

ULTERIORI STUDI SUL CONTENIMENTO DELL'OLIVE QUICK DECLINE SYNDROME (OQDS) TRAMITE TRATTAMENTI ENDOTERAPICI CON ESTRATTO DI MELOGRANO

D. RONGAI¹, P. PULCINI², G. DI LERNIA², P. NOTA², F. MILANO², C. DI MARCO¹

¹CREA-IT PE Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, C.da Bucceri Cepagatti, Pescara.

²CREA-DC Centro di ricerca Difesa e Certificazione, via C.G Bertero, 22 - 00156 Roma
domenico.rongai@crea.gov.it

RIASSUNTO

L'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. Dopo gli anni 2016 e 2017, sono proseguite le ricerche anche negli anni 2018 e 2019 con trattamenti sui tronchi degli olivi affetti dalla batteriosi impiegando l'estratto idroalcolico ottenuto dalle bucce del frutto di melograno (*Punica granatum*). Come già osservato negli anni 2016 e 2017, anche dai rilievi eseguiti tra maggio 2018 e maggio 2019, è emerso un generale miglioramento delle piante trattate. La gravità della malattia si è ridotta, mentre l'area della chioma delle piante trattate è risultata superiore rispetto a quella degli olivi non trattati. Questa ricerca, data l'importanza della malattia, dovrà necessariamente proseguire anche per gli anni successivi. Sono in corso, inoltre, test di biologia molecolare per accertare la presenza e la carica batterica nelle piante trattate e non.

Parole chiave: attività antibatterica, estratto vegetale, *Punica granatum*, *Xylella fastidiosa*

SUMMARY

FURTHER STUDIES ON CONTROL OF THE OLIVE QUICK DECLINE SYNDROME (OQDS) BY ENDOTHERAPIC TREATMENTS WITH POMEGRANATE EXTRACT

The Olive Quick Decline Syndrome (OQDS) is a disease associated with a systemic bacterium (*Xylella fastidiosa*) that colonizes the xylem tissues of the olive trees by blocking them and preventing the correct lymphatic flow of the plant. After the years 2016 and 2017, research continued also in the years 2018 and 2019 with treatments on olive trees affected by bacteriosis using the hydroalcoholic extract obtained from *Punica granatum* fruit peel. As already observed in the years 2016 and 2017, the research carried out between May 2018 and May 2019 showed a general improvement of the treated plants. The severity of the disease was reduced, while the area of the canopy of the treated plants was higher than that of the untreated olive trees. Since the OQDS disease is extremely serious, the experiment must continue for another extended period. Molecular biology tests to assess the presence and the bacterial load in treated and untreated plants are also planned.

Keywords: antibacterial activity, plant extract, *Punica granatum*, *Xylella fastidiosa*

INTRODUZIONE

L'Olive Quick Decline Syndrome (OQDS), è una malattia associata ad un batterio sistemico (*Xylella fastidiosa* subsp *pauc* "salentina") che colonizza i vasi xilematici ostruendoli ed impedendo il corretto flusso linfatico della pianta. L'origine del batterio è l'America Centrale, poi diffuso in tutta la zona occidentale del continente americano, dall'Argentina al Canada. Nel bacino del mediterraneo il batterio si è manifestato la prima volta (senza però essere stato confermato) su una vite in Cossovo nel 1998 e su piante di mandorlo in Turchia nel 2005, mentre in Puglia *Xylella* è stata identificata nel 2013 su piante di olivo (*Olea europaea* L.) (Saponari et al., 2013). Dopo il Salento, altri casi di sottospecie diverse di *Xylella* si sono

osservate in Italia (Toscana) e in Francia (Corsica e Provenza). Probabilmente la sua diffusione in Europa è dovuta al commercio nel settore vivaistico di piante ornamentali che dal Centro America arrivano nei porti europei. Ad oggi l'area complessivamente interessata ha raggiunto un'estensione di circa 750 mila ettari, a fronte degli 8.000 originariamente interessati dal fenomeno. Il contagio, partito dalla provincia di Lecce, copre gran parte della provincia di Brindisi e, all'inizio del 2018, i confini della provincia di Bari. Peraltro, si è resa necessaria una nuova demarcazione della zona infetta con uno spostamento di circa 20 chilometri verso nord. Il OQDS colpisce tutti gli olivi indipendentemente dall'età della pianta e dalla varietà. Tuttavia, sugli olivi vecchi e grandi delle varietà Ogliarola salentina e Cellina di Nardò, diffusissime nel Salento, la malattia si manifesta in modo particolarmente grave. 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. Questi disseccamenti hanno interferito profondamente sulla produzione di olio in questa zona, la Coldiretti ha stimato che il danno causato dal batterio da ottobre 2013 a gennaio 2019 assommi a circa 1,2 miliardi di euro.

Il vettore maggiormente responsabile alla diffusione del OQDS è la sputacchina (*Philaenus spumarius* L), un insetto xilemofilo appartenente alla famiglia delle Aphrophoridae (Cornara et al., 2016). Le larve vivono su dicotiledoni erbacei (non infette) alla base degli olivi e si spostano su questi ultimi durante la fase adulta dove acquisiscono il batterio. Da maggio in poi la sputacchina visita altre piante di ulivo provocando nuove infezioni e quindi la diffusione della malattia.

Non essendoci metodi di lotta curativi è di estrema importanza diminuire il numero di insetti vettori e di piante infette. Indispensabili sono i trattamenti insetticidi contro *P. spumarius*, gli interventi agrotecnici contro le erbe infestanti, l'eliminazione delle piante ospiti presenti su strade, fossi, canali e il monitoraggio della presenza di *Xylella* su piante ospiti. Secondo Luvisi et al. (2017), l'uso di varietà tolleranti potrebbe essere una valida strategia, prove sperimentali su Cellina di Nardò e Ogliarola di Lecce hanno fatto registrare un indice di severità della malattia di 3 volte superiore rispetto alle cv Frantoio e Leccino. La maggiore tolleranza di queste ultime pare sia associata ad una maggiore concentrazione dell'idrossitirosole glucoside. 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 evita l'insorgenza della malattia, anche se risulta pericoloso perché favorisce l'origine di nuovi ceppi (Hopkins e Purcell, 2002). Alcuni autori sostengono che formulati a base di rame e zinco in combinazione con cure agronomiche adatte, hanno portato ad un maggior vigore vegetativo delle piante di ulivo infette, ma non all'eliminazione dei batteri che persistono nella pianta anche dopo i trattamenti. Su piante di arancio trattate con N-Acetilcisteina (NAC) si è evidenziata una riduzione del biofilm e di EPS, e quindi una remissione dei sintomi associata ad una riduzione del titolo batterico (Muranaka et al., 2013; De Souza et al., 2014).

Nel biennio 2016-2017, ulivi affetti da OQDS e trattati con iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE) a base di estratto della buccia di melograno hanno fatto registrare un maggiore rigoglio vegetativo e un miglioramento del loro stato generale. Pianta trattate alla dose del 4,25% hanno registrato una riduzione della severità della malattia dal 61 al 47%, nello stesso arco di tempo nelle piante non trattate si è registrato un aumento della severità della malattia dal 59 al 64%. Gli effetti dei trattamenti sono stati evidenziati anche dall'incremento della chioma con un aumento di circa il 10%. Al contrario, nelle piante non trattate la superficie si è ridotta del 6%, a dimostrazione del progressivo peggioramento della malattia (Rongai et al., 2018).

Con il presente lavoro si è continuata la sperimentazione nella medesima azienda salentina anche negli anni 2018 e 2019, e qui sono riportati i risultati dei trattamenti eseguiti a partire da maggio 2018.

MATERIALI E METODI

Frutti di *Punica granatum* cv dente di cavallo, sono stati usati per ottenere un estratto idroalcolico della buccia di melograno (EIBM) secondo la metodica descritta da Rongai et al. (2017). Per le prove sono state utilizzate piante malate certificate di circa 30 anni appartenenti ad una azienda di Trepuzzi (LE). Sono stati fatti 4 trattamenti nel 2018 (9/5; 13/6; 16/10; 28/11) e 2 nel 2019 (8/5; 5/6). Sono state utilizzate 36 piante (9 piante per 3 tesi) più 1 tesi di controllo. Su ogni tronco sono state effettuate iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE) secondo quanto descritto da Rongai et al. (2018). Tesi A (EIBM alla concentrazione del 2,5%); tesi B (EIBM 5%); tesi C (EIBM 10%).

Contemporaneamente ai trattamenti sono stati eseguiti i rilievi e la severità della malattia è stata stimata con osservazioni visive della chioma divisa in una porzione apicale e una basale e suddivisa in quattro sub porzioni a seconda dei punti cardinali. È 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. Assieme ai rilievi sono state fatte foto dell'intera pianta le quali successivamente sono state elaborate con il software "Photoshop CS5" che ha trasformato le immagini in una scala di grigi con un preciso valore numerico (figura 1).

Figura 1. Pianta di olivo malata di OQDS fotografata nel maggio 2018 (A) e un anno dopo (B). Il software "Photoshop CS5" ha trasformato le immagini in una scala di grigi con un preciso valore numerico

A



B

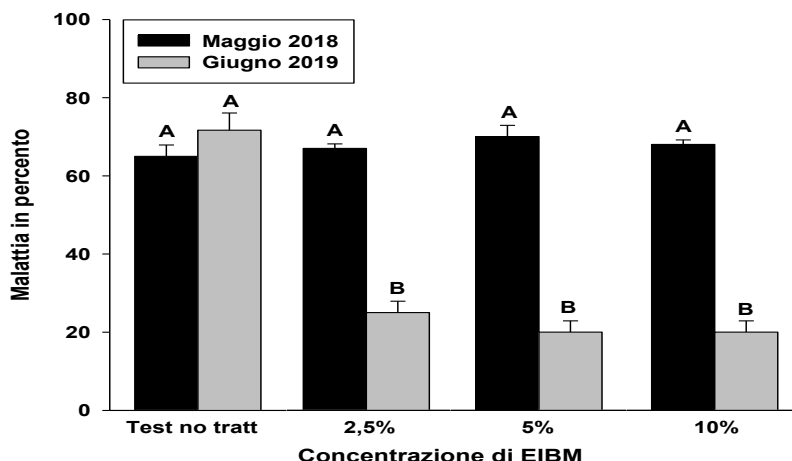


I dati numerici delle immagini e quelli dei rilievi sono stati poi sottoposti ad analisi della varianza Anova e i valori medi sono stati confrontati con Fisher's protected LSD test a $P \leq 0,05$. Photoshop CS5 versione 12.0.0.0 è stato usato per elaborare le immagini delle piante. I programmi SigmaPlot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

RISULTATI

Nel biennio 2018-2019 i risultati ottenuti con trattamenti a base di EIBM sugli olivi colpiti da OQDS, sono stati migliori di quelli osservati nel biennio 2016-2017. Alla dose del 2,5% la severità della malattia media è passata dal 67% del mese di maggio 2018 al 25% di giugno 2019. Alla concentrazione del 10% l'estratto ha portato miglioramenti facendo regredire la severità della malattia dal 68 al 19%. Nello stesso periodo le piante non trattate hanno fatto registrare un aumento della severità della malattia la quale è passata dal 65% di maggio 2018 al 71% di giugno 2019 (figura 2).

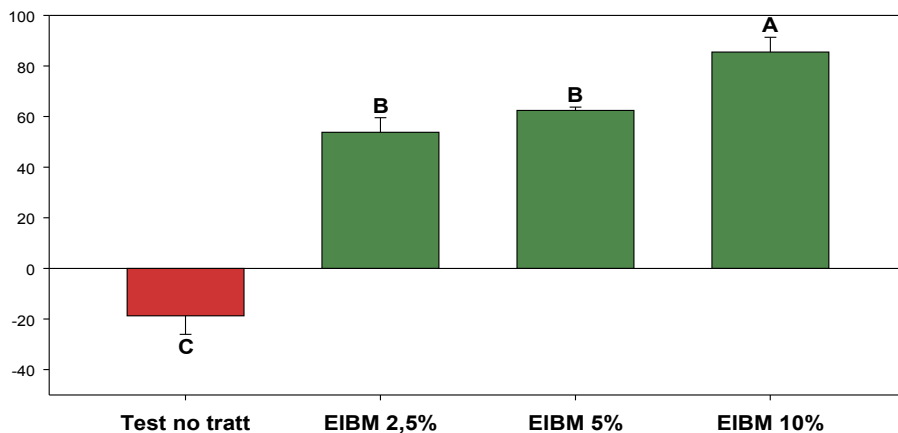
Figura 2. Effetti dell'estratto idroalcolico della buccia di melograno (EIBM) sulla severità della malattia in percento su alberi di olivo di una azienda di Trepuzzi (LE). I valori con la stessa lettera all'interno della stessa tesi non sono significativamente differenti (LSD test, P



Riguardo all'incremento della chioma, le piante trattate con EIBM alla concentrazione del 2,5% e 5% hanno mostrato un incremento dell'area della chioma pari al 53 e 62%, rispettivamente; mentre in quelle trattate con la dose del 10% l'incremento è stato del 85% (figura 3).

All'opposto, nelle piante non sottoposte a trattamenti la superficie della chioma si è ridotta del 18%, con un evidente peggioramento delle condizioni generali degli olivi.

Figura 3. Incremento in percento dell'area della chioma di piante d'olivo dopo 6 trattamenti (da maggio 2018 a giugno 2019) con iniezioni fitosanitarie endoterapiche (IFE) utilizzando un estratto idroalcolico della buccia di melograno (EIBM) alla concentrazione del 2,5; 5 e 10%. I



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'arrivo, poco gradito, della *Xylella fastidiosa* nella zona di Gallipoli in provincia di Lecce, è probabilmente avvenuto tra il 2008 e il 2010. Agli inizi si pensava fosse dovuto a violenti attacchi della lebbra delle olive, inquinamento della falda acquifera, cattive pratiche agronomiche, marciume radicale, forti attacchi del rodilegno giallo ecc. Quando nell'estate 2013 fu identificato come causa della malattia il batterio Xf, esso si era già diffuso su una superficie di oltre 8.000 ha. Le direttive europee come l'eradicazione di tutte le piante infette hanno trovato in Puglia una forte opposizione poiché altamente impattante sul territorio sia da un punto di vista socioeconomico sia paesaggistico-ambientale.

Soluzioni alternative meno impattanti come l'uso di cultivar più tolleranti quali Leccino, Frantoio e Coratina, trattamenti a base di N-acetil cisteina (un fluidificante del biofilm del batterio), o la somministrazione di prodotti di varia natura da soli o in combinazione, hanno fornito una positiva risposta vegetativa delle piante trattate anche se non si è riscontrato un effetto battericida (Martelli, 2016).

Trattamenti endoterapici con l'estratto della buccia di melograno eseguiti nella presente sperimentazione, hanno portato ad un miglioramento complessivo della pianta sia durante le prove eseguite nel 2016-2017 (Rongai et al., 2018) sia in quelle ripetute nel 2018-2019. La buona efficacia dell'estratto testato pare sia dovuta al suo alto contenuto in polifenoli totali, i quali sono spesso associati ad una intensa attività antimicrobica (Anis et al., 2012). Tenendo conto poi che alcuni composti fenolici (es. idrossitirosolo glucoside) sono coinvolti nella inibizione dell'infezione da *X. fastidiosa* (Luvisi et al., 2017) e che l'estratto idroalcolico della buccia di melograno (EIBM) è risultato attivo *in vitro* anche verso alcuni batteri (Rongai et al., 2016; Devatkal et al., 2013), è ragionevole credere che tali trattamenti endoterapici possano in qualche modo ostacolare la colonizzazione dei vasi xilematici e quindi la sopravvivenza di *X. fastidiosa*.

Tali risultati pur promettenti presentano delle criticità poiché i trattamenti IFE sono costosi e poco pratici per un numero elevato di piante ed inoltre praticare fori sul tronco degli olivi può

causare infezioni alla pianta. Per ovviare a questi problemi si sta studiando una speciale formulazione dell'estratto in modo da poterlo utilizzare per assorbimento radicale o fogliare. I risultati fin qui ottenuti sono stati promettenti, occorre ora testare la nuova formulazione dell'estratto con trattamenti non più endoterapici ma attraverso la semplice irrigazione o con irrorazione della chioma.

Test di biologia molecolare saranno inoltre effettuati per accertare la carica batterica nel tessuto xilematico.

LAVORI CITATI

- Anis Z., Sulaiman O., Hashim R., Mehdi S.H., Ghalib R.M., 2012. Radical scavenging activity, total phenol content and antifungal activity of *Cinnamomum Iners*. *Iranica Journal of Energy & Environment*, 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), 98-99.
- 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., Nicoli 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.
- Martelli G., 2016. Il punto su *Xylella fastidiosa* e disseccamento rapido dell'olivo. *L'informatore agrario* 24, 40-46.
- 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., Pucci N., 2016. Esperienze preliminari sul contenimento di alcuni batteri fitopatogeni attraverso l'estratto di *Punica granatum*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 311-314.
- 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.
- Rongai D., Sabatini N., Di Marco C., 2018. Studi preliminari sul contenimento del disseccamento rapido dell'olivo (CODIRO) causato da *Xylella fastidiosa* mediante iniezioni endoterapiche con estratto di *Punica granatum*. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 303-310.
- 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.