

● STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE FUTURE

Resistenza a *Xylella fastidiosa* in diverse cultivar di olivo

IN
breve

OSSERVAZIONI E RILIEVI di campo integrati da saggi diagnostici effettuati su diverse cultivar in un'area fortemente infetta da *Xylella fastidiosa* confermano i fenomeni di resistenza già osservati in precedenti studi sulla cultivar Leccino e individuano nella selezione FS-17® un'ulteriore e potenziale fonte di resistenza al batterio. Al contrario, si rafforzano le evidenze sull'elevata suscettibilità delle cultivar Cellina di Nardò e Ogliarola salentina

ma d'ospiti che comprende 29 specie per lo più arbustive, oltre all'olivo, e le modalità di trasmissione mediante insetti vettori quali la sputacchina (*Philaenus spumarius*) hanno fatto accantonare qualsiasi speranza di eradicazione, facendo concentrare gli sforzi su azioni di contenimento e sulla ricerca di soluzioni che consentano una convivenza sostenibile con il batterio.

Individuare cv resistenti a *Xylella fastidiosa*

L'attuale indisponibilità di cure atte a eliminare *X. fastidiosa* dalle piante infette indirizza verso più concrete strategie di convivenza, rappresentate dalla ricerca di fonti di resistenza nell'olivo e incoraggiate dalle promettenti risultanze delle analisi effettuate su soggetti della cv Leccino. Peraltro, l'individuazione di germoplasma resistente a *Xylella* è contemplata negli Stati Uniti tra le strategie di gestione della malattia di Pierce (Pierce's disease) della vite, coltura gravemente minacciata da una diversa sottospecie del medesimo batterio.

La possibilità di perseguire un'analoga strategia si è manifestata in seguito a osservazioni di campo, che hanno ripetutamente rivelato come piante di Leccino, ancorché infette, appaiono asintomatiche o mostrando disseccamenti non gravi (foto 1), presentassero un migliore stato vegetativo rispetto a quello delle cv fortemente suscettibili Ogliarola salentina e Cellina di Nardò.

Le successive analisi quantitative (Giampetruzzi et al., 2016) hanno dimostrato che nelle piante di Leccino infette sono presenti:

- una concentrazione batterica notevolmente più bassa di quella riscontrata in Ogliarola salentina;
- un'espressione genica differenziale in presenza di infezione.

Al contrario, piante della cv Ogliarola salentina ospitano popolazioni batteriche notevolmente più elevate e subiscono, se infette, un'imponente alterazione dell'espressione genica riconducibile alla condizione di stress idrico imposta da

di D. Boscia, G. Altamura, A. Ciniero, M. Di Carlo, C. Dongiovanni, G. Fumarola, A. Giampetruzzi, P. Greco, P. La Notte, G. Loconsole, F. Manni, G. Melcarne, V. Montilon, M. Morelli, N. Murrone, F. Palmisano, P. Pollastro, O. Potere, V. Roseti, P. Saldarelli, A. Saponari, M. Saponari, V. Savino, M.R. Silletti, F. Specchia, L. Susca, D. Tauro, D. Tavano, P. Venerito, S. Zicca, G.P. Martelli

La Puglia meridionale è da qualche anno alle prese con una epidemia di un ceppo di *Xylella fastidiosa*, batterio da quarantena, agente del «complesso del disseccamento rapido dell'olivo» (Codiolo), affezione che sta devastando gli oliveti salentini, soprattutto quelli costituiti da Ogliarola salentina e Cellina di Nardò, le due cultivar che di gran lunga prevalgono nella zona. **Il batterio fu identificato nell'ottobre del 2013 in un piccolo comprensorio a pochi chilometri da Gallipoli (Lecce), ove progressivi disseccamenti di olivi secolari avevano cominciato a manifestarsi probabil-**

mente tra il 2008 e il 2010.

Dal focolaio, che tre anni e mezzo fa era confinato in un'area del diametro di una decina di chilometri, si è passati, gradualmente ma inesorabilmente, a un territorio che si estende per oltre 100 km di lunghezza, attraverso tutta la provincia di Lecce, buona parte di quella di Brindisi e sconfinando ormai in molti siti del Tarantino. Gli ultimi aggiornamenti dell'intensa campagna di monitoraggio avviata nello scorso settembre dalla Regione Puglia disegnano un quadro in rapida e preoccupante evoluzione. **L'ampia diffusione territoriale dell'epidemia, la corposa gam-**



Foto 1 Piante di Leccino (a **destra**) e di Ogliarola salentina (a **sinistra**) in un oliveto in agro di Alezio (Lecce)

GRAFICO 1 - Piante sintomatiche delle diverse varietà nel periodo luglio 2015 - febbraio 2017

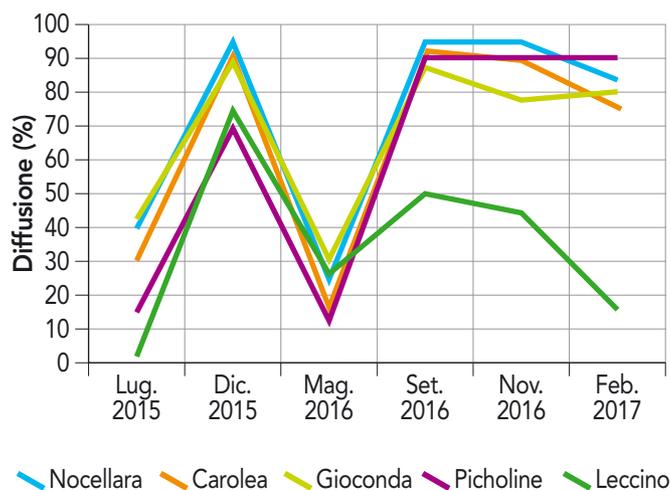
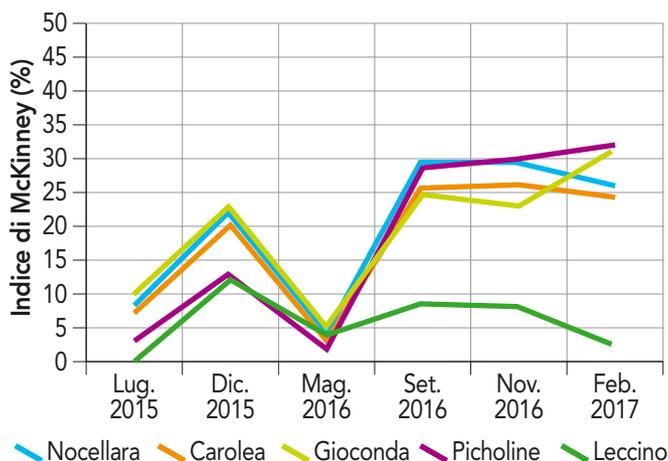


GRAFICO 2 - Intensità della malattia (¹) nelle diverse varietà nel periodo luglio 2015-febbraio 2017



(¹) Indice di McKinney.

GRAFICO 3 - Gravità dei sintomi nelle diverse varietà nel periodo luglio 2015-febbraio 2017

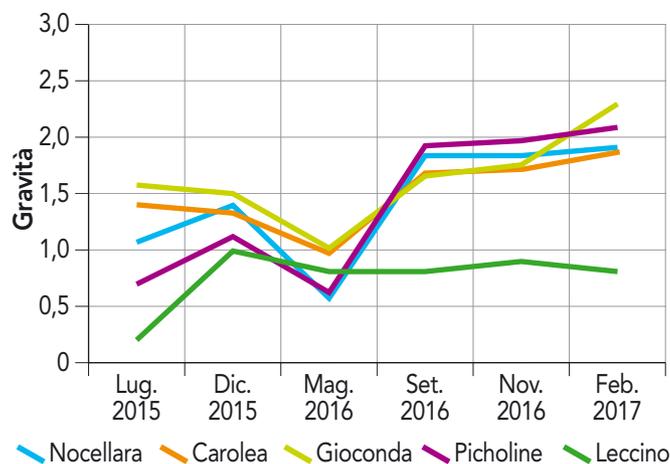
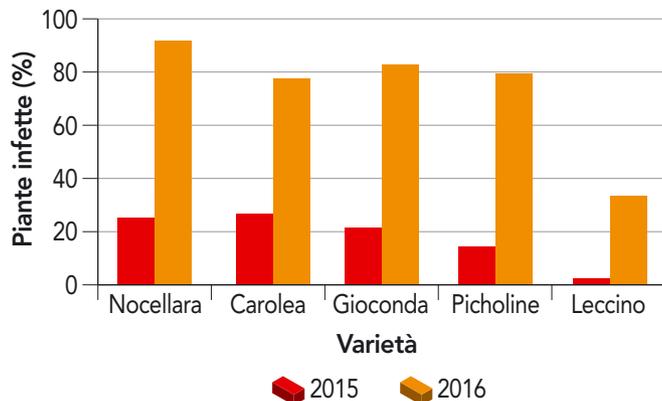


GRAFICO 4 - Piante risultate positive alle analisi sierologiche appartenenti a diverse varietà nel periodo luglio 2015-settembre 2016



X. fastidiosa e a un'intensa attivazione dei meccanismi di difesa della pianta.

Questi dati sono indicativi dell'**esistenza di una base genetica nella manifestazione di resistenza che, in Leccino, presumibilmente inibisce la moltiplicazione batterica e la sua diffusione nella pianta, consentendo a quest'ultima di fronteggiare attivamente l'infezione.**

Queste risultanze sperimentali rappresentano un forte incoraggiamento a perseguire nella individuazione di nuove fonti di resistenza. A tale scopo la sede di Bari dell'Istituto per la protezione sostenibile delle piante (Ipsp) del Cnr, il Dipartimento di scienze del suolo, della pianta e degli alimenti dell'Università di Bari (Disspa) e il Centro di ricerca, sperimentazione e formazione in agricoltura «Basilè Caramia» (Crsfa) di Locorotondo (Bari), insieme all'Istituto andaluz de inve-

stigacion y formacion agraria pesquera alimentaria y de la produccion ecologica (Ifapa) di Cordova (Spagna) hanno avviato specifici studi con due progetti finanziati dalla Unione europea nell'ambito del programma Horizon 2020: «Pest organisms threatening Europe (Ponte)», e «*Xylella fastidiosa* active containment through a multidisciplinary-oriented research strategy (XF-Actors)»; e il «Pilot project on *Xylella fastidiosa* to reduce risk assessment uncertainties» (Saponari et al., 2016), commissionato dall'Efsa all'Ipsp nel 2014. Le sperimentazioni di campo, in uno spirito di interazione con gli olivicoltori locali, vengono condotte mediante stretta e produttiva collaborazione con associazioni di produttori, quali Coldiretti Lecce e Associazione produttori olivicoli (Aprol) della Provincia di Lecce, nonché con operatori olivi-

coli, quali la Società agricola cooperativa «Acli» di Racale (Lecce) e l'azienda olivocolo-olearia «Forestaforte» di Giovanni Melcarne (Gagliano del Capo, Lecce). In questa nota si riportano alcuni aggiornamenti che consolidano le conoscenze sulla parziale resistenza della cv Leccino e individuano l'esistenza di tratti di resistenza al batterio in FS-17®, una selezione di semenzali della cv Frantoio brevettata da Giuseppe Fontanazza (Istituto di bioscienze e biorisorse del Cnr) come varietà di portinnesto clonale.

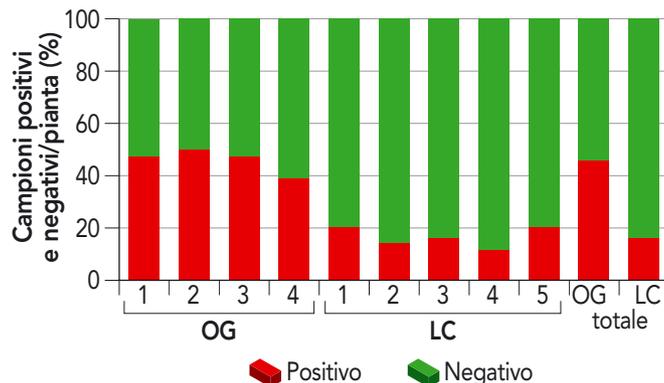
Incidenza di infezioni e sintomi su cv di olivo

Rilevi sintomatologici e saggi diagnostici sono stati effettuati per circa due anni (luglio 2015-febbraio 2017) in un oliveto multivarietales in agro di Alliste (Lec-



Foto 2 Pianta di Leccino in buono stato vegetativo (a **sinistra**) e pianta coetanea della cv Oglierola salentina (a **destra**) ormai in fase terminale in un'azienda in agro di Racale (Lecce)

GRAFICO 5 - Percentuale di campioni di Oglierola salentina (OG) e Leccino (LC) positivi-negativi all'analisi a *Xylella fastidiosa*



Analisi DAS-ELISA su 144 sub-campioni di 4 piante di Oglierola salentina e 185 campioni di 5 piante di Leccino.

ce), un'area fortemente infetta, costituito da piante di 5 diverse varietà dell'età di circa 15 anni, con manifestazioni iniziali di sintomi di disseccamento.

Questa parcella olivetata è circondata da piante di Oglierola salentina di oltre 80 anni con sintomi avanzati della malattia. L'oliveto, costituito da piante delle cv Nocellara (19), Carolea (80), Gioconda (40), Picholine (40) e Leccino (72), è stato sottoposto a rilievi sintomatologici periodici, adottando una scala empirica di infezione da 0 = piante asintomatiche a 5 = piante completamente disseccate, allo scopo di:

- valutare l'incremento delle piante sintomatiche (diffusione);
- determinare l'intensità dei sintomi, mediante due differenti parametri, indice di McKinney e gravità;
- verificare l'evoluzione della percentuale di piante infette mediante analisi sierologiche (ELISA).

I risultati dei rilievi indicano chiaramente per tutte le cultivar un **graduale incremento della percentuale sia delle piante sintomatiche all'osservazione visiva sia di quelle infette all'analisi di laboratorio**. Purtroppo, **a seguito delle operazioni di potatura volte a eliminare le porzioni disseccate e sintomatiche della chioma ed effettuate prima dell'esecuzione del rilievo visivo del maggio 2016, si è osservato in tutte le cultivar un decremento della percentuale di piante sintomatiche**. Nei successivi rilievi, a eccezione del **Leccino che ha manifestato disseccamenti decisamente più lievi (scala 1)**, la percentuale di piante sintomatiche (*grafico 1*) e la gravità della malattia (*grafici 2 e 3*) sono aumentate in tutte le cultivar considerate.

Nello stesso periodo la **percentuale di piante infette (grafico 4), determinata mediante ELISA (Loconsole et al., 2014), ha evidenziato un significativo incremento raggiungendo oltre l'80% in tutte le cultivar considerate a eccezione della Leccino, per il quale l'infezione si è attestata intorno al 30%**. I risultati del saggio ELISA indicano, inoltre, che i valori di OD405nm (Optical density a 405 nm) ottenuti per le diverse cultivar sono sempre più bassi (< 0,850 OD405nm) per la Leccino rispetto alle altre (valore medio > 1,450 OD405nm), confermando la minore concentrazione batterica nei tessuti di questa varietà.

Distribuzione del batterio all'interno delle piante

Nel corso del 2015 sono state effettuate analisi diagnostiche comparative su piante delle cv Leccino e Oglierola salentina per valutare sia la concentrazione sia la distribuzione del batterio nella chioma. In particolare, sono stati individuati due oliveti in cui le due cultivar coesistevano, il primo in agro di Racale (Lecce) con piante in fase di sviluppo avanzato della malattia, ovvero già infette da alcuni anni, il secondo in agro di Ugento (Lecce) con piante con sintomi iniziali, ovvero con infezione presumibilmente recente.

Oliveto in agro di Racale. Nell'oliveto in agro di Racale sono stati prelevati 87 campioni rappresentativi di più parti della chioma da 5 piante di Leccino (da 15 a 20 campioni per pianta) dell'età di circa 60 anni con disseccamenti limitati (*foto 2*); dalle 15 piante di Oglierola

la salentina di circa 60 anni di età, con disseccamenti in fase avanzata (*foto 2*) è stato prelevato un unico campione per pianta. Le analisi sierologiche (ELISA, kit Agritest srl, Italia) sono risultate positive per tutti i 15 campioni di Oglierola salentina (100% di campioni infetti) con un valore medio di 1,677 OD405nm, mentre le piante di Leccino, pur risultando infette, hanno rivelato reazioni positive solo nel 47% dei campioni prelevati, con valori medi di assorbanza pari a 0,875 OD405nm. **Questi dati, in linea con i risultati raccolti nell'ambito di precedenti indagini diagnostiche, confermano la presenza di una popolazione batterica sensibilmente meno concentrata in Leccino rispetto all'Oglierola salentina.**

Oliveto di agro di Ugento. L'oliveto in agro di Ugento è costituito da piante di circa 25 anni, che all'avvio dei rilievi e campionamenti mostravano una situazione di sviluppo iniziale della malattia osservabile quasi esclusivamente sulle chiome di Oglierola salentina. In questo caso sono stati prelevati 144 campioni da 4 piante di Oglierola salentina (36 campioni/pianta) con sintomi iniziali (scala 1-2) e 185 campioni da 5 piante di Leccino (37 campioni/pianta), delle quali 3 asintomatiche e 2 con lievi disseccamenti. In tutte le 9 piante campionate è stata riscontrata la presenza del batterio. Tuttavia, dall'analisi dei risultati dei singoli campioni, si rileva una considerevole presenza di negativi (232 su 329, pari a circa il 70% del totale), probabilmente dovuta alla distribuzione ancora erratica del batterio nelle piante. La percentuale di cam-



Foto 3 Piante di FS-17® in agro di Sannicola (Lecce). Nella fila a **destra** si notano i disseccamenti su piante di Ogliarola salentina.
Foto 4 Piante di Kalamata nello stesso oliveto in agro di Sannicola (Lecce)

pioni positivi è stata infatti del 16,3% in Leccino e del 45,8% (66 campioni su 144) in Ogliarola salentina (grafico 5).

Anche in questo caso i valori medi delle reazioni ELISA, che si ricorda sono correlati esponenzialmente alla concentrazione del batterio, sono risultati in linea con quanto già riscontrato in precedenza: 1,40 OD405nm in Ogliarola salentina e 0,24 in Leccino.

Presenza di resistenza nella cv FS-17®

Grande interesse ha destato il ritrovamento nell'estate del 2016 in un'area gravemente affetta in agro di Sannicola (Lecce) di un oliveto plurivarietale dell'età di circa 15 anni con piante asintomatiche di FS-17®, cultivar brevettata come portinnesto clonale, ma utilizzata anche per la produzione di olive da olio (Godini et al., 2006). In seguito a tali osservazioni, nel febbraio 2017 è stato effettuato un campionamento da oltre 400 piante per verificare la presenza di *X. fastidiosa* e determinarne la concen-

trazione. Complessivamente sono state analizzate:

- 201 piante di FS-17® di circa 15 anni;
- 177 piante della cv Kalamata di circa 15 anni;
- 10 piante di Ogliarola salentina, con età stimata di oltre 50 anni;
- 18 piante di Leccino, con età stimata di circa 40 anni.

All'osservazione visiva tutte le piante di FS-17® si mostravano asintomatiche (foto 3), le piante di Kalamata presentavano frequenti casi di sofferenza e disseccamenti seppur lievi (foto 4), le piante di Ogliarola salentina mostravano uno stadio avanzato della malattia (foto 5) e, infine, le piante di Leccino erano asintomatiche o mostravano leggeri disseccamenti (foto 6). Il campionamento è consistito nella raccolta da ciascuna pianta di 8 rametti di 15-20 cm privati della porzione terminale più tenera, prelevati da parti diverse della chioma, con almeno un prelievo in corrispondenza di ciascun punto cardinale. I campioni sono stati sottoposti ad analisi sierologiche (ELISA) e mole-

colari [amplificazione genica quantitativa (qPCR) (Harper et al., 2010; Loconsole et al., 2014)]. I risultati sono riportati in sintesi nelle tabelle 1 e 2.

Tutte le 10 piante di Ogliarola salentina sono risultate positive, con valori medi di assorbanza pari a 1,69 OD405nm. Anche le **177 piante di Kalamata hanno mostrato un elevato valore percentuale di positivi (70%)** e un'assorbanza media di 1,40 OD405nm. **Soltanto 9 delle 18 piante di Leccino analizzate sono risultate positive** e, cosa forse più significativa, hanno mostrato un'assorbanza media pari a 0,4 OD405nm, notevolmente più bassa di quella rilevata in Ogliarola salentina. Quest'ultimo dato appare in linea con le precedenti osservazioni.

I risultati sulle **piante di FS-17®** sono apparsi invece sorprendenti: **solo il 12,4% delle 201 piante saggiate è risultato positivo**, con valori di assorbanza media più bassi di quelli del Leccino anche quando riferiti alle sole piante positive (0,46 OD in FS-17® vs 0,67 OD in Leccino).

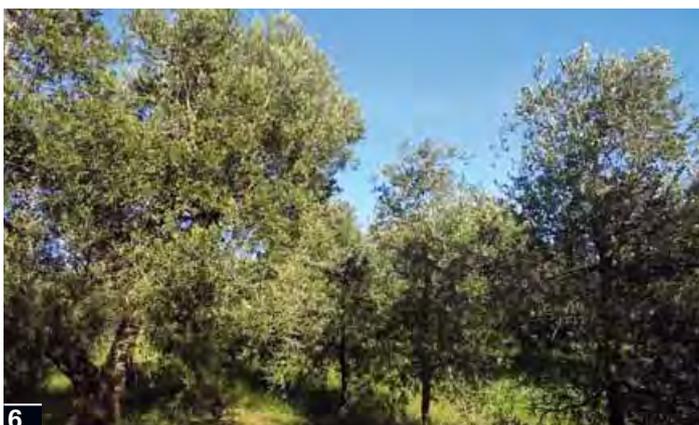


Foto 5 Pianta di Ogliarola salentina dello stesso oliveto in agro di Sannicola (Lecce), con gravi sintomi di disseccamento.
Foto 6 Piante di Leccino (a **sinistra**) e di FS-17® (a **destra**)

Al fine di ricavare una determinazione più accurata della concentrazione batterica presente nei tessuti delle diverse cultivar, 130 dei campioni saggiati in ELISA sono stati sottoposti ad analisi quantitativa molecolare mediante qPCR, da cui si è ottenuto un valore indicativo del numero di cellule (espresso come UFC/mL, unità formanti colonie/ml) presenti nel campione. A conferma del dato registrato in ELISA, **la FS-17® si è rivelata la cultivar con la concentrazione batterica più bassa nelle piante risultate infette** ($5,04 \times 10^4$ UFC/mL, contro $9,93 \times 10^5$ in Leccino, $3,16 \times 10^5$ in Kalamata e ben $4,51 \times 10^6$ in Ogliarola salentina). Sulla base delle analisi condotte fino a oggi, **il batterio sembra essere presente nei tessuti di FS-17® in una quantità che è, in media, la metà della concentrazione misurata in Leccino (50,75% della concentrazione) e quasi 100 volte meno che in Ogliarola salentina (appena l'1,11% della concentrazione rilevata).**

Tale dato, già di per sé significativo, va integrato con quello relativo alla bassa percentuale di piante infette di FS-17®, appena il 12,4%, indicando nell'insieme sia una bassa incidenza di infezioni in questa cultivar, sia un basso titolo della popolazione batterica nelle piante infette, condizione che determina una ridotta pressione di inoculo nell'oliveto.

Una possibilità di convivenza sostenibile

I risultati che continuano a emergere dalle osservazioni di campo e dalle indagini diagnostiche supportano le evidenze iniziali relative alla manifestazione di fenomeni di resistenza nella cv Leccino. Un dato che lascia ben sperare circa una possibile convivenza sostenibile dell'olivicoltura in aree infette dal batterio. L'analisi della distribuzione e della concentrazione della popolazione batterica in piante di diverse cultivar, fornendo risultati diagnostici di elevata sensibilità e affidabilità, conferma l'importanza di una metodologia di campionamento che tenga conto della distribuzione non uniforme del batterio nelle piante. Tali aspetti sono stati presi in considerazione nella redazione delle linee guida attualmente utilizzate a livello regionale per il programma ufficiale di monitoraggio. (http://www.emergenzaXylella.it/portal/portale_gestione_agricoltura/Documenti/normRegionale/)

L'analisi di oltre 200 piante della cultivar FS-17® in una zona ad alta pressio-

TABELLA 1 - Risultati dell'analisi sierologica su piante di FS-17®, Kalamata, Leccino e Ogliarola salentina

| Cultivar | Positivi/Totale | Assorbanza Media totale | Assorbanza media positivi |
|---------------------|-----------------|-------------------------|---------------------------|
| FS-17® | 25/201 | 0,12 OD405 nm | 0,46 OD405 nm |
| Kalamata | 124/177 | 1,40 OD405 nm | 1,97 OD405 nm |
| Leccino | 9/18 | 0,41 OD405 nm | 0,67 OD405 nm |
| Ogliarola salentina | 10/10 | 1,69 OD405 nm | 1,69 OD405 nm |

Analisi DAS-ELISA condotta su 406 piante di olivo, prelevate in agro di Sannicola (Lecce). L'analisi è stata eseguita impiegando il kit diagnostico per *Xylella fastidiosa*, sviluppato da Agritest srl. Per ciascun campione sono state analizzate due repliche tecniche, misurandone l'assorbanza media, espressa in OD (optical density), alla lunghezza d'onda di 405 nm.

TABELLA 2 - Risultati dell'analisi molecolare su piante di FS-17®, Kalamata, Leccino e Ogliarola salentina

| Cultivar | Positivi/Totale | Cq media positiva | Assorbanza media positivi |
|---------------------|-----------------|-------------------|---------------------------|
| FS-17® | 18/51 | 29,59 cicli | $5,04 \cdot 10^4$ UFC/mL |
| Kalamata | 28/51 | 27,21 cicli | $3,16 \cdot 10^5$ UFC/mL |
| Leccino | 9/18 | 28,41 cicli | $9,93 \cdot 10^4$ UFC/mL |
| Ogliarola salentina | 10/10 | 26,41 cicli | $4,51 \cdot 10^6$ UFC/mL |

Analisi qPCR condotta su 130 piante di olivo prelevate in agro di Sannicola (Lecce). L'analisi è stata eseguita impiegando il protocollo diagnostico per *Xylella fastidiosa* descritto da Harper et al. (2010) e Loconsole et al. (2014). Per ciascun campione sono state analizzate due repliche tecniche, misurandone il ciclo soglia (Cq, quantification cycle). Le misurazioni del Cq sono state quindi rapportate a diluizioni note della coltura batterica per calcolare la concentrazione delle cellule presenti nel campione, espressa come UFC/mL (colony-forming units/mL).

ne d'inoculo ha fornito dati molto incoraggianti sulla possibile resistenza a *X. fastidiosa* più elevata di quella riscontrata in Leccino. Si comprende facilmente come questa indicazione preliminare, combinata con l'assenza di sintomi sulle piante di FS-17® saggiate, obblighi a intensificare gli sforzi per ottenere ulteriori conferme sperimentali di campo nonché ad avviare i saggi di infettività/patogenicità con inoculazioni artificiali e per innesto in condizioni controllate. Allo stesso tempo diviene urgente avviare un analogo studio sulla cv Frantoio, sia in quanto parentale di origine di FS-17®, sia perché questa cultivar, in base a ripetute osservazioni di campo nell'areale infetto, sembrerebbe presentare anch'essa una qualche forma di resistenza/tolleranza alla malattia.

**Donato Boscia, Giuseppe Altamura
Pierfederico La Notte
Massimiliano Morelli, Pasquale Saldarelli
Maria Saponari, Danilo Tavano
Stefania Zicca**

CNR, Istituto per la protezione sostenibile delle piante, Sede secondaria di Bari

**Angelo Ciniero, Michele Di Carolo,
Crescenza Dongiovanni Giulio Fumarola,
Vito Montilon
Francesco Palmisano, Paola Pollastro
Antonella Saponari
Maria Rosaria Silletti, Daniele Tauro
Pasquale Venerito**

Centro di ricerca, sperimentazione e formazione in agricoltura «Basile Caramia» Locorotondo (Bari)

**Annalisa Giampetruzzi
Giuliana Loconsole Oriana Potere
Vincenzo Roseti, Vito Savino
Leonardo Susca
Giovanni Paolo Martelli**

Dipartimento di scienze del suolo, della pianta e degli alimenti dell'Università di Bari Aldo Moro

Pantaleo Greco, Francesco Specchia
Associazione produttori olivicoli - Aprol della provincia di Lecce

Federico Manni
Società agricola cooperativa «Acli» - Racale (Lecce)

Giovanni Melcarne
Azienda olivicolo-olearia «Forestaforte»
Gagliano del Capo (Lecce)

Nicola Murrone
Federazione provinciale Coldiretti Lecce

Questo lavoro è stato parzialmente finanziato dal programma EU di ricerca e innovazione Horizon 2020, nell'ambito dei progetti Ponte (Pest organisms threatening Europe, grant agreement N. 635646) e XF-Actors (*Xylella fastidiosa* active containment through a multidisciplinary-oriented research strategy, grant agreement N. 727987).

V Per commenti all'articolo, chiarimenti o suggerimenti scrivi a: redazione@informatoreagrario.it

Per consultare gli approfondimenti e/o la bibliografia: www.informatoreagrario.it/rdLia/17ia11_8826_web