

Un lungo lavoro di analisi ha dimostrato che il batterio è la causa della malattia che sta devastando gli olivi della Puglia

AGRICOLTURA

Xylella



Christian Jungblod/Alf/Contrasto

oppure no?



A inizio 2017 mi è stato chiesto dalla Commissione ricerca dell'Accademia nazionale dei Lincei – organo di consulenza dei poteri pubblici italiani – di occuparmi di un problema particolare: valutare se vi fossero dati a sufficienza per provare in maniera solida la correlazione tra l'infezione osservata in olivo da parte del batterio *Xylella fastidiosa* e la presenza di sintomi di quella che è nota come sindrome da disseccamento rapido dell'olivo (CoDiRo).

Non che l'Accademia non avesse espresso con chiarezza il suo punto di vista sulla questione: a parere dei Lincei i dati disponibili a metà 2016 davano indicazioni già molto chiare, tanto da indurre questa istituzione a pubblicare un rapporto dedicato a *Xylella*, nella speranza di dissipare i dubbi su quale fosse la posizione della comunità scientifica riguardo al problema.

Questo rapporto è stato frutto di un lavoro di analisi meticoloso, che ha incluso numerose interviste con i ricercatori che si occupavano e si occupano del problema, visite presso i rispettivi laboratori, ispezioni di vario genere; e per maggior bilanciamento anche visite e interviste presso chi aveva espresso dubbi sulla consistenza dell'associazione tra batterio e malattia, magari indicando altri potenziali fattori. Un lavoro lungo, che però è servito solo in parte a risolvere le perplessità di chi si opponeva all'associazione tra batterio e disseccamento. In particolare alcuni – tra i quali il sottoscritto – lamentavano la mancanza di analisi effettuate su campioni sufficientemente numerosi, tali da fugare ogni dubbio; altri ancora ritenevano che la tipologia dei dati a disposizione non fosse adatta a provare in modo certo il nesso fra la presenza di *X.*

Infezione. Foglie di olivo del Salento infettate dal batterio *Xylella fastidiosa*. La correlazione tra il batterio e la cosiddetta sindrome da disseccamento rapido è stata oggetto di dibattito e di numerosi studi.

fastidiosa e CoDiRo, nonostante quanto asserito da chi si era occupato del problema in modo esteso.

Con ammirevole senso di responsabilità, derivante dalla propria missione nei confronti del nostro paese, la Commissione ricerca dell'Accademia ha pensato di rispondere alle critiche facendo ciò che le regole della «scienza aperta» prevedono: ha chiamato cioè a esaminare la questione proprio uno dei critici, il quale per giunta non avesse alcun legame di co-interesse con i ricercatori pugliesi o con chiunque si fosse in precedenza occupato di *Xylella*. Ho accettato l'incarico con entusiasmo, e quanto segue è il resoconto di quello che ho trovato insieme alla Commissione.

Stabilire una correlazione

Il concetto di correlazione tra presenza di un certo batterio e presenza di una certa malattia, si tratti di piante o altri organismi, è ingannevolmente semplice. Per senso comune saremmo portati a pensare per esempio che se analizzando in serie centinaia di olivi che contengono *X. fastidiosa* trovassimo sempre o quasi sintomi da disseccamento, allora la sindrome dovrebbe essere correlata alla presenza del patogeno.

In realtà è facile mostrare che non è così: continuando le nostre misurazioni potremmo infatti scoprire che anche olivi senza infezione da *Xylella* mostrano sintomi di disseccamento; in questa condizione (sintomi presenti sia negli olivi infetti sia negli olivi non infetti) il batterio sarebbe ovviamente ininfluenza ai fini dello sviluppo della malattia.

Per stabilire la correlazione, quindi, abbiamo innanzitutto bisogno di due serie di dati circa la presenza o l'assenza dei sintomi: una riguardante olivi infetti e un'altra che si riferisce a olivi senza batterio. Se la correlazione esiste ci aspettiamo di trovare molto più frequentemente sintomi negli olivi portatori del batterio che non nel gruppo di olivi che ne sono privi. Nel caso questa ipotesi si verifichi possiamo concludere che quando c'è il batterio la malattia è presente. Però se il batterio non fosse il più importante agente correlato alla malattia, ma solo uno fra molti altri più importanti, potremmo ancora scoprire che nella maggioranza degli olivi disseccati il batterio è assente; potrebbe cioè sì essere costantemente associato al disseccamento, ma non essere il fattore più frequente. Per esempio potrebbe darsi che nella stragrande parte degli olivi infetti ci sia un fungo, ugualmente correlato al disseccamento; mentre il batterio potrebbe essere ritrovato solo in una piccola quota di olivi disseccati.

Abbiamo quindi bisogno di invertire il nostro modo di procedere. Partendo cioè da una certa quantità di olivi di cui conosciamo i sintomi – sani o disseccati in vario grado – possiamo andare a rilevare la presenza del batterio. In questo caso, se il batterio è importante come fattore correlato alla malattia ci aspettiamo che negli olivi disseccati sia presente di frequente, mentre al contrario sia scarsamente rilevato in quelli senza sintomi apparenti.

Ricapitolando, per stabilire se un patogeno è un fattore correlato e importante nello sviluppo del disseccamento, dobbiamo ve-

Enrico Bucci è professore aggiunto alla Temple University di Philadelphia, dove si occupa di biologia dei sistemi complessi presso la Sbarro Health Research Organization. I suoi interessi vertono sull'analisi dei dati biomedici a grande scala, relativi sia alla biologia quantitativa che all'integrità della ricerca scientifica.

rificare se negli olivi infetti si osservino frequentemente sintomi; se negli olivi non infetti siano scarse le manifestazioni di sintomi; se in presenza di sintomi si ritrovi frequentemente il batterio; se in assenza di sintomi il batterio sia poco frequente.

I dati disponibili

Molti dei documenti presentati in diverse sedi contengono dati generali che si riferiscono a campionamenti anche molto ampi di olivi, riportando il numero totale di olivi risultati sintomatici, non sintomatici, infetti da *Xylella* e privi del batterio.

Per esempio, nel documento *Final report of an audit carried out in Italy from 8 June 2015 to 19 June 2015 in order to evaluate the situation and the official controls for Xylella*, pubblicato dall'Unione Europea, sono riportati 562 olivi positivi a *Xylella*. Ma quanti di questi olivi presentavano sintomi? Non è possibile saperlo dai dati aggregati che il documento, come molti altri, presenta al lettore; dunque non è possibile usare questi dati per stabilire se vi sia correlazione o meno tra disseccamento e batterio (e nemmeno quale sia la prevalenza complessiva dell'infezione, visto che i campioni sono stati raccolti in aree geografiche limitate e tendenzialmente esenti dall'infezione e dal disseccamento degli olivi). Lo scopo per cui nel documento citato sono discussi i dati aggregati è infatti un altro: come indicato nel titolo, si tratta di valutare la situazione sul territorio e l'appropriatezza delle misure messe in atto per contenere l'infezione, visto che il batterio è comunque considerato un organismo pericoloso.

Nonostante gran parte dei documenti e dei dati rintracciabili sia per il motivo appena discusso inutilizzabile ai fini dell'accertamento della correlazione, c'è tuttavia una banca dati pubblica che vale la pena considerare. Si tratta della banca dati della Regione Puglia, che è possibile consultare sul Web (www.emergenzaXylella.it) e che contiene i risultati delle analisi molecolari mirate a rivelare la presenza di *Xylella* in migliaia di campioni di olivo. È prodotta da una rete di laboratori che in questo momento si sta occupando del monitoraggio: la rete Selge, e nello specifico i laboratori del Consiglio nazionale delle ricerche (CNR) e dell'Università degli Studi di Bari «Aldo Moro» a essa afferenti.

Per ogni campione, oltre a informazioni generali come data di campionamento, coordinate della pianta di provenienza, sigla corrispondente al gruppo di tecnici che in campo ha prelevato il campione e qualche altro dettaglio, è riportato l'esito di tre test molecolari indipendenti usati per verificare la presenza del batterio oltre alla presenza o assenza di sintomi sulla pianta campionata.

IN BREVE

All'inizio di quest'anno la

Commissione ricerca dell'Accademia nazionale dei Lincei ha chiesto all'autore di valutare se vi fossero dati sufficienti per provare in maniera solida la correlazione tra

infezione del batterio *Xylella fastidiosa* osservata in olivi pugliesi e presenza di sintomi di della sindrome da disseccamento rapido.

Lo studio ha riguardato oltre 5000 campioni di olivo raccolti da inizio

2015 a fine 2016. I campioni sono stati sottoposti a saggi di ricerca del batterio; inoltre, per stabilire un eventuale nesso di causalità il batterio è stato iniettato in olivi di una varietà nota per la sua

suscettibilità all'infezione.

I risultati hanno mostrato che *Xylella fastidiosa* è correlata alla sindrome da disseccamento rapido, e non è un semplice opportunista: il batterio è la causa della malattia.



Alcuni dei 500 alberi campionati dai ricercatori di Bari per valutare la presenza di *Xylella* in olivi con sintomi di disseccamento rapido. Le piante mostrano chiari ed estesi sintomi di sofferenza e si trovano in comuni del Salento noti per essere stati colonizzati da *Xylella* da almeno due anni.



Purtroppo il sito web della Regione Puglia non presenta i dati in una forma facilmente utilizzabile: sono disponibili sotto forma di scansioni in formato PDF delle tabelle originariamente prodotte via via che il campionamento procede, con tanto di timbro e firma del funzionario responsabile, forse allo scopo di dimostrare burocraticamente l'avvenuta esecuzione della procedura di campionamento. Per fortuna, a volte la tecnologia può ovviare alla burocrazia: i file PDF con i dati di interesse sono stati sottoposti a una procedura di riconoscimento ottico dei caratteri per ottenere di nuovo i dati originari indispensabili, e gli inevitabili errori sono stati corretti manualmente. In questo modo sono state ottenute informazioni su 5422 campioni di olivo raccolti da circa 200 operatori da inizio 2015 a fine 2016. I campioni risultano sottoposti a 10.844 saggi di ricerca del DNA di *Xylella* (saggi di PCR) e a 5338 saggi con anticorpo per l'individuazione indipendente dello stesso (saggi cosiddetti ELISA). Si tratta di un lavoro enorme, che ha permesso di cercare il batterio in ogni campione quasi sempre con tre diversi saggi molecolari (uno di ELISA e due di PCR).

Sulla base di questi dati, insieme alla Commissione ricerca abbiamo messo alla prova quello che era già stato affermato con certezza un anno fa dall'Accademia dei Lincei e dal resto della comunità scientifica competente su questi problemi, cioè che *Xylella* fosse correlata alla sindrome da disseccamento che sta devastando gli oliveti del Salento e che sta lentamente risalendo verso Nord.

I risultati

Il primo risultato è apparso evidente già a uno sguardo immediato ai dati: circa 4 olivi su 5 in cui si rileva *Xylella* mostrano sintomi di disseccamento; viceversa, in assenza del batterio solo 1 olivo su 5 mostra sintomi. Questo vale sia se il batterio è stato identificato dalla presenza del suo DNA sia se è stato trovato con anticorpi (considerato pure che nella stragrande maggioranza dei casi i risultati dei due tipi di test coincidono); l'unica differenza è in una maggiore sensibilità della tecnica di PCR, che nel campione esaminato è in grado di dare una risposta su presenza o assenza del batterio un 20 per cento di volte in più (casi in cui ELISA dà esito dubbio).

Come mai si osserva che 1 olivo su 5, nonostante sia infetto, non manifesta sintomi? Seppure il loro peso non sia certo, vi sono alcuni fattori che con sicurezza contribuiscono a spiegare questo risultato. Innanzitutto, va detto che il sintomo del disseccamento appare in media oltre un anno dopo l'infezione del batterio (quando cioè il batterio ha raggiunto una quantità sufficiente a ostruire i vasi dello xylema dell'albero infetto). Parte degli olivi risultati positivi al batterio, ma privi di sintomi, sono semplicemente stati campionati a uno stadio precoce dell'infezione.

Inoltre anche le tecniche molecolari più raffinate non sono esenti da errore: per esempio, in campioni di mandorlo sicuramente privi di infezione la PCR ha indicato erroneamente la presenza di *Xylella* in circa il 10 per cento dei casi. Infine il caso più interessante: sembra proprio che alcune varietà di olivo presenti nei campi pugliesi, per esempio il Leccino, siano resistenti all'infezione, per cui manifestano sintomi in misura molto ridotta rispetto ad altre varietà. Si tratta di quelli che già lo scienziato tedesco Robert Koch – autore di un famoso set di postulati che indicativamente devono essere rispettati affinché si possa parlare di rapporto tra un patogeno e una malattia – identificò come portatori sani

(nel caso del colera, per esempio): organismi resistenti che pur infetti non sviluppano la malattia, in apparente contraddizione con il secondo dei suoi postulati (il patogeno deve essere assente in individui sani, *si veda il box nella pagina a fronte*).

Perché poi alcuni olivi del campione esaminato (1 su 5 circa) sono privi di *Xylella*, ma manifestano sintomi? Intanto va considerato che il disseccamento è un sintomo aspecifico e che, quando gli operatori addetti al campionamento registrano la presenza di sintomi, non si limitano alle piante con «disseccamento rapido» proclamato, descritto come CoDiRO, ma spesso includono anche piante con lievi disseccamenti che non necessariamente evolvono in «disseccamento rapido». In aggiunta, ancora una volta, c'è da considerare l'errore inevitabile dei metodi di identificazione del batterio. Inoltre, campionare un olivo che mostra sintomi non è semplice: se per esempio l'operatore ha prelevato una zona morta dell'albero, il batterio può essere assente; lo stesso accade se il campione è prelevato in una zona troppo distante dai sintomi, ancora non colonizzata dal batterio. Infine, aspetto cruciale, l'olivo che mostra sintomi può provenire da una zona ancora distante da quella in cui è «sbarcata» *Xylella*: le zone di monitoraggio, in cui si procede al campionamento proprio per verificare se il batterio sia o meno arrivato. In queste zone, in cui non si è osservato ancora un aumento improvviso ed esponenziale del numero di olivi disseccati e morti, vi è pur sempre l'azione dei «normali» agenti disseccanti, i quali causano sintomi su alberi che risultano ancora negativi al batterio, grosso modo a un livello costante nel tempo.

La presenza di alberi con disseccamenti, anche lievi, ma privi di batterio, in zone lontane dal centro dell'epidemia è normale, e la probabile presenza di campioni provenienti da questi olivi nei dati esaminati può rendere ragione di quell'olivo su cinque che mostra sintomi ma non è infetto; ma che cosa succede se si campiona in una zona in cui il batterio c'è da tempo (e in cui è evidente l'anomalo, esponenziale aumento di olivi morti o moribondi)? La risposta è arrivata ad aprile 2017 dal campionamento di 500 olivi (varietà Ogliarola e Cellina) in provincia di Lecce, in 11 comuni dove l'aumento di piante disseccate è in corso da almeno due anni, per opera del gruppo di Giovanni Martelli dell'ateneo barese e di Donato Boscia del CNR di Bari. L'esito delle analisi dei campioni provenienti da una zona da tempo infetta e da alberi sintomatici avrebbe soddisfatto pure Koch: il 100 per cento dei campioni mostra presenza del batterio.

Ricapitoliamo: il campione Selge, esaminato insieme alla Commissione ricerca dei Lincei, che è affetto da inevitabili errori ed è «sporcato» da campioni provenienti da zone non infette (in cui comunque sono presenti olivi sintomatici, dovuti alla normale patofisiologia di questa pianta), restituisce un'associazione dell'80 per cento tra presenza del batterio e presenza dei sintomi, mentre un 20 per cento di olivi privi di batterio risultano sintomatici; se però si considerano le zone in cui il batterio è certamente presente da tempo (nel Salento) e l'aumento di olivi disseccati è innegabile, allora in tutti gli olivi disseccati si trova *Xylella*.

Il nesso di causalità

Si potrebbe obiettare a questo punto che l'abbondante presenza del batterio specificamente negli olivi sintomatici sia una conseguenza, non una causa del disseccamento, e che i veri patogeni responsabili siano altri, mentre *Xylella* sarebbe solo un opportu-



Koch sì, ma con giudizio

Il medico e batteriologo tedesco Robert Koch, vissuto tra il XIX e il XX secolo, è autore di un famoso insieme di postulati, elencati qui sotto, che indicativamente devono essere rispettati affinché si possa parlare di rapporto tra un patogeno e una malattia. Per essere ritenuto causa di una specifica malattia, un agente infettivo deve:

- Essere presente in tutti i casi di quella malattia
- Non essere presente in individui sani (e in altre malattie)
- Essere isolato in coltura pura dai tessuti colpiti
- Riprodurre quella malattia se inoculato sperimentalmente in un ospite ricettivo

Dai dati su *Xylella* e gli olivi analizzati in Puglia si evince tuttavia che:

- In violazione del primo postulato, alcuni olivi sintomatici non risultano infetti;
- In violazione del secondo postulato, alcuni olivi infetti non mostrano sintomi (cioè il batterio è presente in olivi apparentemente sani)

In realtà, già lo stesso Koch si era accorto del fatto che i suoi (utili) postulati sono solo una guida teorica all'identificazione degli agenti infettivi. Per esempio il colera, una delle malattie su cui lo scienziato tedesco ha speso buona parte della sua vita professionale, è propagato anche da portatori sani, in aperta violazione del secondo postulato. Quindi assumere come discriminante per l'associazione di un patogeno a una malattia la verifica assoluta dei postulati di Koch è un grave errore metodologico.

nista che attacca piante già indebolite da un fattore diverso. Pure Koch lo aveva detto: se un agente patogeno è la causa di una certa malattia, bisogna che esso, isolato in purezza dai tessuti malati e iniettato in un organismo suscettibile, causi l'insorgere dei sintomi. Questo è l'esperimento effettuato ancora una volta dagli esperti ricercatori di Bari, i cui risultati sono stati presentati il 28 aprile scorso nelle aule del Consiglio della Regione Puglia da Martelli. Il batterio è stato iniettato in piantine di olivo della varietà Cellina, nota per la sua suscettibilità all'infezione e tipicamente presente nei campi salentini. Dopo un periodo di diversi mesi il disseccamento è apparso evidente, sicché pure questa volta Koch avrebbe potuto essere soddisfatto: il batterio è la causa del disseccamento osservato nei campi in cui si manifesta la moria degli olivi e in cui esso è presente nel 100 per cento delle piante malate o moribonde di varietà suscettibili.

Portatori sani di *Xylella*

Come si è visto, un fattore che può contribuire alla presenza del batterio in olivi privi di sintomi rilevata nei dati Selge analizzati può essere la presenza di campioni prelevati da olivi di varietà resistenti. Sebbene alcune indicazioni in questo senso fossero state già date, a chiarire la questione in maniera netta sono arrivati nuovi dati dei ricercatori baresi.

Negli stessi campi in cui sono stati prelevati i rametti degli olivi di Ogliarola e Cellina, devastati da *Xylella*, sono stati pure prelevati campioni da 100 alberi di varietà Leccino. Mentre tutti gli alberi circostanti di varietà diverse erano sintomatici e come visto infetti dal batterio, solo nel 30 per cento di questi alberi di Leccino è risultato rilevabile il batterio, in quantità comunque inferiore rispetto alle altre varietà. Inoltre, quando piantine di Leccino sono state infettate sperimentalmente con il batterio si è avuta la conferma: mentre come abbiamo visto la Cellina mostrava tutti i sintomi, il Leccino risultava sostanzialmente indistinguibile dalle piante in cui il batterio non era stato iniettato. Quel che vale per il Leccino può valere pure per altre varietà di olivo, e proprio per questo sono in corso esperimenti su larga scala per determinare quali siano le varietà migliori per fronteggiare l'emergenza pugliese.

Facciamo il punto

L'analisi del campione Selge ha mostrato quel che già era stato affermato con fermezza dalla comunità scientifica e dall'Accademia dei Lincei: *Xylella* è correlata alla sindrome da disseccamento rapido dell'olivo. Sebbene il disseccamento sia un sintomo ambiguo, la cui causa può essere riconducibile a fattori diversi, l'aumento esponenziale di olivi disseccati nel Salento e la loro moria sono legati con sicurezza al batterio. Dunque, se la domanda che ci poniamo è quale sia il fattore correlato all'epidemia (e non semplicemente che cosa sia genericamente correlato al disseccamento in un olivo), sulla base dei dati disponibili la risposta è una sola e non ambigua.

Inoltre i ricercatori di Bari hanno dimostrato che il batterio non è un semplice opportunista, che attacca olivi già compromessi: esso causa la malattia. Fortunatamente le osservazioni già riportate riguardo alla presenza di varietà resistenti sono state confermate in campo su un ampio numero di individui per il Leccino, che ha mostrato pure resistenza nei saggi di patogenicità. Altre varietà sono allo studio e potranno costituire una prima risorsa per affrontare il terribile batterio; mentre si attendono i risultati sperimentali, altri set di dati che si rendessero disponibili, anche molto più ampi di quello Selge e provenienti dal monitoraggio fitosanitario, potrebbero intanto contribuire all'identificazione di ulteriori cultivar resistenti, e anche fornire ulteriori informazioni rilevanti. ■

PER APPROFONDIRE

Susceptibility of *Olea europaea* L. varieties to *Xylella fastidiosa* subsp. pauca ST53: Systematic Literature Search up to 24 March 2017. Delbianco A., Stancanelli G. e Tramontini S., «EFSA Journal», Vol. 15, n. 4, 19 aprile 2017.

Pilot Project on *Xylella fastidiosa* to Reduce Risk Assessment Uncertainties. Saponari M., Boscia D., Saponari A., Fumarola G., Di Carolo M. e altri, in «EFSA Supporting Publications», Vol. 13, n. 3, marzo 2016.

High Throughput PCR Detection of *Xylella fastidiosa* Directly from Almond Tissues. Chen J., Civerolo E.L., in «Journal of Microbiological Methods», Vol. 73, n. 1, pp. 57-61, 2008.

Rapporto *Xylella*. Gruppo di lavoro dell'Accademia dei Lincei, Roma, 2016.