STUDI PRELIMINARI SUL CONTENIMENTO DEL DISSECCAMENTO RAPIDO DELL'OLIVO (CODIRO) CAUSATO DA *XYLELLA FASTIDIOSA* MEDIANTE INIEZIONI ENDOTERAPICHE CON ESTRATTO DI *PUNICA GRANATUM*

D. RONGAI[1], N. SABATINI[2], C. DI MARCO[2]
[1]Centro di ricerca Difesa e Certificazione, via C.G Bertero, 22 - 00156 Roma, Italy
[2]Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari
ulteriore sede di servizio attiva di Pescara (PE)
domenico.rongai@crea.gov.it

RIASSUNTO

Il disseccamento rapido dell'olivo (CoDiRo), più recentemente Olive Quick Decline Syndrome (OQDS), è una malattia associata ad un batterio sistemico (*Xylella fastidiosa*) che colonizza i vasi xilematici dell'olivo ostruendoli ed impedendo il corretto flusso linfatico della pianta. Sono stati eseguiti trattamenti sui tronchi degli olivi affetti da CoDiRo con iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE) usando quattro differenti formulazioni di estratto di *Punica granatum*. Da un primo *screening* (aprile-novembre) è emerso che la gravità della malattia si è ridotta nelle piante trattate con EABM. Anche l'area della chioma delle piante trattate è risultata superiore rispetto a quella non trattata, a dimostrazione del progressivo miglioramento dello stato generale delle piante. Questi risultati preliminari sono stati promettenti, tuttavia, occorrerà proseguire la sperimentazione per un periodo più lungo. Sono in programma, inoltre, test di biologia molecolare per accertare la presenza e la carica batterica nelle piante trattate e non.
Parole chiave: OQDS, trattamenti endoterapici, attività antibatterica, estratto vegetale

SUMMARY

PRELIMINARY STUDIES TO CONTROL OLIVE QUICK DECLINE SYNDROME (OQDS) CAUSED BY *XYLELLA FASTIDIOSA* BY ENDOTHERAPY TREATMENTS WITH *PUNICA GRANATUM* EXTRACT

CoDiRo, more recently, Olive Quick Decline Syndrome (OQDS), is a disease associated with a systemic bacterium (*Xylella fastidiosa*) that colonizes xylem tissues of the olive trees by obstructing them and preventing the lymphatic flow of the plant. Endotherapy treatments on infected olive trees using 4 different punica granatum doses, were performed. From a first screening (April-November), it emerged that the disease severity decreased in plants treated with EABM. In addition, the area of the canopy, calculated by image analysis, was greater in treated plants than in untreated ones, demonstrating the progressive improvement of their general conditions. These preliminary results were promising, however, it will be necessary to continue the experiment for a longer period of time. Molecular biology tests to assess the presence and the bacterial load in treated and non treated plants are also planned.
Keywords: OQDS, endotherapy treatments, antibacterial activity, plant extract

INTRODUZIONE

Il complesso del disseccamento rapido dell'olivo (CoDiRO), più recentemente Olive Quick Decline Syndrome (OQDS), è una malattia associata a un batterio sistemico, *Xylella fastidiosa* subsp *pauca* (ceppo CoDiRO) che colonizza i vasi xilematici ostruendoli e impedendo il corretto flusso linfatico della pianta. Nell'area mediterranea il batterio si è manifestato la prima volta in Turchia nel 2005 su piante di mandorlo, mentre in Puglia la *Xylella* è stata identificata nel 2013 su piante di olivo (*Olea europaea* L.) (Saponari et al., 2013). I sintomi

sono bruscature fogliari e disseccamenti dei rametti, imbrunimento del sistema vascolare e progressivo deperimento e morte della pianta. La distribuzione dei seccumi è a caso anche se inizialmente la malattia si manifesta nei palchi superiori. Il CoDiRo si manifesta più gravemente sugli olivi vecchi e grandi mentre sulle piante giovani la malattia appare più tardivamente e con sintomi più blandi. Il vettore maggiormente responsabile alla diffusione del OQDS è *Philaenus spumarius* (Cornara et al., 2016). Le larve della cicalina vivono su dicotiledoni erbacee (non infette) alla base degli ulivi e si spostano su questi ultimi durante la fase adulta dove acquisiscono il batterio. Da maggio in poi la sputacchina visita altre piante di olivo provocando nuove infezioni e quindi la diffusione della malattia. Diminuire il numero di insetti vettori e di piante infette è di importanza cruciale per contenere l'infezione. Non essendoci metodi di lotta curativi per le piante infette, è fondamentale attuare interventi preventivi per contenere la diffusione del batterio. Queste includono: trattamenti insetticidi contro *P. spumarius*; interventi agrotecnici contro gli stadi giovanili del vettore e contro le erbe infestanti; eliminazione delle piante ospiti presenti su strade, fossi, canali e aree verdi; monitoraggio della presenza di *Xylella* su piante ospiti.

Anche l'uso di varietà più tolleranti potrebbe essere secondo alcuni autori una strategia per convivere con la malattia. Prove sperimentali su "Cellina di Nardò" e "Ogliarola di Lecce" hanno fatto registrare un indice di severità della malattia di tre volte superiore rispetto alle cv Frantoio e Leccino (Luvisi et al., 2017). Secondo questi autori, la maggiore resistenza di "Frantoio" e "Leccino" è associata a una maggiore concentrazione del glucoside idrossitirosolo rispetto alle cv Cellina di Nardò e Ogliarola di Lecce.

Riguardo agli interventi diretti sulle piante infette dal batterio vi sono diverse strategie. Il ricorso a ceppi attenuati del batterio riduce l'effetto dei ceppi virulenti ed evitano l'insorgenza della malattia, anche se risulta pericoloso perché favorisce l'origine di nuovi ceppi (Hopkins e Purcell, 2002). Più recentemente, alcuni autori sostengono che formulati a base di rame e zinco in combinazione con cure agronomiche adatte, hanno portato a un maggior vigore vegetativo delle piante di olivo infette, ma non all'eliminazione dei batteri, che persistono nella pianta anche dopo i trattamenti. Su piante di arancio trattate con N-Acetylcisteina (NAC) si è evidenziata una riduzione del biofilm e di EPS, e quindi una remissione dei sintomi associata a una riduzione del titolo batterico (Muranaka et al., 2013; De Souza et al., 2014).

L'obiettivo di questa ricerca è stato di verificare l'efficacia di un estratto, ottenuto dalla buccia del melograno, su piante di olivo malate di OQDS. Il melograno (*Punica granatum*) è molto ricco di composti bioattivi (Rongai et al., 2015), e la sua attività antibatterica è stata testata *in vitro* su alcuni fitobatteri (Devatkal et al., 2013; Rongai et al., 2016). Nel presente lavoro, gli ulivi infetti da *X. fastidiosa*, sono stati trattati con iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE), utilizzando un estratto acquoso della buccia di melograno (*P. granatum*). Sono riportati i risultati preliminari della sperimentazione eseguita nel Salento a partire da aprile 2016.

MATERIALI E METODI

E' stato utilizzato un estratto ottenuto dalla buccia del melograno (*Punica granatum* varietà dente di cavallo) secondo la metodica descritta da Rongai et al. (2017). Per i trattamenti endoterapici sono stati usati: un estratto acquoso della buccia di melograno (EABM) alla concentrazione del 1,65 e 3,3%; e un estratto idroalcolico della buccia di melograno (EIBM) alla concentrazione del 2,12 e 4,25%.

Le prove sono state eseguite su piante malate certificate di circa 30 anni situate a Trepuzzi (LE) (figura 1). Sono stati fatti quattro trattamenti: 27 aprile, 30 giugno, 5 ottobre e 24 novembre 2016. Sono state utilizzate 45 piante (9 piante per 4 tesi) più una tesi testimone. I

trattamenti con iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE) sono stati eseguiti applicando su ogni tronco capsule "ArboCap" da 30 mL ad una altezza di 80 cm e disposte in una corona circolare distanziate tra loro di 20-30 cm (figura 2). Tesi A (EIBM alla concentrazione del 2,125%); tesi B (EIBM 4,25%); tesi C (EABM 1,65%); tesi D (EABM 3,3%). Oltre alle iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE), sono stati eseguiti anche trattamenti sulla chioma utilizzando il prodotto alla concentrazione del 2%. L'esecuzione del trattamento è stata fatta con una pompa a spalla, nebulizzando una quantità di prodotto fino al gocciolamento della pianta.

In concomitanza dei trattamenti, sono stati eseguiti i rilievi (4, da aprile a novembre) e l'andamento della malattia è stata determinata sia con la produzione di foto dell'intera pianta, sia con osservazioni visive dei sintomi. Le foto sono state eseguite ogni volta dalla stessa posizione e nella stessa ora del giorno e successivamente elaborate con il software "Photoshop CS5" che ha trasformato le immagini in una scala di grigi con un preciso valore numerico. La severità della malattia è stata invece stimata con osservazioni visive della chioma divisa in una porzione apicale e una basale e suddivisa in quattro sub porzioni sulla base dei punti cardinali. E' stata adottata la seguente scala della severità (Luvisi et al., 2017): 0 = assenza di sintomi; 1 = foglie con bruscature su pochi rametti o poche branche disseccate; 2 = foglie con bruscature che interessano molte branche o il disseccamento interessa una ampia porzione della chioma; 3 = chioma con branche disseccate distribuite in modo uniforme.

I dati numerici delle immagini e quelli dei rilievi sono stati poi sottoposti ad analisi della varianza Anova e i valori medi sono stati confrontati con Fisher's protected LSD test a $p \leq 0,05$. Photoshop CS5 versione 12.0.0.0 è stato usato per elaborare le immagini delle piante. I progammi SigmaPlot versione SPW10 e Sigma Stat versione 3.5 sono stati utilizzati per l'analisi statistica e la creazione dei grafici.

RISULTATI

Da questi risultati preliminari si evidenzia che sugli ulivi colpiti da OQDS, le iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE) a base di estratto della buccia di melograno hanno fatto registrare un miglioramento dello stato generale in tutte le piante trattate. Anche alla dose più bassa di EABM la severità della malattia media è passata da 63% del mese di aprile al 56% di novembre. Alla percentuale del 3,3 lo stesso estratto ha portato miglioramenti facendo regredire la severità della malattia dal 73 al 60%, valori statisticamente differenti. I risultati non sono stati diversi quando è stato iniettato l'estratto idroalcolico (EIBM). In queste piante la severità della malattia è passata dal 61 al 47%, dato significativamente differente e producendo anche qui un netto miglioramento dello stato generale delle piante. Nello stesso arco di tempo nelle piante non trattate la malattia ha fatto registrare un peggioramento dello stato generale delle piante e la severità della malattia è passata dal 59 al 64% (figura 3).

Gli effetti dei trattamenti IFE con EABM e EIBM sono evidenziati anche dall'incremento della chioma. Le piante trattate con EABM alla concentrazione del 1,65 e 3,3% hanno mostrato un incremento dell'area della chioma pari a 6,34 e 8,82% rispettivamente; mentre in quelle trattate con EIBM alla dose di 2,125 e 4,25% l'incremento è stato del 8,75 e 10,84%. Al contrario, nelle piante non sottoposte a trattamenti IFE la superficie della chioma si è ridotta del 5,83%, a dimostrazione del progressivo peggioramento della malattia.

Figura 1. Planimetria AGEA per emergenza Xylella – Località Trepuzzi (Lecce)

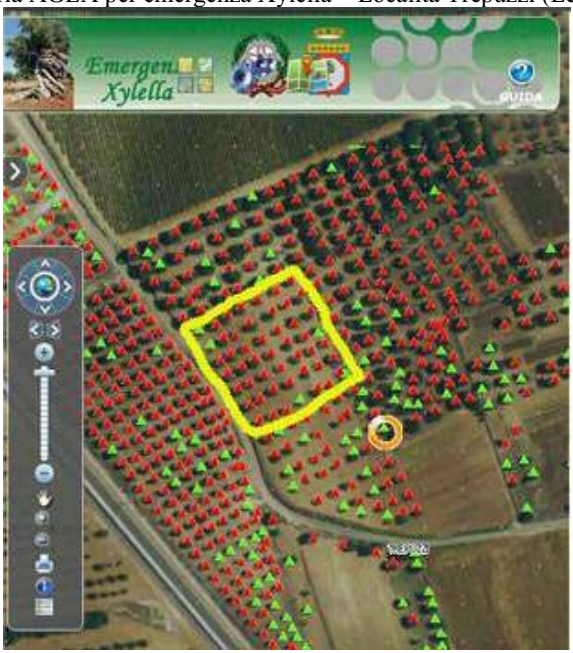


Figura 2. Trattamento con iniezioni fitosanitarie endoterapiche (FE) su tronchi di olivo in località Trepuzzi (LE).

Figura 3. Effetti dell'estratto acquoso della buccia di melograno (EABM) e dell'estratto idroalcolico della buccia di melograno (EIBM) sulla severità della malattia in percento su alberi di olivo situate in loc. Trepuzzi (LE). I valori con la stessa lettera all'interno della stessa tesi non sono significativamente differenti (LSD test, p≤ 0,05).

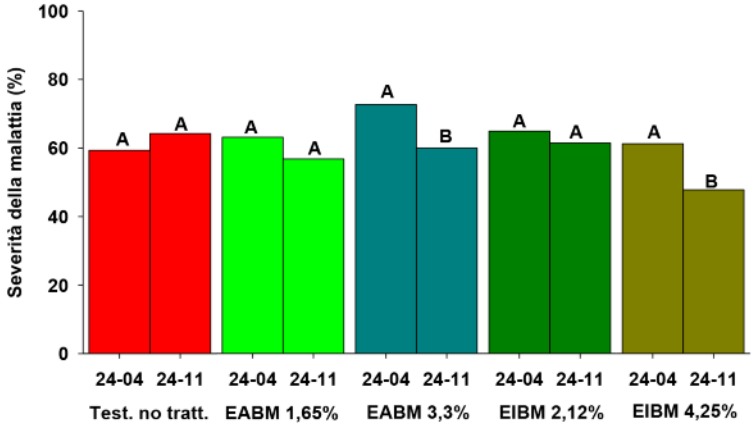
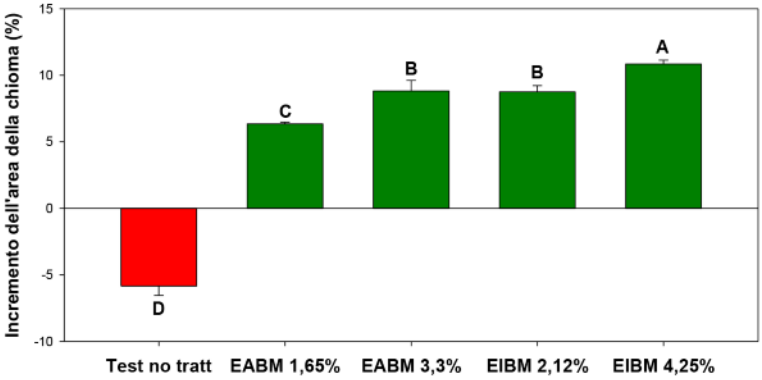


Figura 4. Incremento in percento dell'area della chioma di piante d'olivo dopo quattro trattamenti (da aprile 2016 a novembre 2016) con iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE) utilizzando un estratto acquoso della buccia di melograno (EABM) alla concentrazione del 1,65 e 3,3%; e un estratto idroalcolico della buccia di melograno (EIBM) alla concentrazione del 2,125 e 4,25%. I valori con la stessa lettera non sono significativamente differenti (LSD test, p≤ 0,05).



DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

La globalizzazione ha portato a una standardizzazione dei prodotti e a un aumento delle importazioni ed esportazioni con un maggior rischio di diffusione di agenti fitopatogeni. I rimedi suggeriti dalle direttive europee come l'eradicazione di piante infette produrrebbero in Puglia una serie di effetti negativi per il territorio sia da un punto di vista paesaggistico sia ambientale. Sarebbe auspicabile quindi adottare soluzioni alternative meno impattanti come la diffusione nell'ambiente di insetti antagonisti del vettore o fare trattamenti endoterapici a base di sostanze di origine vegetale come l'estratto della buccia di melograno. Quest'ultimo, utilizzato sia come soluzione acquosa (EABM) sia come soluzione idroalcolica (EIBM) ha portato ad un miglioramento complessivo della pianta dopo soli sette mesi dal primo trattamento, inoltre, si è evidenziato che tale miglioramento aumenta all'aumentare della dose. L'effetto sul batterio potrebbe essere dovuto al fatto che l'estratto testato ha un contenuto di polifenoli totali molto elevato (542 mg GAE/g DM) ancora più alto di quello osservato da Fawole et al., (2012), il cui valore era compreso tra 187,4 e 295,5 mg GAE/g DM. Un alto contenuto in polifenoli è spesso associato ad una intensa attività antimicrobica (Anis et al., 2012). I polifenoli, infatti, possono agire singolarmente o in combinazione interferendo con i processi vitali dei fitopatogeni alterandone la sintesi dei componenti della struttura influenzando così la permeabilità della membrana cellulare. Attraverso un approccio di chimica computazionale è stato dimostrato che la punicalagina (il principale polifenolo di EABM) e l'amfotericina B (AmB) sono caratterizzate da proprietà di interazione molecolare molto simili: come la abilità di formare pori nella membrana cellulare di *Botrytis cinerea* (Rongai et al., 2017). Per concludere, tenendo conto che alcuni composti fenolici (es. glucoside idrossitirosolo) hanno un importante ruolo nella inibizione dell'infezione da *X. fastidiosa* (Luvisi et al., 2017) e che la punicalagina contenuta in EABM è risultata attiva *in vitro* anche verso alcuni batteri (Rongai et al., 2016; Devatkal et al., 2013), si può ipotizzare che i trattamenti IFE su olivo affetti da OQDS possano in qualche modo influenzare l'attività del batterio, ostacolando la colonizzazione dei vasi e la migrazione delle cellule batteriche da un vaso all'altro condizione fondamentale per la sopravvivenza della *X. fastidiosa*. Questi preliminari risultati sono stati promettenti, tuttavia, occorrerà proseguire la sperimentazione per un periodo più lungo e su un numero maggiore di piante. Saranno inoltre eseguiti test di biologia molecolare su piante di olivo trattate e non, per verificare la presenza e la carica batterica nel tessuto xilematico.

LAVORI CITATI

Anis Z., Sulaiman O., Hashim R., Mehdi S.H., Ghalib R.M., Radical scavenging activity, total phenol content and antifungal activity of Cinnamomum iners Wood, 2012 Iranica J. Energy e Environ., 2012, 3, 74-78.

Cornara D., Saponari, M., Zeilinger A.R., De Stradis A., Boscia D., Loconsole G., Bosco D., Martelli G.P., Almeida R.P.P., Porcelli F., (2016). Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy. Journal of Pest Science 90, 521–530.

De Souza A.A., Cris-tofani-Yaly M., Della Coletta-Filho H., Machado M.A., (2014). Some approaches aiming at citus variegated chlorosis control in Brasil. Oral presentation. International symposium on the european outbreak of Xylella fastidiosa in olive. Journal of Plant Pathology, 96 (4, Supplement), 98-99.

Devatkal S.K., Jaiswal P., Jha S.N., Bharadwaj R., Viswas K.N., (2013). Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against Pseudomonas stutzeri isolated from poultry meat. J Food Sci Technol., 50(3), 555–560.

Fawole O. A., Makunga N. P., Opara U. L., (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 1-11

Hopkins D.L., Purcell A.H., (2002). *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease*, 86, 1056

Luvisi A., Aprile A., Sabella E., Vergine M., Nicolì F., Nutricati E., Miceli A., Negro C., De Bellis L., (2017). Xylella fastidiosa subsp. Pauca (CoDiRO strain) infection in four olive (Olea europea L.) cultivars: profile of phenolic compounds in leaves and progression of leaf scorch symptoms. *Phytopathologia Mediterranea*, (56), 2, 259-273.

Muranaka L.S., Giorgiano T.E., Takita M.A., Forim M.R., Silva L.F.C., Coletta-Filho H.D., Machado M.A., de Souza A.A., (2013). N-acetylcysteine in agriculture, a novel use of an old molecule: focus on controlling the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. PLoS ONE 8 doi:10.1128.

Rongai D., Pulcini P., Pesce B., Milano, F., (2015) Antifungal activity of some botanical extracts on Fusarium oxysporum. Open Life Sciences (previously Central European Journal of Biology) 10, 409–416;

Rongai D., Pulcini P., Pesce B., Milano F., (2017). Antifungal activity of pomegranate peel extract against fusarium wilt of tomato. European Journal of Plant Pathology 147, 229-238.

Saponari M., Boscia D., Nigro F., Martelli G.P., (2013). Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *Journal of Plant Pathology* 95, 668.