Prot. n. 0224377 del 28/06/2024 - UOR: 494

Consiglio Nazionale delle Ricerche | Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante
Sede Secondaria Bari

Bari 27/06/2024

Dott. Salvatore Infantino
Dirigente Osservatorio Fitosanitario Regione Puglia
Dipartimento Agricoltura, Sviluppo rurale ed Ambientale
Lungomare N. Sauro, 45/46 - 70121 BARI
osservatoriofitosanitario.regione@pec.rupar.puglia.it
s.infantino@regione.puglia.it

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586

Oggetto: comunicazione rinvenimento di nuova specie ospite del batterio *Xylella fastidiosa* sottospecie *pauca*, genotipo ST53.

Si comunica che nell'ambito delle attività sperimentali del progetto "*Rigenerazione sostenibile dell'agricoltura nei territori colpiti da Xylella fastidiosa*" finanziato attraverso uno dei Contratti di distretto Xylella (Avviso MIPAAF n. 10900/2020) ed in particolare nella task 1.4.2 riguardante la verifica della suscettibilità/immunità a *X. fastidiosa* sottospecie *pauca* ST53 di specie e colture arboree alternative, l'UR del CNR-IPSP sede di Bari ha svolto campionamenti e analisi molecolari su diverse piante di *Arbutus unedo* L. (volg. corbezzolo della famiglia *Ericaceae*) in zona infetta.

Come dettagliato nel report tecnico in allegato, a seguito del campionamento eseguito in provincia di Lecce e Taranto, sono state riscontrate e confermate infezioni su diverse piante di corbezzolo.

Restando a disposizione per ulteriori dettagli o informazioni, si porgono Distinti saluti.

Il Responsabile CNR-IPSP per il Progetto
"*Rigenerazione sostenibile dell'agricoltura nei territori colpiti da Xylella fastidiosa*"
Dott. Pierfederico La Notte

Il Responsabile IPSP della Sede Secondaria di Bari
Dott. Giovanni Bubici

Giovanni Nicola Bubici
28.06.2024 12:17:03 GMT+01:00

CNR-IPSP Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante www.ipsp.cnr.it segreteria@ipsp.cnr.it PEC: protocollo.ipsp@pec.cnr.it	**Sedi** Torino Sede Istituzionale - Strada delle Cacce, 73 - 10135 Torino, Tel. + 39 0113977911 Bari - Via Amendola, 122/D - 70126 Bari, Tel. +39 0805929220 Legnaro (PD) - Viale dell'Università, 16 – 35020 Legnaro (PD), Tel. +39 0498272819 Portici (NA) - Piazzale Enrico Fermi, 1 – 80055 Portici (NA), Tel. +39 06499327800 Sesto Fiorentino (FI) - Via Madonna del Piano, 10 – 50019 Sesto F.no (FI), Tel. +39 0555225580 Torino - Viale Mattioli, 25 – 10125 Torino, Tel. + 39 0116502927

Allegato: RELAZIONE TECNICA

Valutazione della suscettibilità di *Arbutus unedo L.,* 1753 (famiglia *Ericaceae*) a *Xylella fastidiosa* sottospecie *pauca,* genotipo ST 53.

Progetto, finalità e metodologia della sperimentazione

L'attività, nell'ambito del progetto "*Rigenerazione sostenibile dell'agricoltura nei territori colpiti da Xylella fastidiosa*" finanziato attraverso uno dei Contratti di distretto Xylella (Avviso MIPAAF n. 10900/2020), è stata condotta nell'ambito della Task 1.4.2 finalizzata a verificare la suscettibilità/immunità a *X. fastidiosa* sottospecie *pauca* ST53 di specie e colture arboree che possano affiancare l'olivo nella rigenerazione agricola del Salento. A tale scopo, mentre per alcune colture non presenti in Salento sono state avviate prove di patogenicità mediante inoculazioni artificiali con insetti vettori (*Philaenus spumarius*), per alcune specie già diffuse nell'area infetta come il corbezzolo, sottoposte quindi fin dall'inizio dell'epidemia ad un'elevata pressione d'inoculo, si è proceduto ad identificare nell'area demarcata infetta, diversi siti con presenza di piante di corbezzolo, sia isolate che in gruppi, localizzate in giardini privati, aree attrezzate a verde pubblico e piccole zone con macchia mediterranea.. Il monitoraggio di questi siti è stato effettuato fra marzo e giugno 2024, procedendo sia con ispezioni visive per il rilievo di eventuali sintomi compatibili (bruscature e disseccamenti) con infezioni del batterio. che con il prelievo di campioni.

Gruppo di ricerca Unità IPSP-CNR

Pierfederico La Notte, Vito Barone**,** Hysen Kokiçi, Serafina Serena Amoia

Strutture utilizzate per la sperimentazione

Laboratori di ricerca della Sede di Bari dell'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR, ubicati presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari (autorizzazione MIPAAF 28990 del 15/12/2014 e 23359 del 28/8/2017).

Attività di monitoraggio

Piante di *Arbutus unedo L.,* di altezza compresa fra 1,50 m e 3 m, identificate in 5 diversi siti (*Figura 1)*, precisamente in agro di Supersano, Casarano, Gallipoli (vivaio forestale regionale ARIF "Li Foggi"), Melendugno (provincia di Lecce) e Manduria (provincia di Taranto).

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586

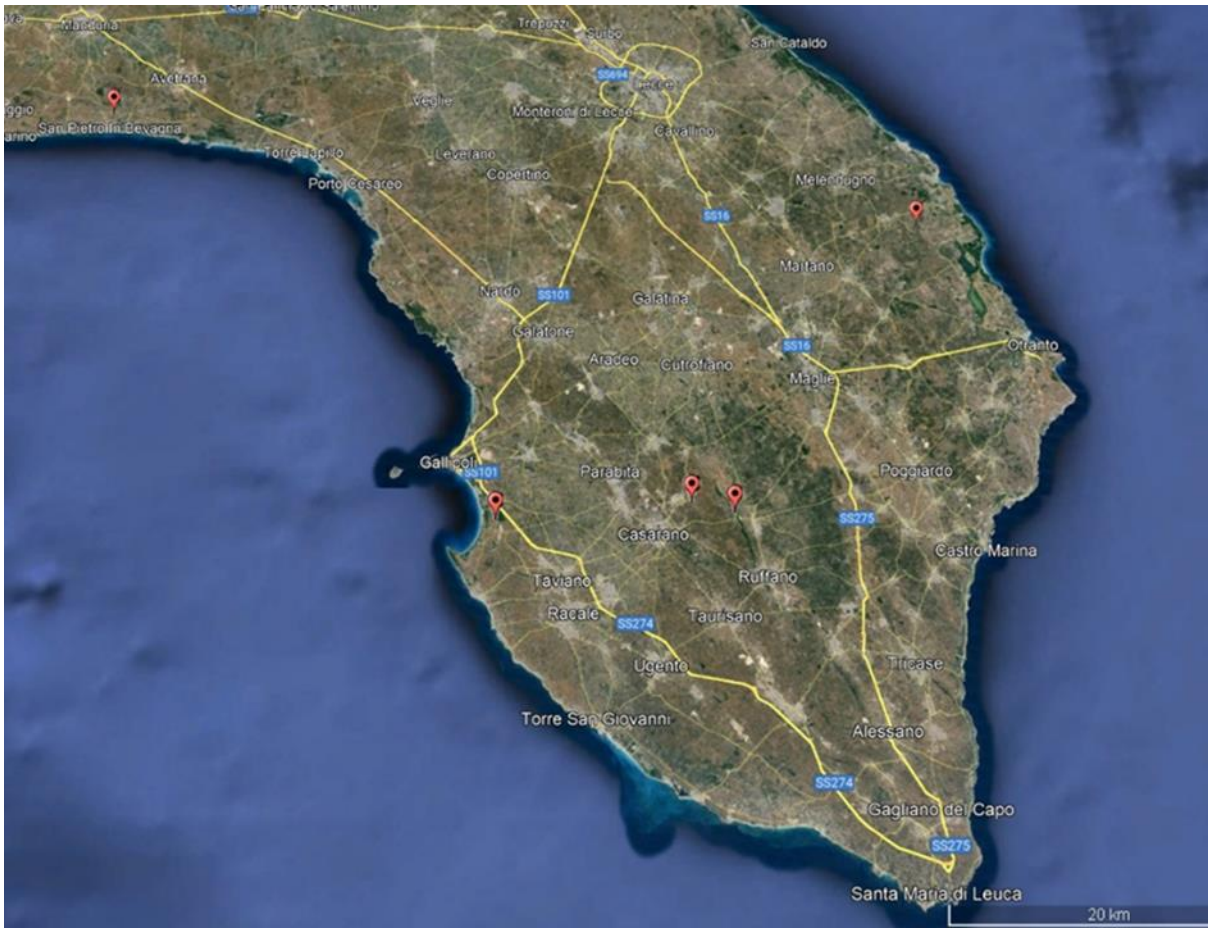

Figura 1. Mappa dei siti selezionati (in rosso) in cui sono stati eseguiti i campionamenti di *A. unedo*.

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586

Le piante identificate in questi siti, sia asintomatiche che con presenza di manifestazioni di *leaf scorching* (bruscatura fogliare) anche estesi a partire dalla porzione apicale delle foglie e disseccamenti sparsi sulla chioma (*Figura 2*), sono state sottoposte a campionamento, relevando 4-5 rami di circa 15 cm per pianta *(Figura 3)*. In totale sono stati prelevati 49 campioni da altrettante piante.

Figura 2. Sintomi di *leaf scorching* (a sinistra) e disseccamenti di intere branche (a destra) su pianta di corbezzolo (*A. unedo*) in agro di Gallipoli (LE).

Figura 3. Rametti prelevati nella fase di campionamento da cui è stato prelevato il tessuto vegetale necessario per i saggi diagnostici.

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586

Diagnosi molecolare Da ciascun campione è stato prelevato del tessuto legnoso dalla porzione lignificata dei rametti. Successivamente solo dai campioni che hanno generato reazioni positive per la presenza del batterio si è proceduto ad effettuare il saggio diagnostico anche sulle foglie ed in particolare sui piccioli fogliari.
Sia nel caso di tessuto legnoso che di piccioli fogliari, i campioni vegetali sono stati macerati in buffer di lisi (CTAB), processati su piattaforma automatizzata con il kit di estrazione commerciale Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega) e sottoposti ad analisi molecolare seguendo il protocollo diagnostico Harper et al. (2010). Contestualmente, la qualità degli acidi nucleici estratti è stata verificata mediante l'amplificazione del gene mitocondriale Cytochrome C Oxidase I (COX), costitutivo di pianta, con il protocollo di Weller et al., 2000.
Successivamente, su uno dei campioni risultati infetti prelevati in agro di Gallipoli (campione AU140) si è proceduto a confermare la reazione positiva ottenuta con il saggio real time qPCR, con l'amplificazione in PCR convenzionale dei 7 geni del batterio, cosiddetti 'housekeeping', inclusi nel protocollo MLST (Yuan et al., 2010).

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586

Risultati
Il saggio diagnostico molecolare ha confermato la presenza del batterio in 28 piante su 49 oggetto di campionamento (pari al 57,14% di incidenza dell'infezione), Su 5 delle piante infette sono stati riscontrati sintomi ascrivibili all'infezione, 17,86%). Il saggio diagnostico effettuato su tessuto xilematico ricavato dai rametti lignificati ha è risultato più sensibile rispetto al saggio effettuato su tessuto fogliare, con cui sono state identificate solo 10 delle 28 piante infette *(Tabella 1).* Anche il valore medio del ciclo quantitativo (Cq) generato nei campioni positivi è risultato più basso (ossia più elevata popolazione batterica) nel tessuto xilematico rispetto al tessuto fogliare.
Con l'analisi MLST, ampliconi delle dimensioni attese sono stati ottenuti per tutti i 7 geni. Il sequenziamento nucleotidico (di tipo Sanger) dei 7 frammenti genici ha permesso di determinare il profilo allelico dell'isolato e di determinarne la sequenza tipo (ST) corrispondente all'ST 53.
Il profilo allelico determinato per i 7 geni amplificati da un campione positivo di *Arbutus unedo L.* è il seguente:

Gene	leuA	malF	holC	cysG	gltT	nuoL	petC	**ST**
Allele	7	16	10	24	14	16	6	**53**

Si precisa infine che è attualmente in corso l'isolamento in coltura pura del batterio da campioni positivi e sintomatici di *Arbutus unedo L*.

Conclusioni

Il monitoraggio nell'area interessata dall'epidemia di *X. fastidiosa* sottospecie pauca ST53, su piante di *Arbutus unedo L.* ha evidenziato un'elevata frequenza di piante infette, con oltre il 50% delle piante ispezionate e campionate. Come riscontrato in altre specie, incluso l'olivo, il campionamento di rametti legnosi per il prelievo di tessuto xilematico per la successiva analisi diagnostica ha generato risultati diagnostici più sensibili rispetto al tessuto fogliare.

In conclusione, la specie sottoposta ad infezione naturale risulta suscettibile a *X. fastidiosa* sottospecie *pauca*, genotipo ST53 e andrebbe quindi inclusa nel relativo elenco delle piante ospiti specificate per il batterio.

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586

Tabella 1. Elenco dei campioni sottoposti a saggio diagnostico molecolare qPCR con relativo valore di quantification cycle (Cq). In rosso i campioni risultati positivi (Cq inferiore a 33). ND = non sottoposto ad analisi.

ID Campione	Risultato qPCR				Sintomi	Localizzazione sito di campionamento	Località
	Tessuto xilematico Cq	Esito	Tessuto fogliare Cq	Esito			
AU101	20,83	Positivo	25,41	Positivo	Presenti	40.03655989281868, 18.191637000000004	Agro di Casarano (LE)
AU102	0	Negativo	ND		Assenti		
AU103	26,43	Positivo	30,35	Positivo	Assenti		
AU104	28,56	Positivo	28,36	Positivo	Assenti		
AU105	28,74	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU106	0	Negativo	ND		Assenti		
AU107	0	Negativo	ND		Assenti		
AU108	30,44	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU109	35,82	Negativo	ND		Assenti		
AU110	21,32	Positivo	26,26	Positivo	Assenti		
AU111	23,41	Positivo	27,71	Positivo	Assenti		
AU112	33,37	Negativo	ND		Assenti		
AU113	24,56	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU114	25,65	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU115	28,19	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU116	0	Negativo	ND		Assenti		
AU117	26,25	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU118	27,00	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU119	25,24	Positivo	29,22	Positivo	Assenti		
AU120	26,03	Positivo	0	Negativo	Assenti	40.03667360133127, 18.192895868107744	
AU121	36,40	Negativo	ND		Assenti	40.0365831038257, 18.192858058813353	
AU122	0	Negativo	ND		Assenti	40.03016405714133, 18.226427787848024	Agro di Supersano (LE)
AU123	32,65	Positivo	0	Negativo	Assenti	40.03016405714133, 18.226427787848024	
AU124	36,49	Negativo	ND		Assenti	40.03020887764459, 18.22636111655828	
AU125	32,17	Positivo	0	Negativo	Assenti	40.03015299999982, 18.226329658896294	
AU126	35,21	Negativo	ND		Assenti	40.030277779103386, 18.225776554271114	
AU127	28,38	Positivo	0	Negativo	Assenti	40.03052548655733, 18.225830000003228	
AU128bis	22,56	Positivo	35,08	Negativo	Presenti	40.03055597311379, 18.226121329452983	
AU129	25,71	Positivo	33,47	Negativo	Presenti	40.030469073091005, 18.225761812217897	
AU130	26,10	Positivo	30,92	Positivo	Presenti	40.02384526770578, 18.032001140687257	Agro di Gallipoli (LE)
AU131	24,77	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU132	0	Negativo	ND		Assenti		
AU133	27,73	Positivo	38,39	Negativo	Assenti		

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586

AU134	26,14	Positivo	29,95	Positivo	Assenti		
AU135	0	Negativo	ND		Assenti		
AU136	27,54	Positivo	28,41	Positivo	Assenti		
AU137	0	Negativo	ND		Assenti		
AU138	27,46	Positivo	0	Negativo	Presenti		
AU139	0	Negativo	ND		Assenti		
AU140	25,36	Positivo	0	Negativo	Assenti		
AU141	26,74	Positivo	28,31	Positivo	Assenti		
AU142	0	Negativo	ND		Assenti		
AU143	0	Negativo	ND		Assenti		
AU144	26,45	Positivo	0	Negativo	Assenti		
RA113	0	Negativo	ND		Assenti	40.24124385784261, 18.405239110723034	Agro di Melendugno (LE)
AU402	0	Negativo	ND		Assenti	40.32818596101845, 17.671803796377628	Agro di Manduria (TA)
AU403	0	Negativo	ND		Assenti	40.327720002677545, 17.672571896377608	
AU404	0	Negativo	ND		Assenti	40.32600826115062, 17.673022925212372	
AU405	0	Negativo	ND		Assenti	40.325919781752866, 17.673055796377575	

PARTITA IVA N. 02118311006 - CODICE FISCALE N. 80054330586