



REGIONE PUGLIA

---

## Osservazioni ed analisi di olivi infetti da *Xylella fastidiosa* sottoposti a 5 anni di trattamenti con Nuovolivo

---

A cura dell'Osservatorio fitosanitario – Regione Puglia

---

Gennaio 2022

## Sommario

---

1 Premessa.....	3
2 Introduzione.....	4
2 Verifica degli effetti sullo stato vegetativo.....	4
2 Verifica degli effetti sulla popolazione batterica.....	6
2 Conclusioni.....	7

## 1 Premessa

Nel corso del XXVI convegno della società italiana di patologia vegetale SIPaV, tenutasi dal 15 al 17 settembre 2021, gli autori G.L. Bruno, L. Botrugno, C. Cariddi hanno presentato una comunicazione dal titolo “*Preliminary observations on a sustainable solution to reduce the impact of Xylella fastidiosa subsp pauca on olive in the Salento Peninsula*”.

La comunicazione fornisce i risultati di due anni di trattamento con il prodotto NuovOливо®, un detergente bioattivo naturale ottenuto miscelando olii vegetali ed estratti di varie specie botaniche (Brevetto n. 102017000109094) per il controllo del disseccamento rapido dell'olivo causato da *Xylella fastidiosa*. L'attività di ricerca si configura come il completamento di una precedente ricerca pubblicata sulla rivista scientifica *Crop Protection* (139, 105288) dal titolo “*Exploring a sustainable solution to control Xylella fastidiosa subsp. pauca on olive in the Salento Peninsula, Southern Italy*” a cura dei medesimi autori.

La ricerca è stata condotta in due oliveti ubicati nella provincia di Lecce, negli agri di Sternatia e Montesano Salentino, i cui esiti sono:

- significativa riduzione della sintomatologia manifestata dalle piante trattate con il prodotto di che trattasi dopo tre anni di trattamenti ed una riduzione del 99,04% del DNA del batterio nelle piante trattate rispetto ai controlli non trattati;
- le piante trattate sono state completamente recuperate dopo sei anni di trattamento e la riduzione della popolazione di *Xylella* sarebbe salita al 99,2%.

L'immagine del campo che segue (Figura 1) è ripresa dal poster presentato dagli autori al summenzionato convegno SIPaV e la relativa mappa grafica è parte dalla pubblicazione su *Crop Protection*.



Figura 1. Immagine fotografica e schema sperimentale della parcella oggetto della sperimentazione in agro di Montesano Salentino: nel poligono verde le piante trattate, nel quadrilatero rosso i controlli non trattati.

In entrambe le comunicazioni scientifiche gli autori riportano non solo un effetto dei trattamenti sulla sintomatologia ma anche il sostanziale azzeramento della carica batterica che, se confermato, avrebbe una particolare importanza, creando il presupposto per proporre la radicale modifica delle azioni di contenimento imposte dai regolamenti comunitari.

In considerazione della portata della pubblicazione scientifica l'Osservatorio fitosanitario della Regione Puglia ha ritenuto di dovere approfondire il tema per confermare lo stato sanitario delle piante e la ripetibilità dei risultati pubblicati.

## 2 Introduzione

Preliminarmente è stato contattato il responsabile scientifico e corresponding author della pubblicazione su *Crop Protection* Dottor Giovanni Luigi Bruno, Ricercatore presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.) dell'Università di Bari, per informarlo dell'interesse a fare delle verifiche alle prove sperimentali oggetto delle pubblicazioni. Dal colloquio è emerso che uno dei due oliveti oggetto della pubblicazione su *Crop Protection*, quello di Sternatia, su decisione del proprietario è stato estirpato mentre è ancora disponibile quello di Montesano Salentino; pertanto le attività di verifica sono state indirizzate su quest'ultimo.

La parcella è costituita da 4 file di piante trattate (3 file di 7 piante e la prima fila di 6 olivi che seguono una pianta di nespolo del Giappone) e due file adiacenti di piante non trattate (7 piante per fila). Il Dr. Bruno ha riferito che nei primi 4 anni di trattamento tutte le file, anche le due non trattate, sono state gestite applicando "buone pratiche agronomiche" (concimazione, irrigazione, rimozione frequente della vegetazione disseccata mediante leggere potature). Il quinto anno la gestione delle due file non trattate, appartenenti ad un proprietario diverso, sono state gestite autonomamente dal proprietario senza il controllo del Dr. Bruno, quindi la gestione agronomica non è stata la stessa delle piante trattate (come peraltro si evince dalla foto sottostante, che mostra una differente gestione del suolo).

## 2 Verifica degli effetti sullo stato vegetativo

Nel corso di due sopralluoghi (in presenza del Dr. Bruno) effettuati a Novembre 2021, rispettivamente, dal Dirigente dell'Osservatorio fitosanitario Dr. Salvatore Infantino e dall'Ispettore fitosanitario Dr. Angelo dell'Onne è stato verificato che le piante della cv. Cellina di Nardò, oggetto della prova (sia le 4 file trattate che le 2 non trattate), a differenza degli oliveti circostanti quasi completamente disseccati e in evidente stato di abbandono, si distinguevano per la presenza di chioma in vegetazione.

Dalla foto panoramica (fig. 1) si evince che le piante delle due file non trattate hanno uno sviluppo eterogeneo, alcune con una chioma molto ridotta ed altre simili allo sviluppo medio di quelle trattate. Il forte contrasto di entrambe le tesi (trattato e non trattato) con gli oliveti sullo sfondo è presumibilmente dovuto alla gestione differente ("buone pratiche agronomiche" vs trascuratezza/abbandono).

L'esame comparativo di immagini della stessa parcella risalenti ad agosto 2010 precedenti l'epidemia di *Xylella*, scaricate da Google Earth/Street view, con quelle attuali, indica come la vegetazione delle 4 file trattate fosse molto più abbondante di quella attuale, con le chiome di due file adiacenti tra loro a contatto, come si vede anche dall'ombra proiettata sul suolo (Fig. 2).

Cosa ben diversa dallo stato attuale (Fig. 1 e Fig. 3) dove le chiome di ciascuna fila sono nettamente distanziate da quelle della fila adiacente.



Figura 2. Immagine scaricata da Google Earth, scattata nel 2010, e relativa alle piante che fanno parte della parcella trattata con NuovOlivo



Figura 3. Immagine dello stato attuale delle piante della parcella trattata. La prima pianta a sinistra è un albero di nespolo del Giappone.

Con riferimento alle due file non trattate, sempre ad agosto 2010, queste apparivano con uno sviluppo evidentemente più ridotto rispetto a quelle della parcella trattata, probabilmente con piante disetanee. Come si evince dalla figura 4, le chiome delle due file erano già allora chiaramente distanziate, come conferma la proiezione dell'ombra sul suolo. E' quindi doveroso precisare che la parcella trattata ed il confronto non trattato fanno riferimento ad alberi che all'avvio della sperimentazione avevano differente sviluppo.



Figura 4. Immagine scaricata da Google Earth, scattata nel 2010, e relativa alle piante che fanno parte della parcella non trattata con NuovOливо.

Alla luce delle suddette osservazioni appare evidente che:

- l'applicazione delle "buone pratiche agronomiche" appare determinante nell'assicurare un migliore rigoglio vegetativo nelle piante infette da *X. fastidiosa*, come si evince dal confronto tra le piante della prova sperimentale in oggetto (sia trattate che non trattate con NuovOливо), rispetto alle piante completamente abbandonate degli oliveti circostanti;
- con riferimento invece al confronto trattato vs non trattato, dopo 5 anni di trattamenti la chioma delle piante trattate resta di sviluppo limitato e a livello visivo non è apprezzabile un significativo incremento della massa vegetativa rispetto al non trattato; peraltro dal confronto con la situazione antecedente all'arrivo di Xylella, i 5 anni di trattamenti non sono stati sufficienti a restituire una condizione vegetativa soddisfacente tale da permettere la ricostruzione della chioma delle piante trattate allo stato ante Xylella.

## 2 Verifica degli effetti sulla popolazione batterica

### Campionamento ed analisi

Al fine di verificare l'azione antibatterica di NuovOливо, così come riportato nelle succitate pubblicazioni, il 30 novembre 2021 l'Ispettore Cosimo Cavallo, in presenza del Dott. Bruno, ha campionato tutte le 27 piante delle 4 file trattate, 10 piante delle due file non trattate e 6 olivi di oliveti adiacenti non soggetti ad alcun trattamento o intervento di gestione agronomica. Di seguito (Fig. 5) si riporta la mappa con l'ubicazione delle 43 piante campionate.

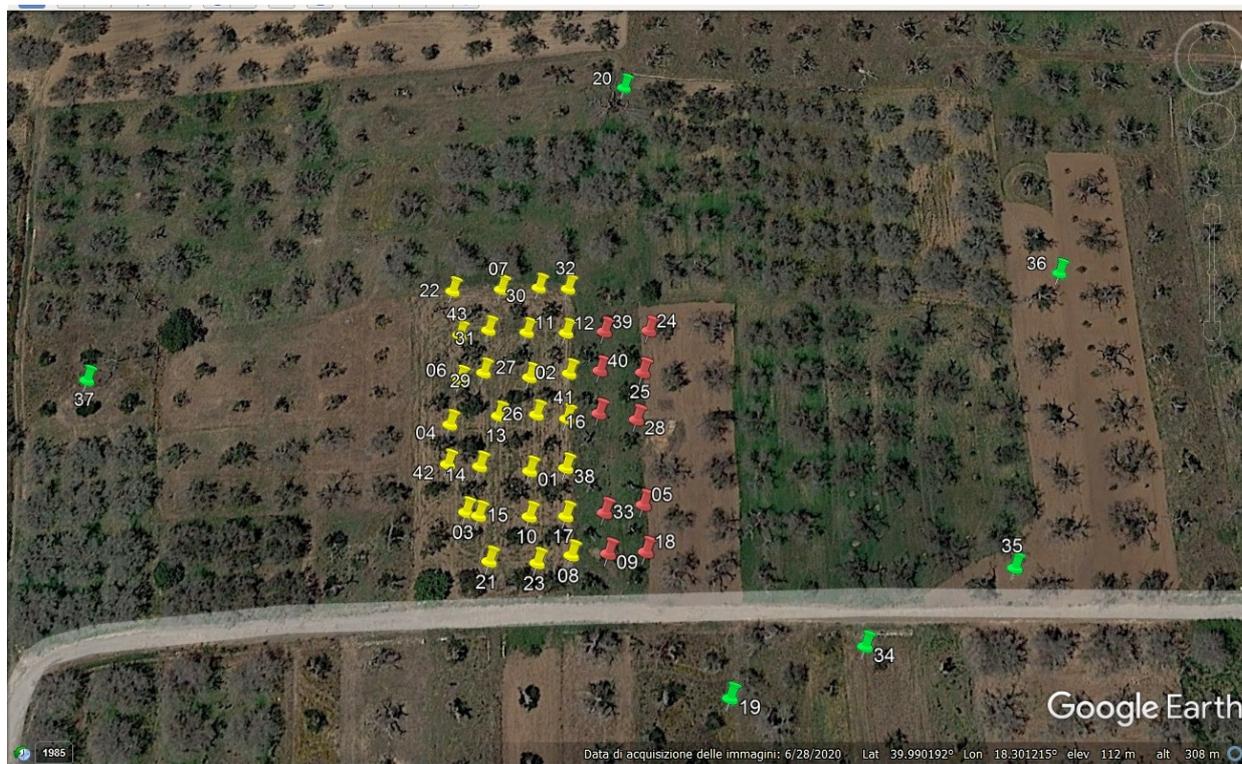


Figura 5 - Immagine della parcella sperimentale di Montesano Salentino, con indicazione delle piante oggetto di campionamento il 30 novembre 2021. In giallo le piante trattate, in rosso i controlli non trattati, in verde le piante fuori prova.

Da ciascuna pianta sono stati prelevati rametti lignificati dell'anno, seguendo le linee guida regionali per il monitoraggio di *X. fastidiosa*. Ogni campione è stato diviso equamente in due buste, sigillato e numerato. I due lotti gemelli di 43 campioni sono stati inviati per le analisi a due laboratori della rete regionale impegnati nel programma di monitoraggio Xylella, rispettivamente alla sede di Bari dell'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR e al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali dell'Università del Salento - UniSalento (Lecce). Le buste dei campioni sono state contrassegnate da codice numerico univoco, senza alcuna informazione sulle piante, la loro posizione e l'appartenenza ad una delle tre tesi. Ai laboratori è stata richiesta l'analisi diagnostica, non solo qualitativa ma anche quantitativa, con il protocollo real time PCR descritta da Harper et al. (2010).

### Risultati

In entrambi i laboratori, CNR e UniSalento, tutti i 43 campioni analizzati sono risultati positivi a *Xylella fastidiosa* ossia hanno generato valori di ciclo quantitativo ben al di sotto del valore soglia, senza differenze significative di popolazione batterica, risultata elevata sia nelle piante gravemente compromesse del circondario che in entrambe le tesi, trattato e non trattato, della parcella sperimentale. Pertanto né la gestione con buone pratiche né il trattamento con NuovOливо sembrano avere sortito alcun effetto sulla popolazione batterica delle piante. La quantificazione è stata ottenuta utilizzando uno standard a concentrazione nota, ossia un estratto di olivo sano contaminato artificialmente con una

concentrazione nota di cellule batteriche. Attraverso l'interpolazione sulla retta standard generata dai campioni "standard" è stata quindi indirettamente ricavata la concentrazione di cellule batteriche (espressa come Unità Formanti Colonie per millilitro - CFU/ml) nei 43 campioni positivi. E' da evidenziare che seppure il saggio qPCR non è in grado di discriminare tra cellule batteriche vive e morte, il rilevamento di DNA batterico in elevate quantità (media nell'ordine di  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml), con valori simili tra trattato e non trattato, e la sua identificazione in rametti di un anno di piante al quinto anno di trattamento con NuovOливо, supporta l'evidenza che si tratti di DNA di cellule vive in attiva moltiplicazione anche nelle piante trattate, piuttosto che di cellule morte a seguito del trattamento.

La tabella che segue riporta la media dei risultati ottenuti nel laboratorio del CNR e nel laboratorio di UniSalento.

Valori medi dei due laboratori					
Campion e n.	LATITUDE	LONGITUDE	CT medio	Media quantificazi one CFU/ml	Esito PCR Harper et al 2010
1	39.99005815	18.30147913	24.536	1,22E+06	Positivo
2	39.99008381	18.30124310	23.950	1,05E+06	Positivo
3	39.98997235	18.30159524	25.404	4,42E+05	Positivo
4	39.98990862	18.30141330	25.155	4,35E+05	Positivo
5	39.99025325	18.30149909	26.153	2,80E+05	Positivo
6	39.98990505	18.30131093	25.641	3,55E+05	Positivo
7	39.98993334	18.30108085	24.362	8,55E+05	Positivo
8	39.99015686	18.30163830	24.304	7,93E+05	Positivo
9	39.99021440	18.30161884	24.107	1,07E+06	Positivo
10	39.99007592	18.30157609	26.566	1,95E+05	Positivo
11	39.98999575	18.30116840	25.363	4,24E+05	Positivo
12	39.99006129	18.30115017	24.287	1,29E+06	Positivo
13	39.98998471	18.30137237	26.489	3,33E+05	Positivo
14	39.98997589	18.30149142	26.409	2,27E+05	Positivo
15	39.98999454	18.30159760	23.456	1,88E+06	Positivo
16	39.99014897	18.30132060	25.911	4,54E+05	Positivo
17	39.99013326	18.30155984	27.326	1,10E+05	Positivo
18	39.99027362	18.30159839	26.272	2,10E+05	Positivo
19	39.99044927	18.30185506	25.168	4,32E+05	Positivo
20	39.99006067	18.30052280	24.699	6,92E+05	Positivo
21	39.99002928	18.30168753	24.817	5,38E+05	Positivo
22	39.98985168	18.30110787	26.513	4,55E+05	Positivo
23	39.99010504	18.30166959	24.322	2,11E+06	Positivo
24	39.99020051	18.30110753	25.944	2,40E+05	Positivo
25	39.99020579	18.30120774	26.297	2,54E+05	Positivo
26	39.99004619	18.30135297	24.660	1,52E+06	Positivo
27	39.99001902	18.30127188	24.968	5,21E+05	Positivo
28	39.99021281	18.30131650	24.582	6,23E+05	Positivo
29	39.98994143	18.30128228	30.634	4,52E+04	Positivo
30	39.98999651	18.30105771	27.147	1,08E+05	Positivo
31	39.98993080	18.30118275	28.678	5,62E+04	Positivo
32	39.99004684	18.30104544	24.408	9,57E+05	Positivo
33	39.99019495	18.30153469	26.038	3,16E+05	Positivo
34	39.99064558	18.30169452	24.914	5,53E+05	Positivo
35	39.99086261	18.30146876	25.384	3,59E+05	Positivo
36	39.99088152	18.30077366	26.023	3,01E+05	Positivo
37	39.98928552	18.30148165	24.475	7,57E+05	Positivo
38	39.99011551	18.30145637	23.930	1,22E+06	Positivo
39	39.99012578	18.30112933	24.136	1,05E+06	Positivo
40	39.99013332	18.30122220	24.676	6,33E+05	Positivo
41	39.99009792	18.30134756	23.393	1,50E+06	Positivo
42	39.98992222	18.30150117	26.830	1,33E+05	Positivo
43	39.98988444	18.30120735	28.083	5,51E+04	Positivo

Legenda

- campioni prelevati dalle 27 piante in prova
- campioni prelevati dalle 10 piante nelle due file non trattate adiacenti a quelle trattate
- campioni prelevati da 6 piante presenti in oliveti nei dintorni

## 2 Conclusioni

Osservazioni visive ed analisi diagnostiche sono state effettuate al fine di verificare la consistenza degli effetti del trattamento quinquennale di olivi infetti da *Xylella fastidiosa* con NuovOливо®, un detergente bioattivo naturale fatto miscelando oli vegetali e estratti di varie specie botaniche (Brevetto n. 102017000109094), sulla carica batterica e sullo stato vegetativo delle piante.

### Stato vegetativo

Lo stato vegetativo delle piante trattate e contestualmente gestite con "buone pratiche agronomiche" appare sicuramente migliore sia di quelle del circondario non trattate e trascurate che, in misura minore, di quelle del controllo non trattato ma gestito con "buone pratiche".

### Carica batterica

I risultati delle analisi effettuate in due diversi laboratori dei campioni prelevati il 30 novembre 2021 dopo 5 anni di sperimentazione hanno evidenziato una elevata carica batterica in tutte le piante oggetto

di campionamento, senza differenze tra i) piante trattate e ii) non trattate con NuovOливо, e iii) piante non soggette ad alcun intervento di gestione agronomica. Pertanto, i risultati non evidenziano alcuna azione antibatterica verso *X. fastidiosa* del prodotto oggetto della sperimentazione né tantomeno dell'impiego delle sole buone pratiche agronomiche.

In conclusione, purtroppo non sono state confermate le indicazioni sulla potenziale attività antibatterica del prodotto oggetto di sperimentazione. Non è stata infatti osservata nessuna riduzione della carica batterica. Tali piante, pertanto, continuano a rappresentare una importante fonte di inoculo. Sulla base dei dati di cui oggi si dispone ed in assenza di nuove attività sperimentali, non è possibile concludere se il parziale beneficio osservato sullo stato vegetativo sia dovuto esclusivamente alle buone pratiche colturali o anche all'azione di NuovOливо.