Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

Progetto di Ricerca e Sviluppo

Rigenerazione Sostenibile dell'agricoltura nei territori colpiti da xylella fastidiosa

CUP: J89J21013750001

Partner CNR - IPSP

Task 1.4.2 – Risultato n. 4

Nuove informazioni sperimentali per la verifica, mediante test di patogenicità della sensibilità di nuove colture alternative arboree per il Salento

WP1:	**Analisi di Contesto**
Area tematica:	**SCENARI PRODUTTIVI POST XYLELLA**
Attività:	**Task 1.4: olivo e oltre. Impatti della xylella sui sistemi produttivi e scenari di convivenza con il batterio.**
Partecipanti:	**Task leader Pierfederico La Notte CNR** **Dr. Vito Barone, Dr. Hysen Kokici, Dr.ssa Antonella Labbate, Dr.ssa Loredana Barbarossa**

Il Responsabile di Task
Dr. Pierfederico La Notte

Firmato digitalmente da
LA NOTTE PIERFEDERICO
C=IT

Task 1.4.2 R4 Nuove informazioni sperimentali per la verifica, mediante test di patogenicità della sensibilità di nuove colture alternative arboree per il Salento.

Introduzione

Il monitoraggio delle specie ospiti di *Xylella fastidiosa* in Puglia è diventato un'attività cruciale per la salvaguardia dell'agricoltura e della biodiversità della regione, in quanto consente di comprendere la diffusione del batterio e le dinamiche di interazione tra pianta, patogeno e vettore. È noto, infatti, che il batterio possa infettare oltre 600 specie vegetali appartenenti ad 88 famiglie differenti, molte delle quali non mostrano sintomi evidenti, rendendo così difficile la loro identificazione come ospiti del patogeno. Tra queste, sono state documentate 36 specie sensibili a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST53 in Puglia, tra cui piante ornamentali e selvatiche, che possono fungere da vettori per la trasmissione del batterio. Dato il grande numero di ospiti e l'elevata polifagia del vettore, che nell'areale pugliese è rappresentato principalmente da *Philaenus spumarius*, risulta fondamentale avviare delle verifiche sperimentali con lo scopo di valutare l'immunità o il livello di suscettibilità/resistenza delle specie arboree e/o principali varietà delle colture di potenziale interesse e vocazione agronomico-produttivo nell'ottica della sostituzione ed affiancamento alle varietà di olivo resistenti nell'ambito della rigenerazione sostenibile degli areali Salentini colpiti dal batterio.

In precedenza almeno 14 specie arboree principalmente da frutto, sebbene, ad eccezione soprattutto della vite, con un numero limitato di piante e varietà, sono state sottoposte a test di patogenicità dall'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR di Bari nell'ambito di progetti specifici finanziati da EFSA e nell'ambito dei Progetti Horizon PONTE e XF-Actors. Le piante sono state sottoposte a valutazione della sensibilità dopo inoculazione controllata con vettori o attraverso l'esposizione alla trasmissione naturale in campo. Fortunatamente, come peraltro era precedentemente emerso dallo screening di un gran numero di piante spontanee e coltivate in Salento con l'analisi molecolare di numerosi campioni delle stesse specie, tutte le specie testate erano risultate negative ovvero verificate non essere ospiti del deppo pauca ST53.

Specie/Coltura	Varietà	n. piante	Durata / anno	risultato
Ceratonia siliqua (carrubo)		9	Luglio/sett. 2017	Negativo
Eriobotrya japonica (nespolo)		9	Luglio/sett. 2017	Negativo
Persea americana (avocado)		9	Luglio/sett. 2017	Negativo
Punica granatum (melograno)		9	Luglio/sett. 2017	Negativo
Quercus ilex (leccio)				Negativo
Vitis vinifera (vite)				Negativo
Citrus aurantium (arancio)				Negativo
Citrus lemon (limone)				Negativo
Prunus amygdalus (mandorlo)				Negativo
Prunus armeniacum (albicocco)				Negativo
Prunus persicae (pesco)				Negativo
Pyrus *communis (pero)*	?	9	2018	Negativo
Diospyros kaki (caki)	?	9	2018	Negativo
Juglans regia (noce europeo)	?	9	2018	Negativo

Elenco delle specie arboree sottoposte a Test di patogenicità nei confronti di X. fastidiosa subsp. Pauca ST53.

Nell'ambito del presente progetto, volendo integrare ed allargare il numero delle colture arboree potenziali è stata scelta una strategia di monitoraggio mista per cui, sono state selezionate 28 specie, di cui 14 analizzate con campioni numericamente rappresentativi prelevati in diverse località distribuite nell'areale infetto con elevata e più longeva pressione di inoculo, mentre le restanti, quelle non presenti neppure con piante isolate in Salento, sono state oggetto di prove di trasmissione con vettore in ambiente controllato. L'obiettivo è di raccogliere importanti informazioni sperimentali sulla sensibilità (immunità, resistenza, tolleranza, suscettibilità) ed il ruolo epidemiologico di queste colture candidate e quindi sulla possibilità di proporle in coltivazione senza che incorrano nei divieti di impianto per la normativa fitosanitaria sulla quarantena o che possano rappresentare un rischio fitosanitario attivo.

Materiali e metodi

Le specie arboree oggetto di studio sono state selezionate con un'ampia ricerca bibliografica attraverso motori di ricerca online sulla base delle caratteristiche pedoclimatiche, punti di forza e di debolezza, fattori limitanti strutturali del territorio, esigenze agronomico-produttive e gestionali, cambiamento climatico ed altri fenomeni ambientali. Per il primo gruppo di 14 specie presenti in Salento, la fase esplorativa dei punti di campionamento è stata impostata attraverso contatti diretti e ricerche online, sia con motori di ricerca che interrogando il database GBIF (Global Biodiversity Information Facility) al fine di intercettare le coordinate GPS delle colture in oggetto, verificate poi col comando Street View di Google Maps o con visite dirette in campo. Le prove di trasmissione con vettore in ambiente controllato sono state invece avviate su 9 specie ospiti di Xf subsp. pauca ma con sequencing type (ST) diverso dal 53 e 4 specie non ospiti di Xf ma non presenti in Salento; il campionamento massale in areale a forte pressione di inoculo è stato svolto su 7 specie ospiti e 7 non ospiti di ST53 (Figura 1), il tutto finalizzato a verificare l'immunità o il livello di suscettibilità/resistenza delle specie.

Per il campionamento massale le analisi sono state effettuate su campioni prelevati nel 2023 e 2024 in stagioni differenti, in particolare, tra luglio e settembre 2023 e marzo e giugno 2024, selezionando un numero congruo di località sparse nell'areale salentino, in cui raccogliere al massimo 10 campioni per località (costituiti da 4-5 rametti di almeno 1 anno, di 10-15 cm) nonché selezionando, laddove presenti, piante con sintomi di leaf scorching (bruscatura fogliare) anche estesi a partire dalla porzione apicale delle foglie e disseccamenti sparsi sulla chioma. I test di trasmissione sono stati avviati anch'essi in due stagioni differenti, fra il 2023 e 2024, in particolare su argan, jojoba, lime, passiflora, pompelmo, mango, rovo e sughera in ottobre 2023 mentre su fico, frassino, gelso bianco, gelso nero, mirtillo e argan (ripetuto a causa del basso numero di individui impiegati nel test precedente) fra giugno e luglio 2024. Le prove sono state svolte su piante allevate in vaso nella zona infetta, impiegando trasmissioni seriali con vettori raccolti in zona indenne e lasciati acquisire su piante serbatoio infette (olivo e pervinca), secondo il protocollo di Cavalieri et al. (2019). In particolare, sono stati prelevati circa 700 insetti vettori per prova e ingabbiati con reti antinsetto a gruppi di 50-60 per ciascuna pianta di

olivo o pervinca infetta (pianta serbatoio) e lasciati per 7 giorni all'interno di fitotroni (fase di acquisizione del batterio). Successivamente, i vettori sono stati distribuiti sulle piante a gruppi di 5 (altezza minore di 1 m) o 10 per pianta opportunamente ingabbiate con reti antinsetto per un periodo non inferiore a 96h (Fig.).

Le specie impiegate per la prova di trasmissione sono state campionate ed analizzate per la verifica dell'eventuale infezione a cadenza semestrale. 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), classificando un'ospite positivo se il Cq (Cycle threshold) era inferiore a 32.

.

		Nome comune	**Specie**	**Data inizio campionamento/ test trasmissione**
Campionamento massale di specie diffuse nel Salento	**Specie ospiti di Xf. ST53**	Alaterno	*Rhamnus alaternus*	apr-24
		Alloro	*Laurus nobilis*	apr-24
		Cisto	*Cistus creticus*	apr-24
		Fillirea	*Phillyrea latifolia*	lug-23
		Ginestra	*Spartium junceum*	apr-24
		Mirto	*Myrtus communis*	lug-23
	Specie non ospiti di nessuna ST di Xf.	Cappero	*Capparis spinosa*	giu-24
		Corbezzolo	*Arbutus unedo*	giu-24
		Cotogno	*Cydonia oblonga*	mar-24
		Feijoa	*Feijoa sellowiana*	mar-24

		Lentisco	*Pistacia lentiscus*	lug-23
		Pino comune	*Pinus pinea*	ago-23
		Ricino	*Ricinus communis*	apr-24
		Robinia	*Robinia pseudoacacia*	set-23
Test di patogenicità con trasmissione seriale con vettore	**Specie ospiti di Xf. ma con ST differenti**	Fico	*Ficus carica*	lug-24
		Frassino	*Fraxinus spp.*	lug-24
		Gelso bianco	*Morus alba*	lug-24
		Gelso nero	*Morus nigra*	lug-24
		Jojoba	*Simmondsia chinensis*	ott-23
		Lime	*Citrus aurantiifolia* ×	ott-23
		Mirtillo	*Vaccinium corymbosum*	lug-24
		Pompelmo	*Citrus paradisi*	ott-23
		Rovo	*Rubus fruticosus*	ott-23
		Sughera	*Quercus suber*	ott-23
	Specie non ospiti di Xf. e non presenti in Salento	Argan	*Argania spinosa*	ott-23
		Mango	*Mangifera indica*	ott-23
		Passiflora	*Passiflora edulis*	ott-23

Tabella 1 Elenco delle specie impiegate per i campionamenti massali in areali infetti e test di patogenicità con trasmissione seriale con vettore.

n.b. i dati presentati sono originali e sono in fase di pubblicazione.

Risultati

Campionamento massale di specie diffuse nel Salento

Tra il biennio 2023 e 2024 sono stati prelevati 812 campioni, distribuiti in 131 località dell'areale salentino. Sono state selezionate piante di vario vigore, età e habitat, così come illustrato nell'Allegato , in cui sono indicati come esempio alcune tipologie esemplari e la distribuzione geografica delle coordinate GPS delle singole specie campionate. I risultati della diagnosi molecolare sono illustrati nella Tabella 2 e Grafico 1. Tra le specie riportate come piante specificate sensibili a Xf subsp. Pauca ST53, sono state riscontrati diversi positivi: in particolare, la ginestra ha mostrato una percentuale di positività del 40%, molto superiore a quella riscontrata in alaterno (15,38%) e alloro, fillirea e mirto, dove la percentuale di positività non supera il 10%. Solo per cisto di Creta tutti i campioni analizzati sono risultati negativi. Sono stati individuati 28 campioni positivi di corbezzolo con Cq medio di 27,03, anche se questa specie non rientra nell'elenco delle piante ospiti specificate a Xf. subsp. pauca ST53.

SPECIE	N° SAMPLES	N° GPS SITES	N° POSITIVE Xf	% positivi	Media Cq qPCR
Alaterno	26	4	4	15,38%	26,19
Alloro	84	11	7	8,33%	29,49
Cappero	21	5	0	0,00%	0
Cisto di Creta	70	9	0	0,00%	0
Corbezzolo	49	5	28	57,14%	27,03
Cotogno	23	6	0	0,00%	0
Feijoa	13	4	0	0,00%	0
Fillirea	100	22	9	9,00%	28,29
Ginestra	25	4	10	40,00%	25,28
Lentisco	100	20	0	0,00%	0
Mirto	100	20	3	3,00%	29,21
Pino comune	100	10	0	0,00%	0
Ricino	5	1	0	0,00%	0
Robinia	100	10	0	0,00%	0

Tabella 2 Report dei saggi diagnostici molecolari svolti.

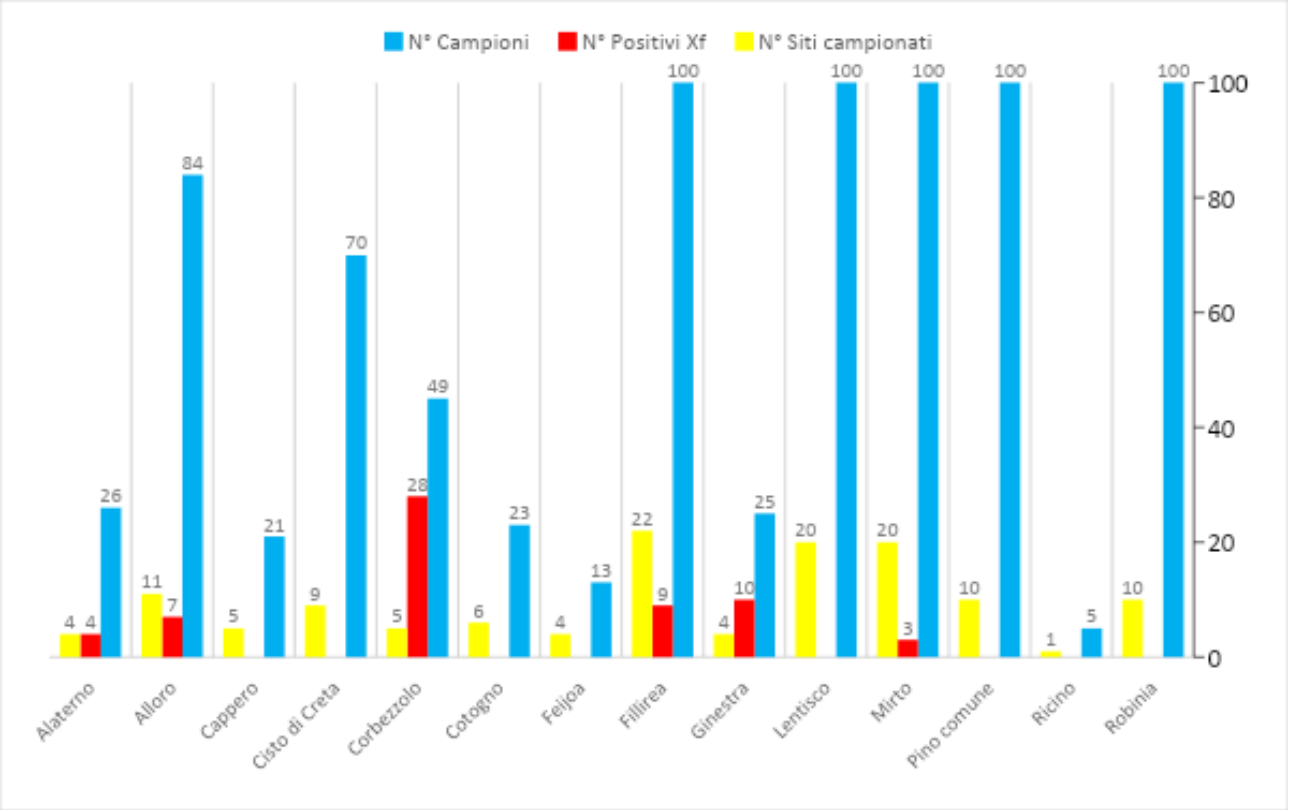

Grafico 1 Distribuzione dei campioni positivi rispetto al totale degli individui e località campionate.

Test di patogenicità con trasmissione con vettore

Le piante oggetto della prova di trasmissione avviata ad ottobre 2023 sono state campionate e sottoposte ad analisi molecolare dopo 7 mesi (aprile 2024). Laddove possibile, sono state selezionate porzioni di chioma in cui non sono stati distribuiti i vettori infetti durante la trasmissione, per evitare falsi positivi o asportare manualmente potenziali serbatoi di inoculo. Nella Tabella 3, sono illustrati i risultati dei saggi diagnostici sotto forma di media di Cq per specie e indici sulla sopravvivenza dei vettori. La maggior parte delle specie inoculate non ha mostrato la presenza del batterio. Nelle specie lime, pompelmo, rovo sughera, mango e passiflora non è stata diagnostica nessuna pianta positiva, mentre in argan e jojoba, il 100% delle piante inoculate è risultato positivo con Cq medi, rispettivamente di 28,75 e 20,22. Per lime, pompelmo e rovo mora, la sopravvivenza dei vettori è stata pari a 0%, indicando che i vettori non sono sopravvissuti in seguito alla fase di trasmissione. È previsto un ulteriore campionamento e saggio molecolare dopo 12 mesi dalla trasmissione, mentre per il secondo pool di piante la cui prova di trasmissione è stata avviata a luglio 2024 sono in programma due

saggi diagnostici, a cadenza semestrale e annuale dalla data di trasmissione. In questo caso, la percentuale di mortalità del vettore è stata massima solo in argan, mentre in gelso nero e fico non ha superato il 10%. Non si sono riscontrati sintomi riconducibili a infezioni di Xf in nessuna pianta.

Specie	N° Piante inoculate	N° Controlli negativi	N° medio vettori/pianta	% sopravvivenza vettori	N° Piante positive Xf	% piante positive	Media Cq qPCR
Lime	9	3	10	0%	0	0,00%	0,00
Pompelmo	9	3	10	0%	0	0,00%	0,00
Rovo	9	3	10	0%	0	0,00%	0,00
Sughera	9	3	10	26%	0	0,00%	0,00
Argan	2	0	5	20%	2	100,00%	28,75
Jojoba	9	3	5	40%	9	100,00%	20,22
Mango	9	3	10	2%	0	0,00%	0,00
Passiflora	9	3	10	8%	0	0,00%	0,00
Olivo controllo	6	-	5	80%	6	100,00%	23,72
Argan (bis)	3	1	5	0%	-	-	-
Gelso bianco	9	3	10	44%	-	-	-
Gelso nero	9	3	10	7%	-	-	-
Fico	8	2	10	9%	-	-	-
Mirtillo	7	2	5	23%	-	-	-
Frassino	9	3	5	31%	-	-	-
Pervinca controllo	6	-	5	58%	-	-	-

Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti dalla presente attività sperimentale forniscono importanti indicazioni sulla distribuzione e suscettibilità di diverse specie vegetali al batterio Xylella fastidiosa subsp. pauca ST53. Le analisi condotte tra il 2023 e il 2024 su un ampio campione di piante nell'areale salentino hanno rivelato una presenza significativa del batterio in alcune specie specificate come ospiti (EFSA (2024). Update of the Xylella spp. host plant database – Systematic literature search up to 31 December 2023), confermando il rischio fitosanitario già noto per queste piante,

e hanno anche identificato nuove specie ospiti che potrebbero avere un ruolo importante nella dinamica di diffusione del batterio. Il ritrovamento di infezioni di Xf in un alto numero di esemplari di ginestra (40%) conferma la loro suscettibilità alla sottospecie ST53 e si rivela come una delle specie più sensibili tra quelle esaminate. Al contrario, l'osservazione di un tasso di infezione basso in alaterno (15,38%), molto basso (<10%) in alloro, fillirea e mirto e nullo nel cisto di Creta indica un basso tasso di infettività di queste specie e una bassa performance come serbatoio di inoculo. I presenti risultati sono in linea con quanto esplicitato nel Bollettino Ufficiale della Regione Puglia n. 38 del 09/05/2024 inerente all'autorizzazione dell'impianto di piante specificate in zone infette (Reg. (UE) 2020/1201 - Disposizioni per l'applicazione degli artt. 18 e 23 del Reg. UE 2020/1201) che ha concesso in deroga l'impianto in zona infetta di altre due varietà di olivo (Lecciana e Leccio del Corno) e diverse specie ornamentali, tra cui alaterno, alloro, mirto e fillirea basandosi sui dati del monitoraggio nelle aree delimitate (contenimento e buffer). Di particolare interesse è il ritrovamento di 28 campioni di corbezzolo positivi a Xf, una specie non precedentemente riportata come ospite, per cui si è provveduto alla segnalazione al servizio fitosanitario regionale, riportato integralmente nell'Allegato. Inoltre, è stato effettuato l'isolamento in coltura pura sugli esemplari con maggior tasso di infezione, da cui si è osservata la formazione di colonie del batterio (Fig.). Questo risultato potrebbe rappresentare una nuova frontiera nella ricerca sugli ospiti di Xf e suggerisce la necessità di ampliare la lista delle piante monitorate per prevenire e contenere la diffusione del batterio in altri areali. La mancata individuazione di esemplari positivi in specie non ospiti di nessuna ST di Xf, ad eccezione del corbezzolo, ne conferma la loro immunità al batterio, seppur ulteriori campionamenti potrebbero essere necessari per conferme aggiuntive. Le prove di trasmissione hanno fornito ulteriori informazioni sulla capacità del batterio di infettare nuove specie. I risultati hanno mostrato che, nella maggior parte delle specie inoculate, il batterio non è riuscito ad insediarsi nell'ospite, tuttavia, è necessario attendere il termine della prova (1 anno dall'inoculazione) per poter validare il grado di immunità o suscettibilità. È importante notare che in lime, pompelmo e rovo non è sopravvissuto alcun insetto vettore, suggerendo che queste specie potrebbero contenere naturalmente dei composti tossici per la loro vitalità. Tuttavia, il 100% di piante positive inoculate con Xf di argan e jojoba suggerisce la possibilità considerare

anche queste specie come potenziali nuovi ospiti del ceppo ST53, considerando che i valori di Cq medi, confrontati con il controllo positivo (olivo), indicano una presenza abbondante del batterio, anche se non si stati riscontrati sintomi riconducibili all'infezione. Inoltre, per jojoba è stato avviato l'isolamento in coltura pura mentre per argan la prova di trasmissione con vettore, considerato il basso numero di piante inoculate e l'assenza di un controllo negativo nella prima prova, è stata successivamente ripetuta su un numero maggiore di piante. In conclusione, il presente studio conferma la sensibilità di alcune specie vegetali già note alla Xylella fastidiosa

subsp. pauca ST53, con una particolare evidenza alla ginestra come specie ad alto rischio. Inoltre, la scoperta del corbezzolo come nuovo ospite e la conferma della positività in argan e jojoba indicano che il panorama degli ospiti di Xf potrebbe essere anche più ampio di quanto precedentemente supposto. Anche per specie e colture alloctone che, anche alla luce delle esigenze di resistenza alla siccità, sostenibilità e cambiamenti climatici, vengono proposte per la prima introduzione in coltivazione nelle zone infette del Salento, risulta assolutamente essenziale verificare preliminarmente, anche su un numero sufficiente di varietà e piante, l'immunità e o la resistenza/tolleranza/suscettibilità. Va comunque ricordato come, pur in assenza di danni economici importanti come nel caso di specie tolleranti, lo stesso mantenimento in coltura di piante infette, costituendo un potenziale serbatoio di inoculo per vettori polifagi come Philaenus spumarius e Neophilaenus campestris, rappresenta un rischio per la diffusione passiva verso altri territori indenni nonché per trasmissione attiva a colture circostanti come lo stesso olivo seppur in presenza di varietà resistenti autorizzate all'impianto in zona infetta. Purtuttavia, ulteriori approfondimenti sperimentali sono necessari per confermare questi risultati e per osservare il comportamento delle specie non presenti sul territorio, non solo dal punto di vista epidemiologico ma anche per valutare le loro performance agronomico-produttive nell'ottica di fornire nuove informazioni sperimentali per la rigenerazione del panorama agricolo salentino in convivenza con l'epidemia di Xylella fastidiosa.

Task Leader e responsabile UR CNR
Pierfederico La Notte