

RAPPORTO FINALE

Progetto pilota sulla *Xylella fastidiosa* per ridurre le incertezze di valutazione del rischio

Abstract	
Riassunto	
1. Introduzione	
2. Obiettivi	
2.1. Obiettivi specifici	
2.2. Background e termini del contratto	
3. Metodologia	
3.1. Inoculazioni artificiali per la valutazione della patogenicità e degli ospiti suscettibili	
3.1.1. Piante ospiti e controlli	
3.1.2. Protocollo per le inoculazioni artificiali	
3.1.3. Protocolli di diagnosi per il rilevamento del batterio nelle piante inoculate	
3.2. Realizzazione di un campo sperimentale nell'area infetta	
3.3. Rilievi di campo	
4. Risultati	
4.1. Inoculazioni artificiali in serra in condizioni controllate di temperatura	
4.1.1. Valutazione della patogenicità	
4.1.2. Valutazione della gamma di ospiti	
4.1.3. Piante controllo	
4.2. Inoculazioni artificiali in serra a rete senza il controllo della temperatura	
4.3. Esposizione di diverse specie <i>P. spumarius</i>	
4.4. Rilievi di campo	
5. Discussione di un piano sperimentale di attività per la valutazione della gamma di ospiti del ceppo CoDiRO	
5.1. Requisiti per le inoculazioni artificiali	
5.2. Test diagnostici	
5.3. Ulteriori accorgimenti	
6. Conclusioni	
Riferimenti bibliografici	

Conclusioni

Le infezioni di *Xylella fastidiosa* sono notevolmente influenzate da diverse variabili come il vasto spettro di piante ospiti, la diversa suscettibilità delle specie vegetali in relazione alle sottospecie e ceppi del patogeno ed anche il numero di potenziali insetti vettori. Il programma di ricerca di cui al presente report, si pone l'obiettivo di chiarire tutte le informazioni relative al rilevamento di *Xylella fastidiosa* nel territorio dell'UE. Per quanto riguarda il continente americano, esiste una vasta letteratura scientifica circa la biologia, l'epidemiologia e la gamma di ospiti del patogeno. Per l'area mediterranea appare ancora deficitaria la conoscenza della suscettibilità delle specie vegetali e il grado di virulenza di *Xylella fastidiosa* negli agroecosistemi del bacino del Mediterraneo. Il ceppo salentino della sottospecie *pauca*, denominato CoDiRO è in realtà di nuova identificazione, il cui "gemello" è stato ritrovato in Costa Rica (Nunney et al., 2014, Loconsole et al., 2016) su piante di oleandro e di caffè. Le attività condotte nello studio riportato permettono di acquisire conoscenze circa la patogenicità del ceppo CoDiRO sulle specie ospiti (olivo, oleandro e *Polygala myrtifolia*) e di ottenere dati preliminari sul suo potenziale impatto sulle colture di maggiore interesse dell'Eurozona (vite, agrumi, drupacee ed essenze forestali come *Quercus ilex*). Le ricerche condotte nei due anni trascorsi dal primo rilevamento nell'area del Salento, hanno portato a nuove evidenze scientifiche: (i) olivo, oleandro, rosmarino, ciliegio, mandorlo ed alcune piante ornamentali sono suscettibili all'infezione del ceppo CoDiRO e rappresentano nuovi ospiti della sottospecie *pauca*; (ii) esiste una variabilità tra le cultivar di olivo per quanto concerne la risposta all'infezione; (iii) *Polygala myrtifolia*, *Myrtus communis*, *Grevillea juniperina*, *Laurus nobilis*, *Myoporum insulare* e *Dodonaea viscosa purpurea* rappresentano nuove specie ospiti di *Xylella fastidiosa*.

Tutti i dati ottenuti dalle inoculazioni artificiali sono in perfetto accordo con quelli registrati in campo: (i) l'olivo è molto suscettibile alle infezioni causate dagli isolati della sottospecie *pauca*, con particolare riferimento al ceppo CoDiRO; (ii) diverse cultivar di olivo mostrano un comportamento diverso (infezione, moltiplicazione e movimento del batterio); (iii) sintomi da infezioni sistemiche sono stati osservati sia su piante in campo che su quelle inoculate artificialmente; (iv) tra le cultivar studiate, la Cellina di Nardò è risultata la più suscettibile all'infezione. I dati relativi alle piante inoculate sono concordanti con le osservazioni fatte in pieno campo in relazione alle caratteristiche di alcune cultivar, come il Leccino, che sebbene sia suscettibile all'infezione, mostra un quadro sintomatologico più blando ed una minore concentrazione del batterio rispetto alla cultivar Cellina di Nardò. La patogenicità del ceppo CoDiRO è stata confermata per le specie ospiti che presentano i sintomi più aggressivi in condizioni naturali di infezione e quindi per la cultivar di olivo Cellina di Nardò, l'oleandro e la *Polygala myrtifolia*. Per quest'ultima specie la prova di re-isolamento è

ancora in corso, mentre per le altre è stata ampiamente verificata. Le osservazioni si estenderanno anche ad altre cultivar inoculate, come Coratina, Leccino e Frantoio, nelle quali la colonizzazione dell'ospite da parte del batterio sembra richiedere un periodo di incubazione più lungo rispetto alle piante di Cellina di Nardò. Una grossa mole di risultati sarà disponibile nei prossimi mesi. Le osservazioni andranno avanti anche per le piante innestate di Cellina di Nardò, per monitorare lo sviluppo di sintomi per le infezioni cominciate dai portinnesti, i quali normalmente appaiono per lungo tempo asintomatici. Osservazioni aggiuntive saranno orientate ai semenzali che sono rapidamente colonizzati dal batterio, anche se solo una pianta ha mostrato disseccamento.

Le prove di inoculazione su olivo hanno confermato una risposta differenziata delle diverse cultivar nei confronti dell'infezione, ragion per cui sono necessarie ulteriori indagini per poter approfondire i meccanismi alla base del diverso comportamento delle varietà di olivo. Tale lavoro potrà essere utile anche per i programmi futuri di miglioramento genetico ma anche per i decisori politici allo scopo di implementare la legislazione in materia. La disponibilità di varietà tolleranti e/o resistenti potrebbe permettere il mantenimento dell'olivicoltura nelle zone infette, laddove oggi è proibito piantare nuovi olivi.

Il diverso comportamento della cultivar Coratina circa la modalità di inoculazione (blanda infezione attraverso inoculazione meccanica e severa mediante trasmissione per vettore) evidenzia ancora una volta la necessità di proseguire con la ricerca. I risultati ottenuti da esperimenti condotti in condizioni ambientali diverse differiscono in maniera significativa. L'esposizione delle piante inoculate alle temperature invernali ed estive, riduce sensibilmente la moltiplicazione, l'accumulo e il movimento del batterio negli ospiti suscettibili. Per la verità nessuna delle piante inoculate si presenta senza sintomi confrontate con le piante mantenute a temperature ottimali (26-28°C). Considerando il periodo di inoculazione (ottobre 2014), le piante sono state esposte a temperature invernali dopo appena 2 mesi e probabilmente tale breve lasso di tempo ha rappresentato l'ostacolo maggiore per lo sviluppo sistemico dell'infezione negli ospiti suscettibili. Sebbene limitata ad un solo anno, tale osservazione fornisce l'indicazione preliminare che l'infezione verificatasi tardivamente nel corso della stagione, potrebbe non evolvere in una colonizzazione massiva da parte del batterio.

L'inoculazione artificiale di sei differenti specie di agrumi non ha generato una colonizzazione completa dell'ospite. Sebbene il batterio sia stato rilevato in poche piante inoculate, mediante PCR quantitativa, prelevando porzioni di stelo fino a 10 cm dal punto di inoculazione, il re-isolamento dagli stessi tessuti non ha avuto esito positivo. Tale risultato potrebbe essere spiegato ipotizzando il movimento passivo del batterio e/o la presenza di cellule non vitali. Le analisi di laboratorio

concordano con il mancato sviluppo di sintomi nelle piante inoculate ed anche con le osservazioni condotte su piante di agrumi in pieno campo, spesso nelle immediate vicinanze di olivi severamente colpiti da disseccamento (Martelli et al., 2016).

Per vite e *Quercus ilex*, il batterio è stato rilevato soltanto all'altezza del punto di inoculo, rafforzando l'ipotesi che il ceppo CoDiRO non è in grado di colonizzare e replicarsi all'interno di detti ospiti. Tali risultati sono perfettamente in linea con le indagini effettuate nell'area infetta su diverse cultivar di vite. Il fallimento del re-isolamento e la mancanza di sintomi su vite e leccio, supportano l'ipotesi che tali piante non sono suscettibili all'infezione.

Per quanto riguarda il genere *Prunus* spp., l'inoculazione artificiale ha confermato che il mandorlo è una specie suscettibile, come risulta dagli esperimenti su due cultivar. Tuttavia in ogni caso non è stato possibile rilevare il batterio nel portainnesto e nelle radici a conferma che, indipendentemente dalle subspecie, *Xylella fastidiosa* non è in grado di colonizzare i portinnesti di alcune drupacee (Ledbetter et al., 2009). Una riprova di ciò si è avuta inoculando 19 GF677, comuni portinnesti di drupacee, e verificando che nessuno di essi è stato colonizzato con successo dal batterio nell'arco temporale di 12 mesi. Le piante di mandorlo saranno comunque oggetto di successive osservazioni per un'altra stagione vegetativa e verranno tentati altri re-isolamenti. Analogamente per il ciliegio le prove continueranno per la prossima stagione vegetativa e saranno effettuate altre inoculazioni, utilizzando nuove metodologie per ovviare all'ostacolo della cera epicuticolare dei giovani germogli. Per quanto riguarda le altre drupacee, non sono state rilevate infezioni sistemiche allo stato attuale delle ricerche.

L'esposizione naturale di giovani piante all'infezione e al vettore *Philaenus spumarius*, si traduce in un'infezione completa e sistemica per le specie suscettibili note (olivo, oleandro, *P. myrtifolia*), mentre non si assiste ad alcuna infezione per vite, agrumi e *Q. ilex*. Per acquisire nuove conoscenze circa la sensibilità diagnostica delle diverse tecniche utilizzate per il rilevamento del batterio in piante asintomatiche, i campioni vegetali raccolti sono stati processati sia con test ELISA che mediante tecniche molecolari (qPCR, PCR e LAMP).

Con riferimento all'olivo, il campo sperimentale allestito potrà servire come fonte di materiale vegetale per le prossime indagini allo scopo di approfondire le interazioni ospite-patogeno con il vantaggio di valutare diverse cultivar nelle stesse condizioni pedoclimatiche, con alberi della stessa età e sottoposti alle medesime condizioni di infezione.

Polygala myrtifolia si conferma come importante pianta indicatrice in quanto sviluppa i sintomi dell'infezione molto più rapidamente rispetto ad oleandro e olivo ed è suscettibile sia alla subspecie *pauca* che alla *multiplex*.

La Xylella causa la malattia dell'olivo

Un nuovo studio ha confermato che la *Xylella fastidiosa* è responsabile della malattia che sta distruggendo gli alberi di ulivo nel sud Italia. Anche oleandro e *Polygala myrtifolia* soccombono al ceppo pugliese del batterio, ma agrumi, vite e leccio sembrano essere resistenti.

I risultati scaturiscono da indagini condotte in Puglia nel corso degli ultimi due anni per definire la gamma d'ospite di *X. fastidiosa* ceppo CoDiRO. Ricercatori del Consiglio Nazionale delle Ricerche italiano hanno esposto al batterio alcune varietà delle più importanti colture perenni attraverso inoculazione artificiale ed esposizione a insetti vettori infettivi in campo.

Sono state testate colture mediterranee come olivo, vite, agrumi, pesco, ciliegio e susino, così come specie forestali come il leccio e specie ornamentali come l'oleandro e la poligala. Il progetto è stato finanziato dall'EFSA.

Giuseppe Stancanelli, capo dell'unità Salute degli animali e delle piante dell'EFSA, ha dichiarato: "Questi risultati confermano che il ceppo CoDiRO di *X. fastidiosa* provoca il disseccamento dell'olivo. Si tratta di un importante passo avanti, perché saremo in grado di valutare con precisione il rischio di diffusione dell'epidemia dal territorio pugliese solo se potremo colmare le lacune sulle conoscenze della gamma d'ospite e dell'epidemiologia del ceppo pugliese."

Le piante di olivo inoculate hanno mostrato simili gravi sintomi - disseccamenti e deperimenti - come quelli osservati in campo. Tuttavia, non tutte le cultivar di olivo hanno risposto nello stesso modo. Ad esempio, il batterio sembra richiedere più tempo a colonizzare, con una più bassa concentrazione, le cultivar Coratina, Leccino e Frantoio rispetto alla Cellina di Nardò, che è una delle cultivar più diffuse nella zona contaminata.

I ricercatori hanno affermato che più test su un numero maggiore di cultivar di olivo si rendono necessari per comprendere le diverse risposte.

Gli esperimenti sul campo hanno inoltre dimostrato che esemplari infettivi di "sputacchina" (*Philaenus spumarius*) - insetto ampiamente diffuso in Puglia - possono trasmettere il batterio ad ulivo, oleandro e *Polygala myrtifolia*. Le infezioni sono state rilevate già sei mesi dopo l'esposizione agli insetti, quando le piante erano ancora asintomatiche.

Nessuna delle piante di agrumi, vite o leccio è risultata positiva a *X. fastidiosa* in seguito all'esposizione ad esemplari di *P. spumarius* infettivi. Allo stesso modo, piante

di agrumi, vite e leccio, sperimentalmente inoculate, non hanno manifestato infezioni sistemiche o sviluppato sintomi sospetti.

Ulteriori osservazioni e test diagnostici sono necessari per ottenere dati conclusivi sui fruttiferi.

Tutte le piante inoculate saranno tenute sotto osservazione per almeno un'altra stagione vegetativa, mentre gli esperimenti sul campo saranno estesi per un massimo di 10 anni.

Il Dr. Stancanelli ha aggiunto: "i risultati di questo progetto hanno ridotto significativamente le incertezze riguardanti i rischi connessi al ceppo *X. fastidiosa* CoDiRO sul territorio dell'Unione Europea, e saranno d'aiuto nella pianificazione di future ricerche.

Ulteriori esperimenti in campo ed in laboratorio dovranno essere condotti per esplorare ulteriormente le risposte del germoplasma olivicolo mediterraneo, con lo scopo di identificare varietà tolleranti o resistenti che possano essere coltivate nelle aree affette da *X. fastidiosa*.

Ci aspettiamo di acquisire maggiori conoscenze a supporto delle strategie di controllo della malattia dai progetti di ricerca finanziati dalla UE nell'ambito del programma Horizon 2020".

infoxy@elea.it