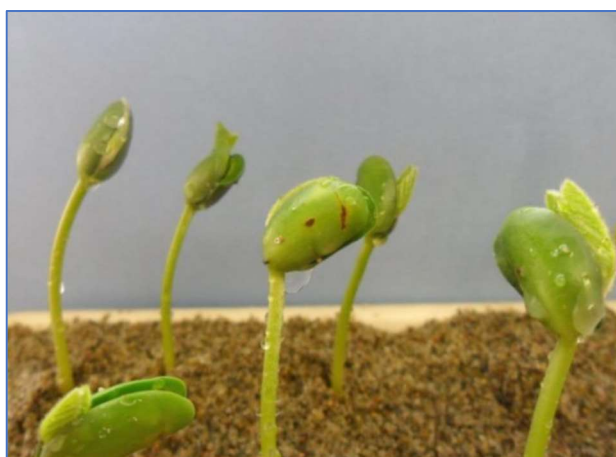


# MACULATURA BATTERICA DELLA SOIA

(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)

## Generalità e procedura di analisi delle sementi

Alessandro Romano, Laura Fiorini, Loretta Cavion, Cristian Gretter, Giuseppe Anastasi, Romana Bravi



## **Introduzione**

La maculatura batterica della soia (*Glycine max* L.) è una fitopatia segnalata in Italia sin dal 1981. Si tratta di una patologia comune nelle zone e nelle annate particolarmente fresche e umide, mentre trova condizioni sfavorevoli in aree con clima caldo e asciutto. La fitopatia si manifesta normalmente a inizio stagione, ma condizioni meteorologiche favorevoli, come eventi temporaleschi associati a forte vento, possono estendere il rischio di infezione durante l'intera stagione vegetativa.

Nonostante la sua diffusione nelle aree di coltivazione della soia, non si segnalano generalmente danni ingenti alle produzioni. Tuttavia, l'impatto può essere rilevante nel caso di colture destinate alla produzione di semente.

## **Agente causale**

La malattia è causata dal batterio *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (codice EPPO: *PSDMGL*), che può anche colpire altre specie come il fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris* L.) e quello di Lima (*Phaseolus lunatus* L.).

## **Epidemiologia**

La maculatura batterica è una malattia tipicamente trasmissibile per seme, la cui infezione primaria, che si manifesta normalmente sui cotiledoni, costituisce la principale fonte di inoculo. Da qui i batteri, veicolati da acqua e vento, si diffondono dando origine alle infezioni secondarie.

Una volta a contatto con la pianta, la penetrazione del patogeno avviene passivamente, ossia attraverso lesioni preesistenti e aperture stomatiche. Una condizione predisponente l'avvio dell'infezione è la presenza di umidità sulle foglie. All'interno delle foglie il patogeno si moltiplica negli spazi intercellulari del mesofillo dai quali si diffonde colonizzando i tessuti. La temperatura ottimale per lo sviluppo della malattia è 21-27°C.

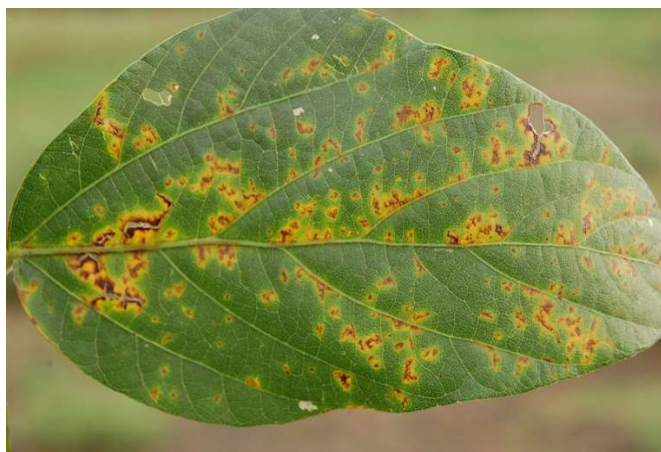
In condizioni climatiche fredde e asciutte, il patogeno può sopravvivere nei residui della vegetazione infetta rimasta nel terreno. Il vento o la pioggia possono trasportare l'inoculo dai residui sino alle foglie delle giovani piante.

Tuttavia, più importante dal punto di vista epidemiologico, risulta la sopravvivenza del patogeno nel seme (circa 2 anni) che può avvenire sia internamente che superficialmente. Il seme può anche essere infettato durante le operazioni di raccolta e durante la conservazione.

## **Sintomi**

*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* può infettare tutte le parti epigee della pianta, ma l'infezione è più evidente sulle foglie presenti nella parte mediana e superiore, principalmente su quelle più giovani. Dopo circa 5-7 giorni dall'inizio dell'infezione, i sintomi consistono in piccole macchie dai profili angolari e idropiche per presenza di essudato batterico, presenti sulla pagina inferiore

delle foglie. Spesso si assiste ad una confluenza tra macchie vicine che tendono gradualmente ad imbrunire virando dal giallo al marrone-rossastro e a disseccarsi nella parte centrale lasciando un alone clorotico (fig. 1). Il tessuto necrotizzato può cadere conferendo alle foglie che permangono sulla pianta un aspetto lacero (fig. 2). A seguito di forti infezioni si può avere una caduta delle foglie più basse.

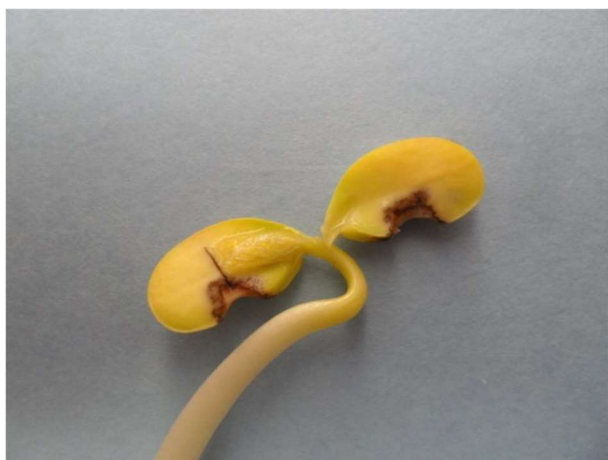


**Figura 1** - Sintomi su foglia nella fase avanzata della fitopatia (Fonte: Foliar diseases of Soybean. Oklahoma State University Extension)



**Figura 2** - Foglia lacera in seguito a distaccamento di tessuto necrotizzato (Fonte: D. Mueller, Crop Protection Network)

Nel corso della moltiplicazione all'interno dell'ospite, il batterio produce una tossina chiamata coronatina che, trasportata attraverso il floema, interferisce con la sintesi della clorofilla e quindi con la fotosintesi, con conseguente clorosi e arresto della crescita delle piante. Tuttavia, le piante infette tendono a riprendere successivamente la produzione di clorofilla e la normale attività fotosintetica. I sintomi sui cotiledoni appaiono sotto forma di maculature, soprattutto ai margini, che disseccandosi imbruniscono e necrotizzano (figg. 3-4). L'infezione può anche interessare steli e pezioli con presenza di lesioni nerastre.



**Figura 3** - Lesioni sui margini dei cotiledoni



**Figura 4** - Lesioni sui cotiledoni in fase avanzata

Normalmente i semi non presentano sintomi evidenti ma, in presenza di lesioni sui baccelli, i semi in via di sviluppo al loro interno possono raggrinzire, decolorarsi, presentare lesioni a diversa profondità, con aggravamento durante la conservazione e risultare successivamente non germinabili.

## **Difesa**

Allo stato attuale, la fitopatia può essere prevalentemente contenuta mediante mezzi preventivi come l'impiego di varietà resistenti e la rotazione con colture non suscettibili. Può risultare efficace anche l'interramento dei residui vegetali in modo da ridurre l'inoculo al momento della semina. È anche possibile l'impiego di comuni fungicidi a base di rame se applicati all'inizio del ciclo del patogeno.

## **Aspetti normativi**

La Direttiva 2002/57/CE del Consiglio del 13/06/2002, che ha sostituito la Direttiva 69/208/CEE e successive modificazioni, regola la produzione e la commercializzazione delle sementi di piante oleaginose e da fibra destinate alla produzione agricola. Le direttive comunitarie sono state recepite in Italia con il DPR 08/10/1973 n. 1065, e successive modifiche e integrazioni, in attuazione della legge 25/11/1971 n. 1096. Tra le condizioni che devono soddisfare le sementi di soia ai fini della certificazione vi sono quelle relative allo stato fitosanitario delle sementi, tra le quali l'assenza dell'agente della maculatura batterica, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (allegato II, parte I, punto 4, lettera C della direttiva):

*"a) Per Pseudomonas syringae pv. glycinea, il numero massimo di sottocampioni, nell'ambito di un campione di almeno 5000 sementi per lotto suddiviso in cinque sottocampioni, che risultano contaminati dal suddetto organismo non deve superare 4. Qualora vengano identificate colonie sospette in tutti i cinque sottocampioni, per confermare il rispetto delle norme o condizioni di cui sopra possono essere eseguiti appropriati test biochimici sulle colonie sospette isolate su un terreno preferenziale prelevato da ogni sottocampione."*

Nell'anno 2020 sono state attuate, a livello europeo, alcune modifiche sostanziali alle norme preesistenti. La direttiva di esecuzione (UE) 2020/177 della Commissione dell'11 febbraio 2020 ha apportato delle modifiche ad una serie di direttive che regolamentavano la commercializzazione di sementi tra le quali la direttiva 2002/57/CE. Queste modifiche fanno parte di un più ampio quadro normativo, rappresentato dal regolamento (UE) 2016/2031 sulle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante e dal relativo regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072 della Commissione del 28 novembre 2019. Le condizioni cui devono soddisfare le sementi di soia ai fini della commercializzazione, previste dalla nuova direttiva 2002/57/CE, non includono il batterio *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, agente causale della maculatura batterica, tra gli organismi nocivi regolamentati non da quarantena ("ORNQ").

## Analisi di laboratorio

Il metodo di analisi utilizzato per la ricerca del patogeno è un adattamento del “Metodo francese concordato USA/Canada” (Chauveau J.F. 1988, comunicazione personale) redatto nel 1989 e ufficialmente ammesso dalle Autorità europee.

### **Preparazione dei campioni di analisi**

La procedura per la ricerca del batterio *PSDMGL* in sementi di soia ha inizio dal campione medio finale di prelevamento giunto in laboratorio. Il suddetto campione, al fine di garantire un numero congruo di repliche e quindi la validità delle prove, deve essere costituito da almeno 1,5 kg di semente **non trattata**; qualora il campione giunga in diversi sacchetti, questi devono essere svuotati in un unico sacchetto in polietilene e adeguatamente mescolati per rendere il materiale omogeneo.

Da ogni singolo campione si preparano 5 sottocampioni, ciascuno del peso di 200 grammi, corrispondente a un numero di semi pari a circa 1000. I semi di ogni sottocampione vengono posti all'interno di sacchetti in polietilene contrassegnati con il numero con cui il campione è stato registrato all'arrivo in laboratorio e con una lettera progressiva corrispondente al sottocampione stesso (fig. 5)

### **Estrazione della carica batterica dai campioni di seme**

#### ***Principio del metodo***

Lo scopo di questo passaggio è quello di ottenere una sospensione batterica a partire dall'eventuale inoculo presente sulla superficie dei semi. Allo scopo si utilizza il tampone fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline - PBS), una soluzione comunemente impiegata nel campo della diagnostica e della ricerca in biologia. Le condizioni di pH costante, assicurate dal tampone fosfato mono e di-basico e quelle di isotonia, create dalla presenza di una concentrazione ottimale di NaCl, manterranno vitali le cellule batteriche per le successive analisi.

#### ***Procedura***

I sacchetti sterili contenenti i semi precedentemente preparati vengono riempiti con 600 mL di PBS sterilizzato (v. allegato 2) corrispondenti a circa 3 mL di tampone per grammo di seme (fig. 6). I campioni verranno così conservati ad una temperatura di 4°C per 24 ore al buio.





**Figura 5** - Sacchetti in polietilene corrispondenti a due campioni di analisi



**Figura 6** - Sacchetti in polietilene riempiti con soluzione PBS

## **Diluizioni seriali e semina**

### ***Principio del metodo***

Il metodo delle diluizioni seriali, in microbiologia, permette una sistematica riduzione della concentrazione di un microrganismo presente in un volume noto di soluzione attraverso successive risospensioni in specifici e uguali volumi di diluente.

Lo scopo è quello di ottenere colture batteriche in numero variabile a seconda del fattore di diluizione cui sono state sottoposte. Questo permetterà il calcolo del numero di colonie di partenza e renderà più agevole la lettura delle piastre e l'eventuale successivo isolamento in purezza.

### ***Procedura***

Da ogni sacchetto/sottocampione si prelevano 5 mL di soluzione salina e si trasferiscono in una provetta sterile da 10 mL, ottenendo così il campione "tal quale" (Tq). Dopo opportuna agitazione della provetta si procede con le diluizioni.

Dai 5 mL Tq si prelevano, tramite micropipetta, 0,5 mL e si trasferiscono in una provetta contenente 4,5 mL di acqua sterile, ottenendo una diluizione 1:10. Dalla diluizione 1:10 si prelevano 0,5 mL e si pongono in una provetta contenente 4,5 mL di acqua sterile ottenendo una diluizione 1:100. Infine, dalla diluizione 1:100 si effettua l'operazione analoga alle ottenendo una diluizione 1:1000.

Subito dopo le diluizioni, partendo dalla soluzione più diluita (1:1000) sino al liquido di lavaggio (Tq), si prelevano 100 µL da ciascuna provetta e si seminano su piastre Petri contenenti il substrato selettivo di King B (KB) (v. allegato 3). Con un'ansa monouso ad "L", si distribuisce uniformemente la sospensione su tutta la superficie della piastra. Per ogni diluizione e per l'estratto Tq si effettuano almeno 2 ripetizioni. Trascorso un tempo sufficiente a fare assorbire il liquido dal terreno di coltura, le piastre

vengono messe ad incubare ad una temperatura di 27°C per 72 ore al buio e capovolte, in modo da impedire alla condensa di accumularsi sopra l'agar interferendo con lo sviluppo dei batteri.

### **Controllo positivo e della sterilità**

In aggiunta alla preparazione delle piastre con la sospensione estratta dai singoli sottocampioni da analizzare, si procede con la preparazione del campione di riferimento che servirà per il controllo positivo.

Analogamente a quanto fatto per i sottocampioni, si prepara una sospensione utilizzando un ceppo conosciuto di *PSDMGL* in soluzione salina sterile o seguendo le istruzioni del fornitore.

Si procede con le diluizioni, al fine di ottenere soluzioni contenenti  $10^2 - 10^4$  ufc/mL (ufc: unità formanti colonie). Si pipettano 100 µL delle diverse concentrazioni sulle piastre contenenti KB distribuendole uniformemente, e si incubano le piastre assieme a quelle dei sottocampioni. Per il controllo della sterilità si utilizzeranno piastre con la soluzione di estrazione pura ("vuoto") a diverse diluizioni.

### **Esame delle piastre/fluorescenza su substrato B di King**

#### ***Principio del metodo***

Diverse specie batteriche appartenenti al genere *Pseudomonas* sono in grado di produrre un pigmento fluorescente solubile in acqua, di colore variabile dal giallo-verde al giallo-bruno, che si rende evidente sotto l'effetto dei raggi UV (365 nm) in colonie sviluppatesi su apposito terreno di coltura. Questa caratteristica è utilizzata al fine di determinare la presenza o meno del batterio nei campioni analizzati.

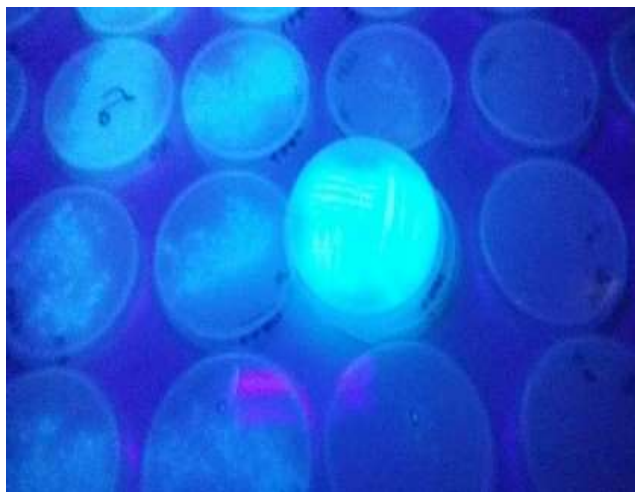
#### ***Procedura***

Previa verifica di eventuale presenza di colonie batteriche nel "vuoto", indice di inquinamento del terreno e/o della soluzione salina, si procede con l'osservazione delle piastre in ambiente oscuro e sotto luce UV emessa da una lampada di Wood (fig. 7). A supporto, si adopera il campione di riferimento preparato in precedenza, ovvero un set di piastre con presenza nota di colonie di *PSDMGL* a diversa concentrazione, al fine di compararne l'aspetto con quello delle eventuali colonie presenti nei sottocampioni.

Dopo 72 ore di incubazione, le colonie di *PSDMGL* eventualmente presenti su KB (fig. 8) risulteranno avere le seguenti caratteristiche:

- fluorescenza bluastra visibile sotto lampada UV
- piccole dimensioni e contorno frastagliato e irregolare
- colore bianco - crema, opaco ed omogeneo

In caso di assenza, con assoluta certezza, di colonie sospette, **l'analisi termina a questo punto** e il campione viene dichiarato idoneo relativamente alla presenza/assenza di *PSDMGL*. Se invece si sospetta la presenza di colonie di *PSDMGL* **si procede con i successivi test biochimici**.



**Figura 7** - Piastre in esame sotto raggi UV (365 nm)



**Figura 8** - Colonie batteriche su substrato KB

## **Purificazione su terreno KB**

### ***Principio del metodo***

Al fine di isolare una determinata specie batterica, è necessario trapiantare in coltura pura su terreni specifici le colonie sospette presenti nelle piastre primarie. Questo consentirà un'identificazione più affidabile della specie ricercata e lo svolgimento dei test biochimici con il minor inquinamento possibile.

### ***Procedura***

In ambiente sterile si preleva con una ansa da 1 µL parte della colonia sospetta, partendo dal bordo, e si striscia su una nuova piastra con KB. Al fine di prevenire contaminazioni incrociate si utilizza una piastra per ogni singola colonia. Il numero delle purificazioni dipende dal numero di colonie sospette ritrovate nella piastra di partenza. Se presenti, almeno 5-6 colonie dovrebbero essere purificate per ogni sottocampione.

La stessa operazione viene eseguita sul campione di riferimento trasferendo le colonie note di *PSDMGL* su una nuova piastra con KB. Tutte le piastre così inoculate vengono poste ad incubare a una temperatura di 27°C per 72 ore al buio (fig. 9).



## **Purificazione su Agar Nutritivo al Saccarosio (ANS)**

### ***Principio del metodo***

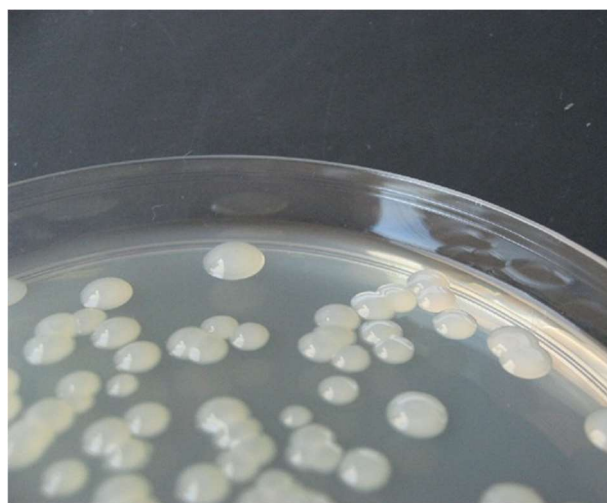
Diverse specie batteriche fluorescenti appartenenti al genere *Pseudomonas* posseggono un enzima, la levano saccarasi, in grado di scindere il saccarosio nei suoi due zuccheri semplici: glucosio e fruttosio. Mentre il primo viene utilizzato come fonte di carbonio, il fruttosio sarà polimerizzato all'esterno della cellula formando una capsula di levano, ovvero un polisaccaride extracellulare polimero del  $\beta$ -D-fruttosio. Questa caratteristica si manifesta con la comparsa di giovani colonie "levaniformi" che appaiono lucenti, dall'aspetto mucoso e dalla caratteristica forma convessa.

### ***Procedura***

Le colonie sospette, purificate precedentemente su KB, vengono seminate su terreno ANS (v. allegato 3) e poste ad incubare in camera di crescita a una temperatura di 27°C al buio. Dopo 48 ore, viene effettuata la lettura, e il batterio, se presente, identificato per la presenza di colonie dalla caratteristica forma a cupola (levan positivo) (fig. 10).



**Figura 9** - Colonie batteriche di PSDMGL purificate su substrato KB



**Figura 10** - Colonie batteriche levaniformi su substrato ANS  
(Fonte: E. Stefani, Dipartimento di Scienze della Vita - UNIMORE)

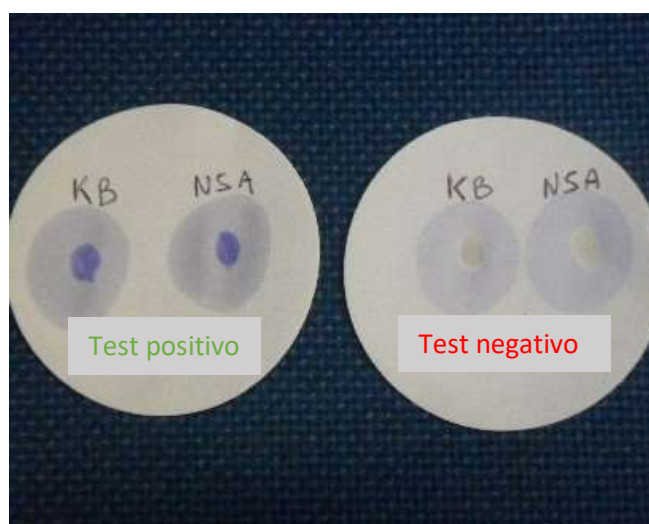
## **Test dell'ossidasi**

### ***Principio del metodo***

La respirazione dei batteri coinvolge una serie di componenti chimici legati alle membrane cellulari che, nel complesso, costituiscono la catena di trasporto degli elettroni. In alcune specie batteriche, chiamate ossidasi positive, la fase finale coinvolge l'enzima citocromo ossidasi che catalizza l'ossidazione del citocromo C a favore della riduzione dell'ossigeno con formazione di acqua. Altre specie, tra le quali *Pseudomonas syringae*, non posseggono l'enzima e sono quindi dette ossidasi negative. In presenza di un organismo che possiede il citocromo ossidasi, reagenti artificiali incolori possono fungere da donatori di elettroni per il citocromo C, ossidandosi e cambiando di conseguenza il proprio colore. Nel caso dell'analisi per il rilevamento di *PSDMGL*, il reagente artificiale è solitamente rappresentato dalla N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiammina (TMFD) che in presenza del citocromo C si trasforma nel suo prodotto ossidato, indofenolo blu, di colore blu scuro o porpora.

### ***Procedura***

Con un'ansa da 1 µL si preleva parte di una colonia sospetta fresca (non più di 48 ore) purificata su terreno KB e si striscia su un filtro di carta (Wathman n. 1) precedentemente impregnato con una soluzione acquosa all'1% (p/v) di TMFD (v. allegato 2). La comparsa entro 10" di una macchia blu scuro in corrispondenza della strisciata dell'ansa indica positività del test e quindi **assenza** del batterio *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (fig. 11).



**Figura 11** – Risultato del test dell'ossidasi su colonie batteriche di *PSDMGL* prelevate da substrati KB e ANS e purificate su substrato KB

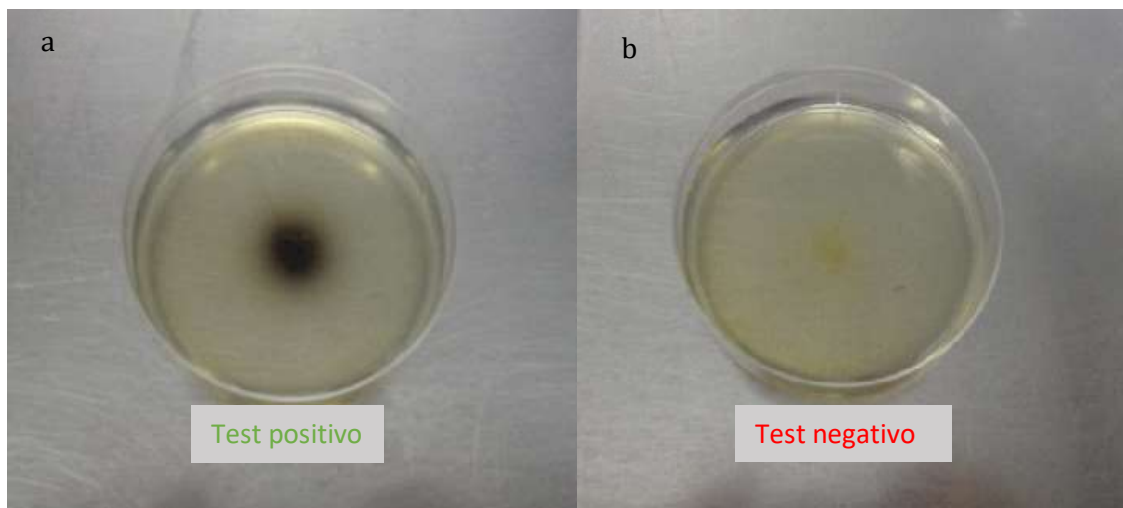
## **Test dell'idrolisi dell'esculina**

### ***Principio del metodo***

Il terreno di coltura addizionato con esculina, un glicoside di origine vegetale, è un mezzo differenziale che consente di accertare la presenza di particolari specie batteriche. I batteri che posseggono l'enzima esculinasi, sono in grado di idrolizzare l'esculina in glucosio ed esculetina. Il primo composto viene utilizzato dal batterio come fonte di carbonio, mentre l'esculetina reagirà con il citrato ferrico, un indicatore di colore aggiunto al terreno di coltura, con formazione di un precipitato di color marrone scuro o nero in corrispondenza del punto in cui è stato depositato l'isolato batterico. In presenza di batteri privi dell'enzima, tra cui *PSDMGL*, non si renderà evidente alcuna areola scura all'interno della piastra.

### ***Procedura***

Si preleva, con un'ansa da 1 µL, parte di una colonia sospetta fresca purificata su terreno KB e la si posiziona sulla parte centrale di una piastra contenente il terreno con esculina (v. allegato 3). Si pone ad incubare per 24 h ad una temperatura di 27° C al buio. Dopo incubazione, in caso di reazione positiva si osserverà un alone scuro attorno al batterio che accerterà l'assenza di *PSDMGL* (fig. 12-a), altrimenti si osserverà una colorazione giallastra (fig. 12-b).



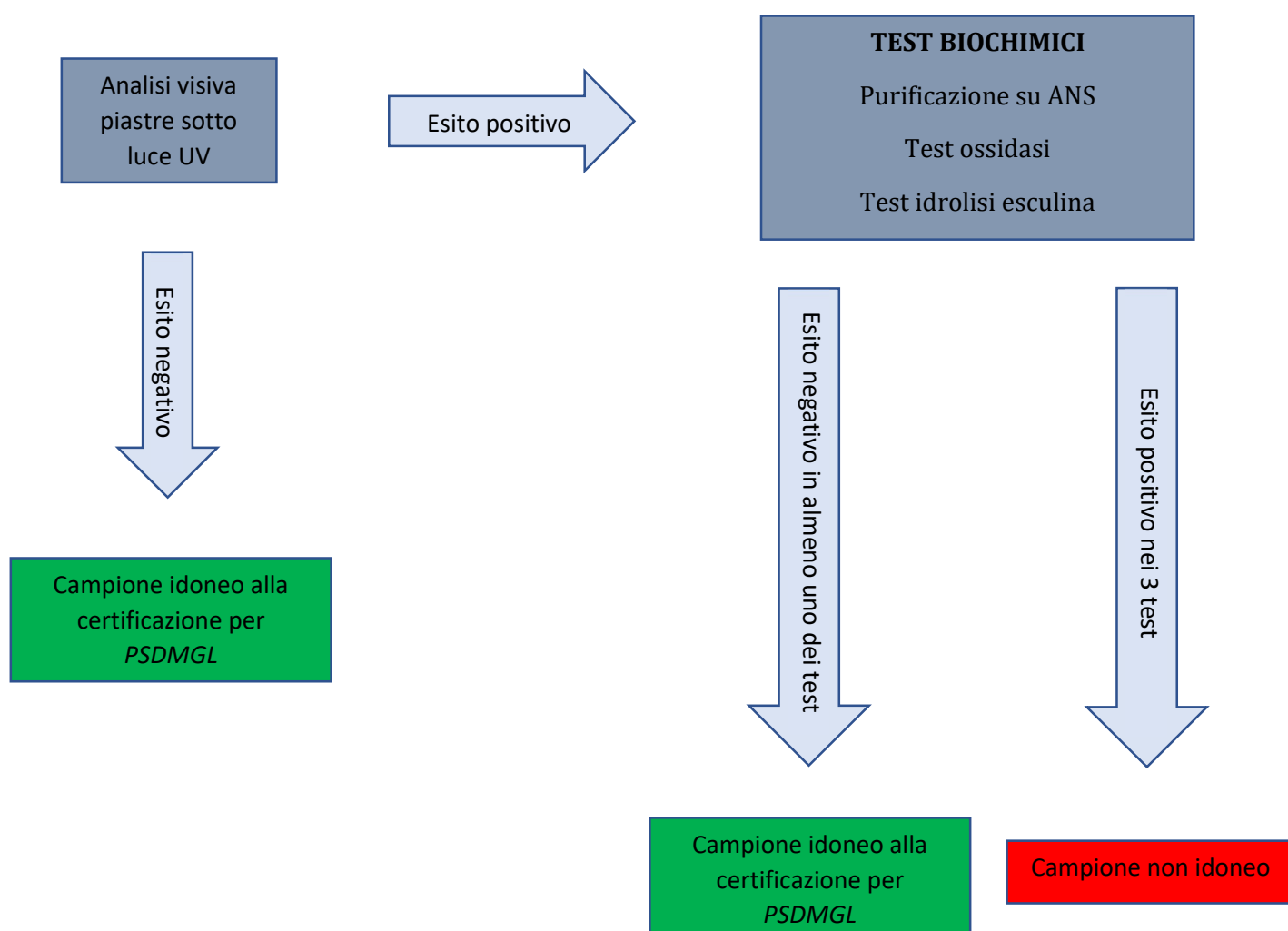
**Figura 12** - Esito del test dell'esculina. La presenza di precipitato di colore scuro indica assenza di *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

## Espressione dei risultati e considerazioni finali

Alla luce delle attuali disposizioni legislative, il campione viene ritenuto **positivo**, e quindi non idoneo alla certificazione, quando **in ognuno** dei cinque sottocampioni, a seguito dei test biochimici, è stata accertata la presenza di almeno una coltura batterica che per le caratteristiche saggiate può essere identificata come appartenente a *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

Il campione viene ritenuto **negativo** quando **almeno uno** dei cinque sottocampioni esaminati sia risultato negativo per la presenza del batterio. Quindi, anche in presenza di quattro sottocampioni positivi, il campione sarà ritenuto idoneo alla certificazione (fig. 13).

I risultati di analisi vengono riportati su apposita scheda indicando per ogni test effettuato la positività o negatività dello stesso, nonché il risultato finale dell'intera analisi.



**Figura 13** – Schema di certificazione per ciascuno dei 5 sottocampioni analizzati. Se uno solo di essi risulta negativo, l'intero campione è considerato idoneo

## **Allegato 1**

### **Principali strumenti e materiale di laboratorio occorrenti**

- Ceppo di riferimento di *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*
- Beute e becher di volume 1000-3000 mL e bottiglie Schott Duran™ da 500-1000 mL
- Sacchetti sterili da 1000 mL
- Provette di vetro sterilizzabili da 10-15 mL
- Micropipette a volume variabile con relativi puntali sterili
- Filtri per sterilizzazione a freddo da 0,45 µm usa e getta
- Pipette sterili monouso da 5 cc
- Anse monouso sterili da 1 e 5 µl
- Bacchette ad "L" da batteriologia monouso.
- Piastre Petri monouso da 94 e 60 mm di diametro
- Bilancia analitica con sensibilità di 0,0001 g
- Autoclave
- Demineralizzatore/sterilizzatore acqua
- Frigorifero a 4°C
- Armadio termostatico a 25±2°C
- Cappa a flusso laminare per preparazione substrati
- Cappa aspirante BioHazard per isolamento colonie batteriche
- Sacchetti autoclavabili BioHazard per smaltimento piastre

### **Norme di laboratorio**

Al fine di evitare contaminazioni incrociate tra i campioni di seme, nonché inquinamento da agenti esterni, sarà di fondamentale importanza, nel corso di tutte le operazioni, seguire strettamente le norme igieniche di un laboratorio di microbiologia. In particolare, bisognerà provvedere alla disinfezione di tutte le superfici di lavoro tramite etanolo al 70% sia prima che dopo la manipolazione del campione di seme e utilizzare, per ogni sottocampione, contenitori e materiali di consumo nuovi e/o sterilizzati con calore secco o in autoclave. Sarà inoltre necessario lavorare sotto cappa sterile e utilizzare guanti da parte dell'operatore. Al termine delle analisi, le piastre e altro materiale consumabile andranno smaltite in appositi raccoglitori previa inertizzazione in autoclave a 105 °C per 10 minuti.



**Allegato 2****Preparazione soluzioni****Soluzione salina sterile (PBS)**

<b>Dosi per soluzione stock (10x)</b>			
<b>N. 1 becher (K)</b>		<b>N. 2 becher (K<sub>2</sub>)</b>	
NaCl	19,4 g	NaCl	19,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,8 g
H <sub>2</sub> O bidistillata	1 L	H <sub>2</sub> O bidistillata	1 L

- Predisporre 3 becher da almeno 2 L di volume ciascuno e indicarli con le sigle K (1 becher) e K<sub>2</sub> (2 becher).
- Aggiungere i reagenti nelle dosi indicate in tabella assieme a 1 litro di acqua bidistillata in ciascuno dei 3 becher e mixare le soluzioni con l'aiuto di una bacchetta o di un agitatore magnetico fino al completo discioglimento dei soluti.
- Travasare in un becher di volume pari ad almeno 3 L, in successione, la soluzione K e le soluzioni K<sub>2</sub> precedentemente preparate.
- Dopo avere mescolato accuratamente, travasare i tre litri della soluzione finale in bottiglie Schott Duran™.
- Sterilizzare in autoclave a 121°C, 1 atm, per 20 minuti.
- Lasciare raffreddare e conservare a 4-5°C.

La soluzione preparata rappresenta lo stock a concentrazione 10x e sarà diluita prima dell'uso in modo da avere una concentrazione finale di 0,01 M di tampone fosfato salino e 0,1 M di NaCl.

**Soluzione antibiotica di cefalexina**

Sciogliere 0,64 g di cefalexina idrata in 80 mL di acqua distillata. Sterilizzare a freddo con filtro da 0,45 µm, aliquotare in provette da 10 ml e mantenere a 4-5°C.

La cefalexina sarà aggiunta al terreno di coltura KB.

**Soluzione di N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiammina**

Sciogliere 1 mg di N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiammina (TMFD) in 10 mL di acqua bidistillata sterile e conservare la soluzione a 4-5°C.

**Allegato 3****Preparazione terreni di coltura****Substrato B di King**

<b>Dosi per 800 mL di terreno</b>	
NaCl	1,23 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,23 g
Bacto Agar	14,4 g
Proteose peptone n. 3 (Difco™)	16,0 g
Glicerina	6,4 mL
H <sub>2</sub> O bidistillata	800 mL

- Aggiungere i diversi componenti con la quantità prescritta di acqua in bottiglie Schott Duran™ da 1000 ml.
- Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C, 1 atm, per 20 minuti.
- Lasciare raffreddare il terreno a una temperatura di circa 50°C, aggiungere 4 mL di cefalexina (1 mL ogni 200 mL di terreno KB) e quindi piastrare sotto cappa sterile a flusso laminare avendo cura di non inquinare il terreno. Usare capsule Petri Ø 94 mm.
- Lasciare asciugare le piastre per diversi minuti e conservare le stesse a 4-5°C per almeno 24 ore al buio.

**Substrato di Agar Nutritivo al Saccarosio (ANS)**

<b>Dosi per 400 mL di terreno</b>	
Difco™ nutrient Agar	10,0 g
Saccarosio	20,0 g
H <sub>2</sub> O bidistillata	400 mL

- Aggiungere i diversi componenti con la quantità prescritta di acqua in bottiglie Schott Duran™ da 500 ml.

- Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C, 1 atm, per 20 minuti.
- Lasciare raffreddare e piastrare in ambiente sterile.
- Lasciare asciugare le piastre per diversi minuti e conservare le stesse a 4-5°C per almeno 24 ore al buio.

### **Substrato con esculina**

<b>Dosi per 500 mL di terreno</b>	
Bactopeptone	2,5 g
Esculina	250 mg
Citrato ferrico	125 mg
Bacto Agar	3,0 g
H <sub>2</sub> O bidistillata	250 mL

- Aggiungere i diversi componenti con la quantità prescritta di acqua in una beuta da 500 ml.
- Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C, 1 atm, per 20 minuti.
- Piastrare, in ambiente sterile, in capsule Petri Ø 60 mm.
- Lasciare asciugare le piastre per diversi minuti e conservare le stesse a 4-5°C per almeno 24 ore al buio.

## Bibliografia

- Alvarez, E.; Brawn, E.G. and McGee, D.C. 1995. New assays for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in soybean seeds. Plant Dis. 79:12-14.
- Chauveau, J. F. 1988, personal communication in National Seed Health System (USDA). 2001. Sb 4.1 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* – Soaked bulk seed.
- Gazzetta ufficiale delle Comunità europee. Direttiva 2002/57/CE del Consiglio del 13/06/2002 e successive modifiche.
- Giesler, L.J. Bacterial diseases of soybean. 2011. Nebguide. University of Nebraska – Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources.
- González, A.; Rodicio, M. and Mendoza, M. 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. Appl. Environ. Microbiol. 69. 2936-41. doi.org/10.1128/AEM.69.5.2936-2941.2003.
- Ignjatov, M.; Milošević, M.; Nikolić, Z.; Vujaković, M. and Petrović, D. 2007. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* isolates from Vojvodina. Phytopathol. Pol. 45: 43–54.
- International Rules for Seed Testing. Validated Seed Health Testing Methods. 2020. 7-023: Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris* (bean) seed.
- Regione Emilia-Romagna. Maculatura batterica della soia. 2012.  
<https://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/fitosanitario/temi/avversita/schede/avversita-per-nome/maculatura-batterica-della-soia>.
- Shields, P. and Cathcart, L. 2010. Oxidase test protocol. American Society for Microbiology.
- Thind, B. 2020. Phytopathogenic Bacteria and Plant Diseases. Boca Raton: CRC Press. doi.org/10.1201/9780429242786.
- UK standards for Microbiology Investigations. Aesculin hydrolysis test. 2017. Standards Unit, Public Health England.
- UK standards for Microbiology Investigations. Oxidase test. 2019. Standards Unit, Public Health England.