi di laboratorio per individuare l'eventuale presenza di agenti patogeni fungini, batterici e virali.

Le analisi batteriologiche sono state effettuate secondo le seguenti modalità: numerose porzioni di tessuto fogliare sintomatico, dopo essere state disinfettate in una soluzione di NaOCl allo 0,5% per un minuto e quindi ripetutamente sciacquate in acqua deionizzata sterile, sono state poste a macerare in soluzione fisiologica sterile per 20'. Dieci µl degli estratti vegetali sono stati quindi inseminati su agar nutritivo a base di saccarosio (NSA) e incubati a 24 ± 1 °C per 48 h. Da ogni piastra inseminata, tre colonie singole sono state selezionate, purificate e sottoposte al saggio LOPAT (Lelliot *et al.*, 1966).

I profili nutrizionali dei ceppi isolati sono stati quindi analizzati mediante sistema computerizzato Biolog GEN III Microplates e Microlog System (Data Base 5.1.1; Biolog, Hayward, CA).

Successivamente, ogni ceppo isolato è stato saggiato mediante RFLP-PCR: i primer pA e pH' hanno permesso l'amplificazione del gene 16S rDNA e l'amplicone ottenuto è stato digerito mediante l'enzima di restrizione *HinfI* (Gonzales *et al.*, 2003); i ceppi OMP-BO 395.1/91, OMP-BO 401.1/91 e IRF-504/07/basilico di *P. viridiflava* sono stati utilizzati come controlli positivi.

Il saggio di patogenicità è stato condotto aspergendo sospensioni batteriche (ca. 10^6 ufc/ml), contenenti ciascun ceppo purificato, su foglie sane del relativo ospite omologo; le foglie inoculate sono state mantenute in cella climatica a 25-28 °C e 80-100% di umidità relativa per 36-48 ore.

I ceppi identificati sono stati inoltre sottoposti ai saggi BOX- e REP-PCR (Versalovic *et al.*, 1994).

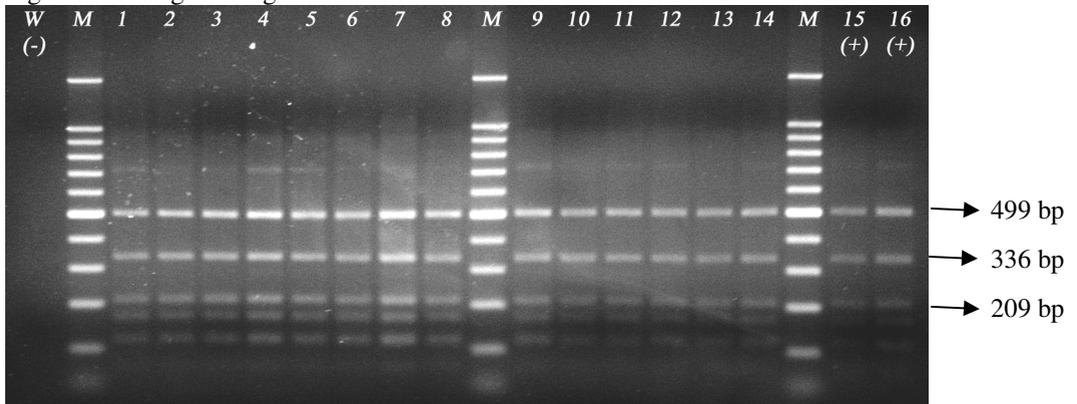
RISULTATI

I ceppi batterici isolati da ciascun campione sono risultati di colore giallo chiaro, a margini irregolari e sono stati in grado di produrre pigmenti fluorescenti quando purificati su substrato agarizzato King B; sottoposti al saggio LOPAT sono risultati non levainiformi, ossidasi-negativi, arginina deidrolasi-negativi, hanno mostrato attività pectolitica su tasselli di patata ed hanno indotto la reazione di ipersensibilità dopo 24 ore dall'inoculazione sperimentale in pannelli internervali di foglie di tabacco. Sulla base di tali caratteristiche gli isolati in oggetto sono stati attribuiti al genere *Pseudomonas*.

Attraverso l'analisi con sistema Biolog, tutti gli isolati hanno mostrato elevata similarità (valori compresi tra 0,862 e 0,961) con *P. viridiflava*.

I risultati ottenuti dall'analisi RFLP-PCR sono riportati in figura 1, in cui risulta evidente come, a livello molecolare, tutti i ceppi isolati abbiano mostrato il medesimo profilo di restrizione dei controlli positivi.

Figura 1. Immagine del gel in cui si osservano i risultati ottenuti dall'analisi RFLP-PCR.



W= acqua (controllo negativo); M= marker 100 bp (Promega); 1, 15, 16= *P. viridiflava* (controlli positivi, rispettivamente IRF-504/07/basilico, OMP-BO 395.1/91, OMP-BO 401.1/91). Isolati: 2= dimorfotecca; 3= rosmarino (2008); 4= salvia; 5= lavanda stoechas; 6= margherita "Stella 2000" (2010); 7= salvia "Icterina"; 8= rosmarino (2010); 9= anemone; 10= aneto; 11= aralia; 12= papavero; 13= prezzemolo; 14= margherita "Stella 2000" (2011).

I test di patogenicità eseguiti su ospite omologo sono risultati positivi: le foglie inoculate con le sospensioni batteriche contenenti i ceppi identificati hanno riprodotto i sintomi attesi dopo 36-48 ore di incubazione in cella climatica alla temperatura di 25°C (\pm 1°C) ed in condizioni elevata umidità relativa (>80%). Le foglie irrorate con sola acqua deionizzata sterile (controllo negativo) non hanno mostrato alcun sintomo. I ceppi reisolati dalle maculature sono stati nuovamente identificati come *P. viridiflava*.

Ulteriori indagini diagnostiche condotte sui campioni in studio hanno escluso la presenza di agenti patogeni fungini o virali: in particolare, nessuno dei rari miceti isolati ed identificati come appartenenti al genere *Mucor* spp., *Stemphylium* spp., ha riprodotto i sintomi attesi dopo l'inoculazione sperimentale.

Infine, i profili molecolari ottenuti mediante BOX- e REP-PCR hanno evidenziato un'elevata variabilità genetica dei ceppi di *P. viridiflava* isolati (dati non riportati).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

P. viridiflava è diffuso in molte aree del mondo (www.cabi.org) e può colpire un gran numero di specie (Bradbury, 1986). Del resto anche in Italia *P. viridiflava* è stato oggetto di molte segnalazioni, e tra le più recenti ricordiamo quella sulla calendula (Moretti *et al.*, 2011). Nel ponente ligure, in particolare su colture ornamentali, a partire dal 2001 (Rapetti *et al.*, 2002) i rinvenimenti sono progressivamente aumentati, fino ad arrivare al 2010 e 2011, anni in cui sono apparsi numerosi casi, alcuni dei quali descritti in questo lavoro. L'improvvisa comparsa di questo patogeno su molte specie, in varie situazioni culturali ed in un così breve arco di tempo pare curioso. Sicuramente la recente adozione di nuove tecniche diagnostiche, basate su sistemi computerizzati (Biolog) e su tecniche molecolari, ha facilitato l'identificazione del patogeno. Si ritiene però che tali fenomeni epidemici siano stati favoriti anche da altri fattori, tra cui quelli ambientali: infatti quasi tutti i casi descritti sono stati osservati in inverno/inizio primavera, stagioni che negli ultimi anni, nel ponente ligure, sono spesso state caratterizzate da andamenti insoliti, quali l'avvicinarsi di lunghi periodi piovosi o nuvolosi - con conseguente riduzione della radiazione solare al suolo e permanere di tassi di umidità ambientale molto alti - e il raggiungimento, talvolta anche per più giorni consecutivi, di temperature molto più basse della media, con conseguenti fenomeni di gelate. Tali condizioni hanno sicuramente influito negativamente su tutte le coltivazioni, soprattutto su quelle di pien'aria, mentre potrebbero essere risultate favorevoli alle infezioni batteriche e all'avvio delle malattie. Considerazioni simili concordano con quelle fatte anche da altri autori (Goumans e Chatzaki, 1997) che hanno definito *P. viridiflava* come un batterio generalmente "sub-parassita" ma che, qualora le condizioni ambientali siano particolarmente favorevoli al suo sviluppo, può causare danni comportandosi da agente primario.

Da ricerche bibliografiche risulta che, su alcune delle specie oggetto di questo lavoro, maculature fogliari causate da *P. viridiflava* sono state osservate anche in altri paesi: su aneto la prima segnalazione risale al 1977 (Koehn, 1977), mentre papavero e prezzemolo sono comprese nel lungo elenco di piante ospiti di *P. viridiflava* pubblicato sul sito www.plantwise.org della CABI.

In ogni caso, sulla base delle informazioni in nostro possesso, si può affermare che questa sia la prima segnalazione, almeno in Liguria, di sintomi di maculatura batterica causati da *P. viridiflava* in coltivazioni di specie aromatiche/orticole quali *Anethum graveolens*, *Petroselinum sativum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *S. officinalis* "Icterina", nonché di specie ornamentali quali *Anemone coronaria*, *Fatsia japonica*, *Argyranthemum frutescens*, *Osteospermum* spp. e *Papaver nudicaule*.

Ringraziamenti:

Gli autori desiderano ringraziare il dr. Giorgio Bozzano, il dr. Mario Mattone e la dr.ssa Anna Maria Crotti, del Servizio Tecnico della Cooperativa "l'Ortofrutticola" di Albenga (SV), per aver fornito gran parte del materiale sintomatico.

Lavoro svolto nell'ambito del Programma Alcotra 2007-2013 "Obiettivo Cooperazione territoriale europea Italia-Francia (Alpi) 2007-2013", Progetto FIORIBIO.

LAVORI CITATI

- Bradbury JF, 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria - CAB International, Farnham Royal.
- Distribution Maps of Plant Diseases, 2004. April (Edition 1), Map 917- www.cabi.org
- Gonzalez A. J., Rodicio R. M., Mendoza M. C., 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish Region. *Applied and Environmental Microbiology*, 69/5, 2936-2941.
- Goumans D. E. e Chatzaki A. K., 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 181-188.
- Koehn S., 1977. Dill *Anethum graveolens* a new host of *Pseudomonas viridiflava*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* (Stuttgart) 29, 91-2.
- Lelliot R. A., Billing E., Hayward A. C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 470-489.
- Martini P., Odasso M., Rapetti S., Repetto L., De Rino E., Gullone C., 2009. Alterazioni di origine batterica su ranuncolo, salvia e rosmarino. *Protezione delle Colture*, 2, 109-110.
- Minuto A., Minuto G., Martini P., Odasso M., Biondi E., Mucini S., Scortichini S., 2008. First report of *Pseudomonas viridiflava* in basil seedlings and plants in soilless crop in Italy. *Australasian Plant Disease Notes*, 3, 1: 165.
- Moretti C., Fakhr R., Buonauro R., 2011. *Calendula officinalis*: a new natural host of *Pseudomonas viridiflava* in Italy. *Plant Disease*, in corso di pubblicazione.
- Rapetti S., Martini P., Gullone C., Repetto L., Tamietti G., 2002. Una nuova malattia del ranuncolo causata da *Pseudomonas* spp. *Informatore Fitopatologico*, 6, 53-55.
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijnand F.J., Lupski J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction - *Meth. Mol. Cell. Biol.*, 5, 25-40.
- Zoina A., Pupolo G., Pasini C., D'Aquila F., Cozzolino L., Raio A., 2005. *Pseudomonas viridiflava* agente di una grave alterazione su ranuncolo da fiore reciso. *Colture Protette*, 9, 107- 111.