

Studi preliminari su alcune alterazioni fisiologiche in olivi colpiti da Co.Di.R.O.

G.L. BRUNO, C. CARIDDI, V. TINELLI, M. SANTAMARIA, F. TOMMASI

Riassunto - Il presente lavoro raccoglie dati preliminari su alcune alterazioni fisiologiche rilevate nelle piante di olivo affette da Co.Di.R.O. (Complesso del disseccamento rapido dell'olivo, malattia rinominata "Sindrome del Disseccamento Rapido dell'Olivo O.Q.D.S.: dall'inglese Olive Quick Decline Syndrome). Le piante affette sono caratterizzate dalla presenza di bruscatura (disseccamento della parte apicale e/o marginale) e seccumi di rami isolati, piccole branche o dell'intera chioma. Le foglie asintomatiche di piante con conclamati sintomi di malattia hanno mostrato, rispetto a quelle raccolte da piante sane, una riduzione (48%) del contenuto in fenoli e un incremento (3 volte) della capacità antiossidante. Danni alle membrane cellulari nei tessuti fogliari delle piante infette sono presumibili dai valori di malondialdeide (incrementi di circa 6 volte), proporzionale al grado di perossidazione lipidica, e comprovati da una perdita di elettroliti intorno al 60%.

Parole chiave: Co.Di.R.O., olivo, *Xylella fastidiosa*

Introduzione

Nel 2013 il Servizio Fitosanitario della regione Puglia, con il supporto dell'Università degli Studi di Bari e dell'Istituto di Virologia Vegetale del CNR-UOS Bari, segnala il "Complesso del disseccamento rapido dell'olivo" (indicato con l'acronimo Co.Di.R.O.). È una malattia che colpisce le piante di olivo (*Olea europaea* L.) coltivate in una zona a sud di Gallipoli (Provincia di Lecce). Le piante di olivo colpite sono caratterizzate dalla presenza di bruscatura (disseccamento della parte apicale e/o marginale) e seccumi di rami isolati, piccole branche e/o dell'intera chioma. Il legno dei rami più giovani, delle branche e del fusto di queste piante mostra estesi imbrunimenti. Le piante affette da Co.Di.R.O. denotano la contemporanea presenza di: i) gallerie scavate dalle larve del lepidottero *Zeuzera pyrina* L.; ii) necrosi dell'alburno associate alla presenza di specie diverse di funghi lignicoli vascolari dei generi *Phaeoacremonium*, *Neofusicoccum*, *Pleurostomophora*, *Phaeoconiella*, ben noti agenti di phaeotracheomicosi su olivo, vite e altre piante arboree; e iii) *Xylella fastidiosa* Wells et al. (Nigro et al. 2013, 2014, Carlucci et al. 2013, Saponari et al. 2013). *X. fastidiosa* è un batterio gram-negativo non sporigeno appartenente alla famiglia delle Xanthomonadaceae, a localizzazione vascolare, incluso nella lista degli organismi di quarantena per l'Unione europea (allegato I AI della Direttiva del 2000/29/CE). La malattia è stata poi rinominata "Sindrome del Disseccamento Rapido dell'Olivo" (O.Q.D.S.: dall'inglese Olive Quick Decline Syndrome) grazie ad osservazioni più estese che indicano in *X. fastidiosa* l'unico responsabile della fitopatia (Martelli et al. 2016). È stato anche accertato che il ceppo salentino di *X. fastidiosa* (ceppo Co.Di.R.O.) appartiene alla sottospecie *pauca*, ma rappresenta una variante apparentemente identica a un ceppo del Costa Rica (Loconsole et al. 2014, Giampetruzzi et al. 2015). Oltre all'olivo, come riportato nella decisione di Esecuzione UE 2015/789 della Commissione del 18 maggio 2015 (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, n. L 125 del 21 maggio 2015), sono sensibili al ceppo Co.Di.R.O. di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* anche *Nerium oleander* L., *Polygala myrtifolia* L., *Prunus avium* L. e *P. dulcis* (Mill.) D.A.Webb, *Catharanthus rosea* (L.) G.Don, *Acacia saligna* (Labill.) H. L. Wendl., *Spartium junceum* L., *Westringia fruticosa* (Willd.) Druce e *W. glabra* R.Br., *Rosmarinus officinalis* L., *Myrtus communis* L., *Rhamnus alaternus* L., *Vinca* spp., *Grevillea juniperina* R.Br., *Cistus creticus* L., *Euphorbia terracina* L., *Asparagus acutifolius* L. Insetto vettore di questo batterio, negli areali salentini, è *Phylloxera spumarius* L. (Cornara et al. 2014, 2016).

Il presente lavoro raccoglie dati preliminari su alcune alterazioni fisiologiche in piante di olivo affette da Co.Di.R.O.

Materiali e Metodi

Foglie sono state raccolte da piante di Ogliarola in un oliveto (210 piante) ubicato in provincia di Lecce. Sono state selezionate 50 piante con evidenti sintomi di Co.Di.R.O. Per ciascuna pianta sono state raccolte 150 foglie scelte a caso tra quelle asintomatiche presenti. Nelle foglie raccolte è stato determinato il contenuto in fenoli totali (Buono et al. 2009), la capacità antiossidante (Miller, Rice-Evans 1997) e l'integrità delle membrane. Per valutare quest'ultimo parametro è stato misurato il livello di perossidazione dei lipidi di membrana (Heath, Packer, 1968) e la perdita di elettroliti (Bajji et al. 2002). Le foglie delle tesi di controllo sono state raccolte da piante asintomatiche sane della stessa cultivar coltivate in aree non infette della stessa provincia. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA). Le medie sono state separate con il test della minima differenza significativa (MDS) di Dunnett per $P=0,05$.

Risultati e Discussione

Una definizione tradizionale di malattia considera la pianta malata quando le attività delle sue cellule sono al-

terate, distrutte o inibite, funzionano male o muoiono. Se le alterazioni coinvolgono poche cellule, sono invisibili, ma nel tempo producono cambiamenti visibili: i sintomi della malattia. La pianta non subisce in modo passivo l'azione dell'organismo patogeno, ma tende a reagire, a riportare verso la normalità il processo o la funzione alterata. Infatti, nel *vis-a-vis* con un generico organismo patogeno, le piante si difendono mettendo in essere strategie e tattiche diverse. Le difese delle piante possono essere di tipo passivo (costitutive o preformate) o attivo (indotte). Le difese costitutive sono rappresentate da barriere strutturali o chimiche preformate per le quali l'organismo vegetale non impiega alcuna risorsa energetica, mentre quelle attive includono barriere, strutturali o chimiche, che la pianta mette in atto dopo aver riconosciuto il patogeno. Tra le difese costitutive di tipo chimico sono inclusi metaboliti secondari e composti con attività biocida. In questo caso la resistenza è dovuta all'effetto antimicrobico di sostanze fenoliche, tannini, dieni, glucosidi fenolici e cianogenici, lattoni insaturi, composti solforati e glucosinolati che si comportano da inibitori presenti nelle cellule vegetali prima dell'avvio del processo infettivo da parte del patogeno. La secrezione e l'accumulo di composti che compaiono dopo l'attacco del patogeno, rappresentano la base della resistenza biochimica post-infezionale. Fenoli, fitoalessine, specie reattive dell'ossigeno (SRO), proteine correlate alla patogenicità (PR-proteins), inibitori di proteasi, sono alcuni esempi di molecole coinvolte nelle difese biochimiche post-infezionali e che rendono i meccanismi di difesa delle piante contro i patogeni un processo molto complesso (Prusky, Keen 1993, Grayer, Harborne 1994, De Gara et al. 2003, Agrios 2005). Nel progredire del processo infettivo, alterazioni della permeabilità delle membrane plasmatiche sono spesso la causa/effetto di necrosi cellulare.

In quest'ottica si colloca lo studio da noi intrapreso sulle piante di olivo affette da Co.Di.R.O. Particolare enfasi è stata data ad alcuni parametri fisiologici che subiscono alterazioni nelle varie fasi dell'interazione pianta-patogeno dall'infezione fino alla malattia o alla resistenza. I dati ottenuti nelle diverse analisi hanno mostrato, per ciascuno dei parametri considerati, differenze statisticamente significative tra i valori ottenuti dalle foglie raccolte da piante sane e quelli ottenuti da foglie asintomatiche provenienti però da piante con evidenti e conclamati sintomi di Co.Di.R.O.

In generale, i processi infettivi determinano variazioni nel metabolismo della pianta ospite, attivandone linee metaboliche secondarie che portano alla sintesi e all'accumulo di composti di tipo fenolico (Baldacci, Locci 1965). L'olivo, pianta ricca in sostanze fenoliche, in particolare nelle foglie, accumula glicosidi iridoidi (oleuropeina, oleoside) e flavonoidi importanti nella difesa verso patogeni diversi (Baidez et al. 2007, Markakis et al. 2010). Nelle piante confrontate nel presente studio, il contenuto in fenoli (Fig. 1A) presenta una riduzione del 48% nelle foglie raccolte da piante infette rispetto a quelle sane. Anche in altri casi di interazioni pianta-patogeno in olivo sono riportate alterazioni del contenuto di fenoli. Riduzioni nel contenuto in fenoli sono state osservate infatti anche nelle foglie delle cv Leccino e Frantoio raccolte da piante inoculate con *Verticillium dahliae* Kleb., l'agente della verticilliosi, o provenienti da rametti trattati con frazioni fitotossiche purificate da colture dello stesso fungo (Bruno et al. 2015).

Alcune interazioni pianta-patogeno sono caratterizzate da variazioni nei sistemi antiossidanti. Tali sistemi, numerosi e diversificati nei diversi tessuti e compartimenti cellulari, insieme ai fenoli, sono considerati segnali coinvolti nelle risposte di difesa, talvolta avendo un ruolo nel ridurre lo sviluppo del patogeno (Baidez et al. 2007). Nelle prove qui presentate, il confronto della capacità antiossidante (Fig. 1B) chiaramente evidenzia un incremento di questo parametro nelle foglie raccolte da piante infette rispetto a quelle sane.

L'andamento del complesso malondialdeide - acido tiobarbiturico, proporzionale al grado di perossidazione lipidica (Fig. 1C), e le misure di conducibilità elettrica che hanno permesso il calcolo della perdita di elettroliti

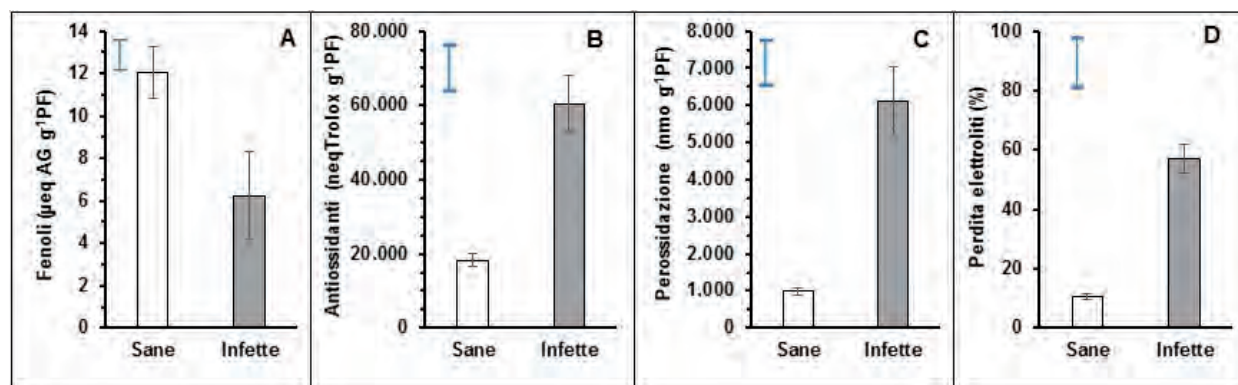


Fig. 1

Contenuto in fenoli totali (A), capacità antiossidante (B), perossidazione lipidica (C) e perdita di elettroliti (D) in foglie di *Olea europaea* cv *Ogliarola*. Ciascun valore rappresenta la media \pm ds. La barra verticale blu indica la MDS a $P=0,05$.

(Fig. 1D), evidenziano che le foglie delle piante di Ogliarola infette presentano danni alla permeabilità delle membrane cellulari cui consegue una loro non ottimale funzionalità.

Nelle piante malate, alterazioni della permeabilità cellulare per lesioni della struttura e della funzionalità delle membrane plasmatiche sono spesso indicative di necrosi in atto nelle cellule alterate (Durbin 1981, Agrios, 2005, Taiz, Zeiger 2010). La perdita di elettroliti è anche collegata all'azione di PR-proteine della famiglia PR-5 (proteine simili alla taumatina, TLPs dall'inglese Thaumatin-Like Protein). Infatti, esperienze con foglie di *Ara-bidopsis thaliana* (L.) Heynh., soia, riso, grano, tabacco, pomodoro, fagiolo e altre piante, evidenziano il rapido accumulo di TLPs a seguito di stress biotici e abiotici, indicando un loro ruolo nelle azioni di difesa (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

I dati qui presentati e discussi, seppur preliminari, dimostrano che nelle piante affette da Co.Di.R.O. sono presenti alterazioni metaboliche nelle foglie asintomatiche che potrebbero essere utilizzate come marker per la determinazione precoce nello sviluppo della malattia.

Letteratura citata

- Agrios GN (2005) Plant Pathology, 5th Ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Baidez AG, Gomez P, Del Rio JA, Ortuno A (2007) Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 3373-3377.
- Bajji M, Kinet JM, Lutts S (2002) The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. Plant Growth Regulation 36: 61-70.
- Baldacci E, Locci R (1965) Rassegna critica sulle sostanze fenoliche nella pianta come fattori di resistenza alle malattie. Rivista di Patologia Vegetale, Serie IV, 1(1-2): 5-32.
- Bruno GL, Triozzi M, Paradiso A, Tommasi F (2015) Alterazioni fisiologiche indotte da metaboliti secondari prodotti da *Verticillium dahliae* Kleb. in cultivar di olivo. In: Riunione Scientifica Annuale della Società Botanica italiana ONLUS - Sezione Pugliese Contributi scientifici. Informatore Botanico Italiano 47(2): 309-311.
- Buono V, Paradiso A, Serio F, Gonnella M, de Gara L, Santamaria P (2009) Tuber quality and nutritional components of early potato subjected to chemical haulm desiccation. Journal of Food Composition and Analysis 22: 556-562.
- Carlucci A, Raimondo ML, Cibelli F, Phillips AJL, Lops F (2013) *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. Phytopathologia Mediterranea 52: 517-527.
- Cornara D, Cavaliere V, Dongiovanni C, Altamura G, Palmisano F, Bosco D, Porcelli F, Almeida RPP, Saponari M (2016) Transmission of *Xylella fastidiosa* by naturally infected *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Aphrophoridae) to different host plants. Journal of Applied Entomology 141: 80-87.
- Cornara D, Loconsole G, Boscia D, De Stradis A, Yokomi RK, Bosco D, Porcelli F, Martelli GP, Saponari M (2014) Survey of *Auchenorrhyncha* in the Salento peninsula in search of putative vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* Co.Di.Ro strain. Journal of Plant Pathology 96: S4.97-S4.104.
- De Gara L, de Pinto MC, Tommasi F (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. Plant Physiology and Biochemistry 41: 863-870.
- Durbin RD (1981) Toxins in Plant Disease. Academic Press, New York.
- Giampetruzzi A, Chiumenti M, Saponari M, Donvito G, Italiano A, Loconsole G, Boscia D, Cariddi C, Martelli GP, Saldarelli P (2015) Draft genome sequence of the *Xylella fastidiosa* Co.Di.Ro strain. Genome Announcements 3: e01538-e01514. doi:10.1128/genomeA.01538-14.
- Grayer RJ, Harborne JB (1994) A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. Phytochemistry 37: 19-42.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.
- Hoffmann-Sommergruber K (2002) Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens K. Biochemical Society Transactions 30(6): 930-935.
- Loconsole G, Potere O, Boscia D, Altamura G, Djelouah K, Elbeaino T, Frasher D, Lorusso D, Palmisano F, Pollastro P, Silletti MR, Trisciuzzi N, Valentini F, Savino V, Saponari M (2014) Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by serological and molecular methods. Journal of Plant Pathology 96: 7-14.
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Paplomatas EJ, Tjamos EC (2010) Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. Plant disease 94(9): 1156-1162.
- Martelli GP, Boscia D, Porcelli F, Saponari M (2016) The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. European Journal of Plant Pathology 144: 235-243.
- Miller N, Rice-Evans C (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical action assay. Free Radical Research 26: 195-199.
- Nigro F, Antelmi I, Ippolito A (2014) Identification and characterization of fungal species associated with the Quick Decline of Olive. Journal of Plant Pathology 96: S4.101.
- Nigro F, Boscia D, Antelmi I, Ippolito A (2013). Fungal species associated with a severe decline of Olive in Southern Italy. Journal of Plant Pathology 95: 668.
- Prusky D, Keen NT (1993). Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. Plant Disease 77: 114-118.
- Saponari M, Boscia D, Nigro F, Martelli GP (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.
Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant physiology*. 5th Ed. Sinauer Associates.

AUTORI

Giovanni Luigi Bruno (giovanniluigi.bruno@uniba.it), Corrado Cariddi, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti (Di.S.S.P.A.), Università di Bari Aldo Moro, Via G. Amendola, 165/A, 70126 Bari

Franca Tommasi (franca.tommasi@uniba.it), Valentina Tinelli, Marika Santamaria, Dipartimento di Biologia, Università di Bari Aldo Moro, Via Orabona, 4, 70125 Bari

Autore di riferimento Franca Tommasi
