



**UNIVERSITÀ**  
DEGLI STUDI DELLA  
**TUSCIA**

DIPARTIMENTO  
DI SCIENZE AGRARIE  
E FORESTALI

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO**

**DAFNE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI E ANIMALI - XXXII CICLO**  
**S.S.D. AGR/12**

**“DISSECCAMENTO RAPIDO DELL’OLIVO: INFLUENZA DI ASPETTI  
AGRONOMICO-COLTURALI, NUTRIZIONALI, FITOSANITARI E  
MICROBIOLOGICI”**

*Tesi di Dottorato di:*

**DR. MAURO GIORDANI**

*Coordinatore del corso*

**PROF.SSA ROBERTA BERNINI**

*Tutor*

**PROF. GIORGIO MARIANO BALESTRA**

*Co-Tutor*

**PROF. ANGELO MAZZAGLIA**

A.A. 2019-2020



**UNIVERSITÀ**  
DEGLI STUDI DELLA  
**TUSCIA**

**DIPARTIMENTO  
DI SCIENZE AGRARIE  
E FORESTALI**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO**

**DAFNE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI E ANIMALI - XXXII CICLO  
S.S.D. AGR/12**

**“DISSECCAMENTO RAPIDO DELL’OLIVO: INFLUENZA DI ASPETTI  
AGRONOMICO-COLTURALI, NUTRIZIONALI, FITOSANITARI E  
MICROBIOLOGICI”**

*Tesi di Dottorato di:*

**DR. MAURO GIORDANI**

*Mauro Giordani*

*Coordinatore del corso*

**PROF.SSA ROBERTA BERNINI**

*Roberta Bernini*

*Tutor*

**PROF. GIORGIO MARIANO BALESTRA**

*Giorgio M. Balestra*

*Co-Tutor*

**PROF. ANGELO MAZZAGLIA**

*Angelo Mazzaglia*

A.A. 2019-2020

# Sommario

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUZIONE E CONTESTO TERRITORIALE .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Le malattie delle piante e dell'olivo nel contesto ambientale.....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Concetto di malattia.....	6
1.1.2 Strategie di difesa delle piante .....	7
1.1.3 Importanza delle malattie delle piante .....	8
1.1.4 Strategie di controllo.....	9
1.1.4.1 Mezzi chimici .....	9
1.1.4.2 Mezzi di biocontrollo .....	10
1.1.5 Interazioni tra fattori: triangolo e tetraedro della malattia.....	11
1.1.6 L'ospite: l'olivo.....	13
1.1.6.1 Descrizione della coltura .....	13
1.1.6.2 L'olivo e le condizioni ambientali.....	14
1.1.6.3 L'olivo e il suolo .....	14
1.1.6.4 L'olivo e i cambiamenti climatici.....	15
1.1.6.5 Le varietà di <i>Olea europaea</i> nel Salento.....	15
1.1.6.6 Principali avversità dell'olivo nel Salento .....	17
1.1.7 L'ambiente.....	19
1.1.7.1 Il clima .....	19
1.1.7.2 L'acqua .....	22
1.1.7.3 Il suolo.....	23
1.1.7.4 Linee di intervento.....	24
<b>1.2 Il patogeno: <i>Xylella fastidiosa</i> (Wells et al.).....</b>	<b>26</b>
1.2.1 Sintomatologia, biologia e trasmissione.....	27
1.2.2 Eziologia di <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> nella pianta ospite .....	28
1.2.3 <i>Xylella fastidiosa</i> e comunità endofitica.....	29
<b>1.3 Analisi dell'ecologia microbica dell'olivo: la rizosfera .....</b>	<b>31</b>
1.3.1 Quali fattori determinano la struttura del microbiota rizosferico? .....	33
1.3.2 Effetti della segnalazione di difesa sul microbioma radicale: quando la pianta è attaccata, il microbiota arriva in soccorso.....	34
1.3.3 Ruolo del suolo, del clima e delle azioni antropiche nella composizione delle comunità dei batteri rizosferici.....	34
1.3.4 Microbioma dell'olivo nel Salento .....	37
<b>1.4 Il Disseccamento Rapido dell'olivo nel Salento.....</b>	<b>41</b>
1.4.1 L'olivicoltura salentina: un'attività legata alle piccole aziende.....	41
1.4.2 Genesi del Disseccamento rapido degli olivi .....	42
1.4.3 Precedenti storici .....	43
1.4.4 Caratteristiche della fitopatìa e stato della ricerca scientifica.....	43
1.4.5 Il quadro normativo .....	48
1.4.6 Dall'eradicazione alla convivenza .....	51

1.4.7	Intensivizzazione degli impianti .....	51
1.4.8	Strategie di convivenza .....	52
<b>2</b>	<b>SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>55</b>
<b>3</b>	<b>GLI OLIVETI OGGETTO DI STUDIO .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Descrizione degli oliveti .....</b>	<b>58</b>
<b>3.2</b>	<b>Materiali e metodi.....</b>	<b>61</b>
3.2.1	Analisi della sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo” negli appezzamenti.....	61
3.2.2	Il clima negli oliveti campione .....	61
3.2.3	Gestione agronomica degli oliveti.....	62
<b>3.3</b>	<b>Risultati .....</b>	<b>63</b>
3.3.1	Analisi della sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo” negli appezzamenti.....	63
3.3.2	Il clima negli oliveti campione .....	64
3.3.3	Gestione agronomica degli oliveti.....	70
<b>3.4</b>	<b>Discussione.....</b>	<b>75</b>
3.4.1	Analisi della sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo” negli appezzamenti .....	75
3.4.2	Il clima negli oliveti campione .....	75
3.4.3	Gestione agronomica degli oliveti.....	76
<b>4</b>	<b>PROPRIETÀ CHIMICO-BIOCHIMICHE E COMPOSIZIONE DEL MICROBIOMA BATTERICO DELLA RIZOSFERA IN AREE OLIVICOLE AFFETTE DA “DISSECCAMENTO RAPIDO DELL’OLIVO” .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Importanza del microbioma rizosferico e dei parametri chimico-biochimici.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2</b>	<b>Materiali e metodi.....</b>	<b>83</b>
4.2.1	Prelievo dei campioni .....	83
4.2.2	Composizione delle comunità batteriche nel suolo .....	83
4.2.3	Indicatori chimico-biochimici.....	84
4.2.4	Analisi statistica .....	85
<b>4.3</b>	<b>Risultati .....</b>	<b>86</b>
4.3.1	Composizione delle comunità batteriche nel suolo .....	86
4.3.2	Indicatori chimico-biochimici.....	89
4.3.3	Caratterizzazione chimico-fisica di base.....	92
<b>4.4</b>	<b>Discussione.....</b>	<b>94</b>
4.4.1	Caratterizzazione delle comunità batteriche della rizosfera .....	94
4.4.2	Analisi delle attività microbiche.....	97
4.4.3	Analisi delle caratteristiche pedo-climatiche e gestionali .....	97
<b>5</b>	<b>LO IONOMA DELLE FOGLIE GIOCA UN RUOLO NELLA RISPOSTA DEGLI OLIVI (<i>OLEA EUROPAEA</i>) AL “DISSECCAMENTO RAPIDO”?.....</b>	<b>99</b>

<b>5.1</b>	<b>Importanza dello ionoma fogliare.....</b>	<b>100</b>
<b>5.2</b>	<b>I composti dello zolfo: ruolo nella difesa dalle malattie.....</b>	<b>101</b>
<b>5.3</b>	<b>Materiali e metodi.....</b>	<b>102</b>
5.3.1	Campionamento delle foglie .....	102
5.3.2	Analisi ICP-OES.....	102
5.3.3	Estrazione e determinazione dei tioli non proteici .....	102
5.3.4	Estrazione degli enzimi.....	103
5.3.5	Determinazione quantitativa delle proteine .....	103
5.3.6	Determinazione dell'attività della O-acetilserina(tiol)lasi (OASTL) .....	103
5.3.7	Analisi statistica .....	103
<b>5.4</b>	<b>Risultati .....</b>	<b>104</b>
5.4.1	Composizione elementare delle foglie (macro- e microelementi).....	104
5.4.2	Contenuto di tioli nelle foglie .....	108
5.4.3	Attività dell'enzima OASTL nei tessuti fogliari .....	108
<b>5.5</b>	<b>Discussione.....</b>	<b>110</b>
5.5.1	Analisi dello ionoma fogliare .....	110
5.5.2	Ruolo dello zolfo nello sviluppo della malattia .....	113
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>116</b>
<b>APPENDICE 1 .....</b>	<b>120</b>	
<b>L'ospite: l'olivo .....</b>	<b>120</b>	
Descrizione della coltura.....	120	
L'olivo e le condizioni ambientali .....	122	
Temperatura.....	122	
Disponibilità idrica .....	122	
Vento     123		
L'olivo e il suolo.....	123	
L'olivo e i cambiamenti climatici .....	123	
Le varietà di <i>Olea europaea</i> nel Salento .....	124	
Descrizione delle cultivar.....	124	
Caratteristiche delle cultivar più diffuse.....	127	
Principali avversità dell'olivo nel Salento.....	128	
Patogeni dell'olivo.....	129	
Fitofagi dell'olivo.....	133	
Avversità emergenti .....	134	
<b>APPENDICE 2 .....</b>	<b>137</b>	
<b>L'ambiente nel Salento .....</b>	<b>137</b>	
Il clima.....	137	
Generalità sul clima del Salento.....	137	
Le precipitazioni piovose nel Salento .....	138	
Effetti dei cambiamenti climatici sulla produzione e sullo stato fitosanitario degli olivi.....	139	

L'acqua.....	141
Area idrogeologica del Salento .....	141
Olivo e stress idrico.....	144
Il suolo.....	145
La degradazione del suolo .....	146
Classificazione dei suoli in base ai processi di degradazione in atto .....	148
Vulnerabilità dei suoli nell'area pedologica comprendente il Salento .....	149
Linee di intervento .....	150
<b>Bibliografia .....</b>	<b>152</b>

## Abstract

La coltivazione degli olivi nel sud-est dell'Italia (Lecce, regione Puglia) negli ultimi anni è stata messa in crisi dal Complesso del Disseccamento Rapido dell'Olivo (CoDiRO), ufficialmente identificato per la prima volta nel 2013. Il “disseccamento rapido dell'olivo” sta determinando principalmente un grave impatto di natura economica (sia diretto sia indiretto), ma anche gravi conseguenze sull'agricoltura locale e sull'intera olivicoltura italiana, con danni al paesaggio, criticità per le condizioni climatico-ambientali e ripercussioni negative a livello sociale e culturale.

La diffusione della malattia è stata inizialmente rapida, ma con un pattern irregolare, interessando alcune zone più intensamente di altre, anche all'interno di areali omogenei.

Nelle piante sintomatiche sono stati rinvenuti patogeni batterici, fungini ed alcuni fitofagi; inoltre, nello xilema di molti alberi colpiti è stata riscontrata la presenza del batterio da quarantena *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (ST 53), che è stato indicato come agente eziologico del “disseccamento rapido dell'olivo”. Ad oggi, gli sforzi di ricerca per risolvere il problema si sono incentrati essenzialmente su di esso e, sebbene gli studi scientifici abbiano compiuto notevoli progressi negli ultimi anni, la soluzione del problema appare ancora lontana. Infatti, considerato il quadro sintomatologico grave e complesso della malattia, non sono state ancora individuate strategie efficaci di monitoraggio e di controllo o di riduzione del danno arrecato nei territori colpiti.

La maggior parte delle ricerche considera principalmente la relazione delle piante rispetto al patogeno e / o agli insetti vettori e pochi studi hanno analizzato le informazioni sul contesto del suolo, sullo stato nutrizionale degli alberi e sulla biodiversità microbica nelle aree olivicole interessate dal “disseccamento rapido dell'olivo”.

È noto che la gestione dello stato dei nutrienti minerali nelle piante è uno dei possibili meccanismi che consentono la riduzione degli effetti di avversità biotiche e abiotiche. Tra gli elementi essenziali, lo zolfo (S) è fondamentale per garantire protezione contro stress ambientali e parassiti, attraverso l'attivazione di meccanismi di difesa basati su composti tiolici non proteici (cisteina e glutatione).

Le condizioni del suolo e le complesse relazioni ecologiche con il microbioma, in particolare quello rizosferico, possono avere un effetto determinante sulla crescita equilibrata delle piante arboree e sul mantenimento del loro stato di salute.

A partire dall'osservazione del diverso grado di sintomatologia prodotto dalla malattia in oliveti ricadenti nella zona del focolaio iniziale, si è inteso studiare alcune proprietà del suolo e caratterizzarne la diversità microbica con l'obiettivo di indagare le possibili interazioni suolo - microorganismi - pianta nel contesto della zona infetta da *X. fastidiosa*; inoltre, è stata studiata la relazione tra lo stato nutrizionale delle piante e la gravità dei sintomi da “disseccamento rapido”.

L'obiettivo del progetto era verificare la sussistenza di differenze tra gli impianti oggetto di studio in riferimento agli indicatori individuati e valutare eventuali relazioni tra i parametri indagati e lo sviluppo della malattia.

A tal fine sono stati selezionati olivi da aree sperimentali che mostrano diverso grado di sintomatologia: di essi sono state indagate le caratteristiche chimico-biochimiche e la struttura della comunità microbica del suolo rizosferico, sono stati analizzati lo stato nutrizionale e la produzione di metaboliti di difesa. Per definire uno scenario di riferimento in cui inquadrare interventi preventivi o azioni di contenimento dei danni, sono stati esaminati i principali parametri climatico-ambientali legati a modelli predittivi dello sviluppo del patogeno e sono state raccolte informazioni sulla gestione agronomica e fitoiatrica degli oliveti oggetto d'indagine.

Con un approccio multidisciplinare integrato sono state effettuate analisi molecolari per determinare la biodiversità batterica della rizosfera ed è stata utilizzata la spettroscopia ICP-OES per determinare

il contenuto di macro e micronutrienti delle foglie di olivo; è stato inoltre analizzato il contenuto di metaboliti dello zolfo. I dati ottenuti sono stati elaborati a livello statistico.

I risultati sulla struttura della comunità batterica della rizosfera e su alcune attività microbiche mostrano differenze che potrebbero essere messe in relazione con la diversa incidenza della malattia. Nel confronto fra le aziende ricadenti in zona infetta, differenze significative sono state registrate anche nella capacità di accumulo dei nutrienti: in particolare, le foglie provenienti dalle aziende con maggiori sintomi da “disseccamento rapido dell’olivo” hanno mostrato un contenuto minore di rame, zinco, manganese e zolfo rispetto a quelle dell’oliveto asintomatico. Nelle foglie degli alberi sintomatici è stata riscontrata una maggiore attività dell’enzima OASTL, così come un maggior accumulo di composti tiolici.

Le caratteristiche peculiari delle aree dove si è diffuso il “disseccamento rapido dell’olivo” rivelano un ambiente piuttosto fragile, dove uno o più fattori climatici e pedologici avversi possono avere svolto un ruolo nella diffusione di *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Inoltre, alcune pratiche agronomiche poco razionali hanno contribuito ad impoverire la fertilità complessiva del suolo e a peggiorare le condizioni dell’agroecosistema oliveto.

Lo studio fornisce evidenze promettenti, delineando potenziali sviluppi ed ambiti di ricerca finora poco esplorati per affrontare questo complesso quadro patologico; in particolare merita di essere approfondita la questione se lo stato nutrizionale delle piante, l’ecologia microbica del suolo rizosferico e le scelte di gestione agronomica degli oliveti abbiano un ruolo nello sviluppo dei sintomi del “disseccamento rapido dell’olivo”.

## **Abstract**

The cultivation of olive trees in south-east of Italy (Lecce, Apulia region) in recent years has been challenged by the Olive Quick Decline Syndrome (OQDS), which was officially identified for the first time in 2013. The OQDS is mainly causing a serious impact of an economic nature (both direct and indirect), but also serious consequences on local agriculture and on the entire Italian olive growing, with damage to the landscape, criticalities for climatic and environmental conditions and negative social and cultural repercussions.

The spread of the disease was initially rapid, but with an irregular pattern, affecting some areas more intensely than others, even within homogeneous areas.

In symptomatic plants, bacterial and fungal pathogens and some phytophagous have been found; moreover, in the xylem of many affected trees the presence of the quarantine bacterium *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (ST 53) was found, which has been indicated as the causative agent of the OQDS. To date, research efforts to solve the problem have essentially focused on it and, although scientific studies have made considerable progress over the last years, the solution to the the problem has yet to be solved. Indeed, given the serious and complex symptomatologic picture of the disease, effective strategies for monitoring and control or reduction of the damage caused in the affected areas have not yet been identified.

Most research focuses on the relationship of plants to the pathogen and/or vector insects and few studies have analysed soil context information, the nutritional status of trees and microbial biodiversity in olive-growing areas affected by OQDS.

It is known that the management of mineral nutrient status of plants is one of the possible mechanisms allowing the mitigation of the effects of several biotic and abiotic adversities. Among essential elements, sulphur (S) is critical for ensuring protection against environmental stress and parasites,

through the activation of defence mechanisms based on non-protein thiol compounds (cysteine and glutathione).

Soil conditions and complex ecological relationships with the microbiome, in particular rhizospheric microbiome, can have a determining effect on the balanced growth of tree plants and on the maintenance of their state of health.

Starting from the observation of the different degree of symptoms produced by the disease in olive groves in the area of the initial outbreak, it was decided to study some soil properties and characterize its microbial diversity with the aim of investigating the possible interactions between soil - microorganisms - plant in the context of the area infected with *X. fastidiosa*; in addition, the relationship between the nutritional status of plants and the severity of OQDS symptoms was studied.

The aim of the project was to verify the existence of differences between the plants under study with reference to the indicators identified and to assess any relationships between the parameters investigated and the development of the disease.

To this end, olive trees were selected from experimental areas showing different degrees of symptoms: the chemical-biochemical characteristics and the structure of the rhizospheric soil microbial community were investigated, the nutritional status and production of defence metabolites were analysed. In order to define a reference scenario in which to frame preventive interventions or damage control actions, the main climatic-related parameters linked to predictive models of the development of the pathogen were examined and information on agronomic and plant health management of the surveyed olive groves were collected.

With an integrated multidisciplinary approach, molecular analysis was carried out to determine the bacterial biodiversity of the rhizosphere and ICP-OES spectroscopy was used to determine the macro and micronutrient content of the olive leaves; the content of sulphur metabolites was also analysed. The data obtained were processed at statistical level.

Results on the structure of the rhizosphere bacterial community and some microbial activities show differences that could be related to the different incidence of the disease. In the comparison between the farms in the infected area, significant differences were also recorded in the storage capacity of nutrients by plants: in particular, the leaves from the farms with major symptoms of OQDS showed a lower content of copper, zinc, manganese and sulphur than those of the asymptomatic olive grove. In the leaves of the symptomatic trees has been found a greater activity of the OASTL enzyme, as well as a greater accumulation of thiol compounds.

The peculiar characteristics of the areas where OQDS has spread, reveal a rather fragile environment, where one or more adverse climatic and pedological factors may have played a role in the spread of *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. In addition, some not very rational agronomic practices have contributed to impoverishing the overall fertility of the soil and worsening the conditions of the olive grove agroecosystem.

These results provide a promising evidence, outlining potential developments and research areas hitherto little explored to dealing with OQDS; in particular, the question of whether plant nutritional status, microbial ecology of the rhizospheric soil and agronomic management choices of olive groves play a role in the development of OQDS symptoms deserves to be further examined in depth.

# **1. Introduzione e contesto territoriale**

Il disseccamento rapido dell'olivo (in acronimo: CoDiRO, che nella letteratura internazionale diventa OQDS, *Olive Quick Decline Syndrome*) si caratterizza con un quadro sintomatologico grave e complesso, per il quale non sono state ancora individuate strategie efficaci di controllo o di riduzione del danno.

In Puglia la diffusione sul territorio della fitopatia ha avuto fin dall'inizio un andamento irregolare e ancor oggi si osservano oliveti con diversi gradi di sintomatologia.

Al momento non sono disponibili soluzioni praticabili e durature per questa problematica che è allo stesso tempo fitosanitaria, economica, ambientale e culturale. Alcune domande restano aperte e questo studio propone un approfondimento di aspetti ancora poco indagati.

La tesi si articola in un primo capitolo nel quale vengono evidenziati alcuni aspetti relativi alle malattie delle piante in generale, con particolare riferimento a quelle arboree e ai batteri fitopatogeni. Segue la descrizione dei tre elementi coinvolti nel quadro fitopatologico: l'ospite (l'albero di olivo), il patogeno (il batterio *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*) e l'ambiente del Salento (con l'analisi del clima, della disponibilità idrica, delle caratteristiche pedologiche e dello stato di degrado del suolo). Viene quindi illustrato il contesto produttivo e storico in cui si inserisce la malattia, con la rassegna delle linee di indirizzo scientifiche ed i provvedimenti tecnici e legislativi messi in campo per fronteggiare questa emergenza fitopatologica.

Quindi, dopo la presentazione dello scopo della ricerca, nel terzo capitolo vengono descritte le caratteristiche peculiari degli oliveti nei quali sono state condotte le indagini in campo.

Il quarto capitolo rende conto delle analisi effettuate sul suolo degli appezzamenti oggetto di studio, sia dal punto di vista dell'ecologia delle comunità batteriche della rizosfera, sia sulle attività microbiche indagate attraverso alcuni parametri chimico-biochimici.

Il quinto capitolo espone le analisi effettuate sulle foglie degli alberi di olivo in relazione alla composizione dello ionoma e alla produzione di metaboliti dello zolfo.

Infine, si riportano le conclusioni.

## 1.1 Le malattie delle piante e dell'olivo nel contesto ambientale

### 1.1.1 Concetto di malattia

Del concetto di malattia nelle piante è difficile dare definizioni assolute; una tra le molte può essere: “la serie di reazioni visibili e invisibili delle cellule e dei tessuti vegetali a fattori biotici (organismi fitopatogeni) e abiotici (ambientali) o loro combinazioni, che provocano cambiamenti negativi nella forma, nella funzione o nell'integrità della pianta e possono causare danni parziali a parti di pianta o, in casi gravi, la morte dell'intera pianta o dei campi; anche le attività umane svolgono un ruolo importante nello sviluppo delle malattie delle piante” (Agrios, 2005).

Questa, come altre definizioni, sono state concepite al fine di dare rilievo alle alterazioni morfologiche o fisiologiche in generale o alle perdite economiche che la malattia determina; si fa in ogni caso riferimento ad un modello di pianta “sana” e “normale”, che però è solo ipotetico, in quanto non esistono in realtà piante completamente sottratte allo stress esercitato dalla continua variazione dei fattori ambientali e biologici esterni. Infatti, fattori abiotici, ovvero condizioni ambientali o fisiologiche quali temperatura, umidità, sostanze nutritive minerali, inquinanti, malnutrizione, agenti tossici, ecc., che si verificano al di sopra o al di sotto di determinati livelli tollerati dalle piante, possono disturbare le loro funzioni (Atwood *et al.*, 2006).

D'altra parte, si può intervenire sui fattori nutrizionali e ambientali in modo da condizionare la pianta, così da esaltarne lo sviluppo e la produttività, oppure la resistenza a fattori biotici o abiotici avversi: difficile dire in quale dei due casi essa assuma di più le caratteristiche di pianta “sana” cui fare riferimento.

Un patogeno è un micro-organismo che può trovare come habitat ideale al suo sviluppo la rizosfera (zona di interazione tra radice e suolo), la fillosfera (parte aerea della pianta) o l'endosfera (parti interne della pianta) e può disturbare la crescita, la produzione e la sopravvivenza della pianta, causando cambiamenti nella morfologia e nel comportamento della pianta stessa o dei suoi tessuti (Lucas *et al.*, 2012).

Ad esempio, quando i batteri, i funghi o altri microorganismi attaccano le piante, di solito disturbano il metabolismo delle cellule vegetali secernendo enzimi, tossine, regolatori della crescita e altre sostanze e assorbendo i nutrienti dalle cellule ospiti per il loro uso (Mikkelsen, 2006). Alcuni agenti patogeni possono anche causare malattie sviluppandosi nei vasi xilematici o floematici delle piante, bloccando così il trasporto di acqua e delle sostanze nutritive.

Nelle piante la malattia, se localizzata, ha conseguenze per lo più irreversibili (necrosi, deformazioni, ecc.), anche se l'arresto del patogeno è tuttavia possibile prima della comparsa dei sintomi con la lisi del patogeno stesso, sia per via naturale o per interventi terapeutici. Inoltre, la pianta nel suo complesso può superare la malattia con la sostituzione anatomica o il compenso funzionale delle parti colpite.

In caso di malattie sistemiche, specialmente nelle piante perenni, non di rado può verificarsi una guarigione *in toto*, permanente o transitoria, determinata dal cambiamento delle stagioni e/o delle annate e/o da variazioni dei fattori ontogenetici o ambientali (Matta *et al.*, 2017).

Molti batteri patogeni delle piante possono rimanere a lungo asintomatici ma è sufficiente un semplice cambiamento in uno o più fattori climatici, colturali o relativi alle loro caratteristiche o alle interazioni con il microbioma, per portarli a condizioni favorevoli che aiutano l'emergere o il riemergere del fenotipo patogeno (Álvarez *et al.*, 2010).

Ad esempio, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* era presente in Giappone dal 1984, ma con un impatto limitato sulla produzione locale (Ferguson, 2011). Tuttavia, nel 2008 una specifica biovar si è diffusa in tutto il mondo a partire da Italia, Nuova Zelanda, Cile, e altri paesi (Takikawa *et al.*, 1989) causando gravi perdite in tutte le principali aree di coltivazione dell'actinidia e di produzione dei

frutti di kiwi (Marcelletti & Scortichini, 2014). Il batterio *Xylella fastidiosa* ha oltre 500 specie vegetali ospiti ma solo su alcune determina sintomi significativi e danni economici: l'epidemiologia e la dinamica di ciascun patosistema sono distinte, dipendono dall'interazione ecologica tra il patogeno, il vettore, l'ospite e il microbiota ad esso associato e da come le interazioni sono influenzate da fattori biotici e abiotici, comprese le attività antropogeniche (Sicard *et al.*, 2018).

Pertanto i concetti di *infezione* e *malattia* non sono sinonimi, in quanto il primo si riferisce alla presenza di un patogeno in una pianta, mentre con *malattia* si indica l'espressione dei sintomi che l'organismo patogeno provoca. La differenza è dovuta al fatto che le piante adottano strategie di difesa dagli attacchi dei patogeni, che possono anche evolvere in risultati di resistenza o di tolleranza (Giunta Regionale Puglia, 2016).

### 1.1.2 Strategie di difesa delle piante

Le piante hanno evoluto vari modi e strumenti per difendersi efficacemente dall'attacco dei patogeni: evitarli, tollerarli e contrastarli (Matta *et al.*, 2017).

La *tolleranza* può essere *della malattia*, con compensazione fisiologica delle parti rimaste indenni che sopperiscono alle perdite fisiologiche e produttive, oppure *del parassita*: gli aumenti di quantità del parassita non determinano aumenti altrettanto elevati della gravità nelle manifestazioni patologiche (Matta *et al.*, 2017).

La *resistenza*, cioè la capacità di contrastare il parassita, può avvenire attraverso diversi meccanismi: la *resistenza generale*, o del non-ospite, che una pianta esercita verso patogeni eterologhi (che cioè non attaccano quel determinato genotipo vegetale) e la *resistenza specifica* o *varietale*, esercitata da determinate varietà di piante verso microorganismi patogeni per la propria specie (omologhi). Non necessariamente i due tipi di resistenza dipendono da meccanismi diversi: la sovrapposizione riscontrata nei profili di espressione dei geni della pianta in seguito ad attacchi di organismi non-patogeni o di razze avirulente di specie patogene, suggerisce che le risposte di difesa alla base delle due forme di resistenza siano in gran parte le stesse (Matta *et al.*, 2017).

Le difese possono essere morfo-strutturali o biochimiche e possono essere pre-infezionali (costitutive, passive), cioè presenti nella pianta indipendentemente da un attacco da parte di un patogeno, oppure post-infezionali (indotte, attive) (Matta *et al.*, 2017).

I meccanismi di reazione morfo-strutturali all'invasione da parte di un patogeno possono essere citologici, con ispessimento della parete cellulare, produzione di papille, accumulo di minerali (silicio, calcio, manganese) e/o di sostanze organiche (fenoli, melanina, lignina, suberina). Resine e gomme, frammiste spesso a composti antimicrobici, possono poi bloccare l'avanzata dei patogeni nelle cellule e negli spazi intercellulari. Gomme e tulle prodotte nei vasi legnosi dalle cellule parenchimatiche annesse, rappresentano un meccanismo particolarmente valido di ostacolo alla diffusione nello xilema dei parassiti vascolari (Matta *et al.*, 2017).

Le risposte morfo-strutturali sono estremamente efficaci solo se si verificano rapidamente, così da bloccare le prime sacche di patogeni. Reazioni istologiche e anatomiche più complesse possono compensare la perdita di tessuti o organi compromessi dall'attacco parassitario, come ad esempio la formazione di nuove cerchie legnose in sostituzione di quelle bloccate da patogeni vascolari (Matta *et al.*, 2017).

La resistenza post-infezionale di tipo biochimica si esplica mediante meccanismi più complessi: la reazione di ipersensibilità (HR), la più compiuta espressione di difesa attiva, che determina la morte di cellule, funzionale alla sopravvivenza della pianta; la produzione di proteine PR (*pathogenesis related*); la produzione di fitoalessine, composti lipofilici a basso peso molecolare del metabolismo secondario che si accumulano rapidamente intorno al sito di infezione: hanno spiccate attività antimicrobiche e sono indotte da danni alle cellule, anche di tipo abiotico (Ren & West, 1992).

La Resistenza Localizzata Acquisita (LAR) riguarda le cellule limitrofe a quelle coinvolte direttamente nell'infezione ed è determinata da un sistema di segnali che dal sito d'infezione si

propaga alle cellule adiacenti. La resistenza acquisita si sviluppa inizialmente in un'area circoscritta (LAR, *Localized Acquired Resistance*) ma, a distanza di poco tempo, può estendersi sistemicamente lungo tutta la pianta (SAR, *Systemic Acquired Resistance*), mediante un segnale floema mobile, che porta all'accumulo di acido salicilico (SA) e vari altri meccanismi di difesa efficaci contro eventuali infezioni secondarie (Ryals *et al.*, 1996; Bloem *et al.*, 2005).

La Resistenza Sistemica Indotta (ISR, *Induced Systemic Resistance*), viene invece attivata da diversi elicitori, tra cui microorganismi benefici (es. PGPR), che innalzano il potere difensivo delle piante: essa coinvolge le molecole segnale dell'acido jasmonico (JA) e dell'etilene (ET) (Vijayan *et al.*, 1998).

In alcune fitoalessine è presente lo zolfo; diverse PR (difensine, tionine) sono ricche di cisteina, aminoacido solforato precursore di tutti gli altri composti contenenti zolfo ridotto. Tra gli elementi essenziali, lo zolfo è infatti richiesto per la sintesi di vari composti come i tioli ed è elemento fondamentale per garantire una normale risposta di difesa allo stress ambientale e ai parassiti (Bloem *et al.*, 2005).

### 1.1.3 Importanza delle malattie delle piante

Le malattie delle piante rappresentano una minaccia sempre più seria per la produzione di cibo, sia per le colture destinate all'autoconsumo, sia per quelle destinate al mercato, nonché per la produzione di biomassa forestale. Possono costituire, altresì, un fattore di perturbazione della vita sociale e culturale di intere comunità e talvolta anche per il paesaggio. Un sempre crescente numero di specie arboree, sia agrarie sia forestali, negli ultimi decenni è interessato da fenomeni di declino (Anderson *et al.*, 2004).

Gli alberi forniscono diversi servizi ecosistemici: regolazione del clima, ciclo dell'acqua e dei nutrienti, sequestro di carbonio, produzione; sono, inoltre, un importante serbatoio di biodiversità e possiedono un valore ricreativo e culturale (Bettenfeld *et al.*, 2020).

Nella maggior parte dei casi di declino o deperimento, l'intera pianta è danneggiata, sia le parti legnose che le foglie. Dopo un po' i sintomi si manifestano sotto forma di una significativa perdita di biomassa, come mostrato nel pioppo (Steenackers *et al.*, 1996) e nel frassino (Coker *et al.*, 2019), o una diminuzione della quantità e della qualità dei frutti (ad esempio, vite o olivo) (Gramaje *et al.*, 2018; Luvisi *et al.*, 2017). Oltre all'impatto economico, le malattie degli alberi possono influenzare direttamente o indirettamente alcuni dei servizi ecosistemici forniti.

Le malattie e il declino delle piante arboree derivano dalla combinazione di vari elementi determinanti (fattori abiotici, microorganismi patogeni, fitofagi, pratiche colturali inadeguate o cause non identificate). Il declino potrebbe essere correlato a modifiche o disbiosi del microbiota associato alla pianta, che potrebbe non essere più in grado di garantire le funzioni essenziali per l'equilibrio della singola unità di evoluzione che include la pianta stessa e l'intera comunità di microbi ad essa associata (olobionte). Sembra che gli agenti fitopatogeni possano scatenare malattie su alberi sani, agendo come "fattori primari"; oppure possano beneficiare dell'indebolimento dell'albero derivato da un'altra malattia, da stress climatici o chimici, da pratiche non razionali o da cattive condizioni del suolo: in tal caso i patogeni rappresentano "fattori secondari" (Bettenfeld *et al.*, 2020). È probabile che una determinata malattia non sempre sia correlata alla presenza di un particolare agente patogeno, ma potrebbe derivare da una combinazione di fattori avversi e dalla presenza di uno o più agenti patogeni (Bettenfeld *et al.*, 2020).

I principali promotori delle nuove minacce per la salute delle piante sono l'aumento del commercio a lunga distanza di prodotti vegetali, l'adozione di nuove colture e pratiche di coltivazione (Garibaldi & Gullino, 2010; Savary *et al.*, 2011), nonché i cambiamenti nel clima e nei modelli di uso del suolo (Garrett *et al.*, 2011; Sundström *et al.*, 2014; Papaix *et al.*, 2015), così come l'uso eccessivo di pesticidi (Janse, 2012).

La sinergia di questi fattori ha influenzato l'interazione naturale pianta-patogeno, disturbando le antiche relazioni coevolutive e creando condizioni che possono far evolvere le popolazioni batteriche e provocare epidemie (Pautasso *et al.*, 2015).

#### 1.1.4 Strategie di controllo

Nel controllo delle malattie delle piante, uno dei metodi più avanzati, inizialmente proposto da Stern *et al.* (1959), è quello noto come *Integrated Pest Management* (IPM) ed è costituito da varie attività integrate.

L'IPM è una strategia basata sull'ecosistema, che si concentra sulla prevenzione a lungo termine dei parassiti o del loro danno, attraverso una combinazione di tecniche come il controllo biologico, la manipolazione dell'habitat, la modifica delle pratiche colturali e l'uso di varietà resistenti. I prodotti fitosanitari vengono utilizzati solo se il monitoraggio indica che sono necessari, e i trattamenti sono effettuati con l'attenzione di rimuovere solo l'organismo bersaglio (University of California Agriculture and Natural Resources, 2019).

I fattori che interagiscono tra loro e sul controllo della malattia comprendono l'interazione patogeno-ospite, l'epidemiologia dei patogeni, i fattori ambientali e le fasi stagionali e fisiologiche, sia dell'ospite che del patogeno (Agrios, 2005).

Adottare la strategia IPM significa dare il giusto peso ai fattori ambientali ed ecologici che influenzano il parassita, invece di perseguirne semplicemente l'eliminazione, con l'obiettivo di creare condizioni sfavorevoli al suo sviluppo. Il modo più efficace e duraturo per gestire i parassiti è utilizzare, con un approccio multidisciplinare, una combinazione di metodi che funzionano meglio insieme che separatamente (University of California Agriculture and Natural Resources, 2019).

##### 1.1.4.1 Mezzi chimici

Nel caso di una malattia delle piante causata da batteri fitopatogeni, questa può essere difficile da controllare, specialmente se il patogeno è penetrato e si è ampiamente diffuso in un dato territorio. L'uso di prodotti fitosanitari può essere efficace come misura preventiva o in una fase precoce dell'infezione batterica e in generale può essere utilizzata per il controllo degli insetti vettori.

L'agricoltura utilizza da tempo composti cuprici, come la poltiglia bordolese, l'idrossido rameico, il solfato di rame, gli ossicloruri ed altri sali di rame in trattamenti contro funghi e batteri per proteggere le piante (Seguí, 1996).

Per la loro efficacia, i formulati a base di rame sono ampiamente utilizzati contro molte malattie batteriche delle piante, tra cui la Rogna dell'olivo (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*), la Picchiettatura batterica del pomodoro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), il Cancro batterico dell'actinidia (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) (Dollwet & Sorenson, 1985). Il rame miscelato con fertilizzanti ha fornito risultati interessanti nel controllo di diverse malattie batteriche (Yunis, 1980; Wimalajeewa *et al.*, 1991; Aldwinckle *et al.*, 2002; Teviotdale & Krueger, 2004). L'uso eccessivo di composti rameici ha tuttavia danneggiato gravemente gli ecosistemi agricoli e naturali. È stata inoltre rilevata la comparsa di ceppi resistenti in diverse specie batteriche e ciò può ostacolare il controllo di alcune fitopatie (Sayler & Kirkpatrick, 2003).

Per quanto riguarda gli antibiotici, questi sono utilizzati contro i batteri patogeni delle piante in alcuni Paesi quali Stati Uniti, Messico, Nuova Zelanda e alcuni Paesi del Medio Oriente. Quattro antibiotici sono tuttora utilizzati (Streptomina, Ossitetraciclina, Gentamicina e Acido Oxolinico) per combattere diversi agenti patogeni, come *Erwinia* spp, *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*. La più ampia applicazione si è avuta contro *Erwinia amylovora*, agente causale del colpo di fuoco batterico delle pomacee (Goodman, 1954).

L'uso estensivo di antibiotici ha determinato lo sviluppo di caratteri di resistenza da parte dei batteri fitopatogeni (Burr *et al.*, 1988). Un grave problema è rappresentato dalla possibilità che geni di

resistenza si possano trasferire da batteri patogeni vegetali a batteri patogeni umani e animali. (Ritchie, 1991; McManus & Jones, 1994).

#### 1.1.4.2 Mezzi di biocontrollo

Le piante possono essere colonizzate da agenti patogeni e da endofiti non patogeni, che trascorrono almeno parte del loro ciclo vitale all'interno dei tessuti vegetali.

Le comunità microbiche associate alle piante sono complesse e dinamiche; alcuni microbi sono dannosi e causano malattie, altri promuovono la crescita delle piante e migliorano l'acquisizione di nutrienti e la tolleranza agli stress biotici e abiotici. Una grande frazione della comunità microbica può essere definita come commensale: microrganismi che trovano la loro nicchia nell'associazione con le piante, ma non hanno alcuna funzione nota per i loro ospiti (Brader *et al.*, 2017).

Due esempi di queste simbiosi che possono determinare interazioni positive, negative o apparentemente neutre, sono il parassitismo e il commensalismo. Il parassitismo fa sì che un partner tragga beneficio mentre l'altro subisce conseguenze negative, il commensalismo è invece una forma di simbiosi in cui un partner trae beneficio e l'altro è influenzato in modo neutrale.

In realtà l'equilibrio tra commensalismo e patogenicità può essere dinamico: queste relazioni non possono essere considerate come strette ma piuttosto come relazioni che operano su un *continuum*, in cui gli organismi possono mutare i loro comportamenti e cadere nello spettro dell'una o dell'altra forma di simbiosi in seguito a condizioni diverse (Roper *et al.*, 2019).

Gli *agenti di biocontrollo* (BCA) hanno acquisito sempre maggiore importanza in seguito alla resistenza al rame e agli antibiotici sviluppata da alcuni organismi dannosi e con il manifestarsi di effetti negativi dovuti all'uso eccessivo di pesticidi, il cui accumulo ha un impatto pesante sugli ecosistemi (Pal & Gardener, 2006). Il metodo si basa sull'uso di microrganismi (batteri e funghi) antagonisti di batteri e funghi fitopatogeni (Baker, 1991; Iftikhar *et al.*, 2020).

Gli agenti di biocontrollo esplicano la loro azione attraverso molteplici meccanismi, diretti o indiretti.

L'antibiosi si esplica attraverso la produzione da parte dei microrganismi antagonisti di metaboliti secondari in grado di inibire la crescita e lo sviluppo dei patogeni. Tra i batteri produttori di antibiotici maggiormente studiati ci sono diverse specie di *Pseudomonas* (Homma *et al.*, 1989) e soprattutto *Streptomyces*, un genere appartenente al *Phylum* degli *Actinobatteri*, per lo più importanti nelle interazioni tra le radici delle piante con altri componenti del suolo (Gowdar *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2017). In particolare, un ceppo di *Streptomyces* spp. (Strain SA51) isolato dalla rizosfera di un olivo, sulla base di studi condotti in vitro e in serra, è risultato essere un antagonista molto attivo contro batteri patogeni come *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), *Clavibacter sepedonicus* (*Cms*) e *Ralstonia solanacearum*. Inoltre, nelle piante batterizzate ha dimostrato di agire come promotore della crescita (Vurukonda *et al.*, 2020).

La competizione è un meccanismo di biocontrollo che può realizzarsi per lo spazio, per i fattori nutrizionali o per altri elementi indispensabili all'attività e allo sviluppo del patogeno. Essa non implica un contatto diretto tra i due; un esempio è rappresentato da ceppi di *Streptomyces* che ostacolano il patogeno riducendo la disponibilità di ferro attraverso l'uso di siderofori (Vurukonda *et al.*, 2018; Sadeghi *et al.*, 2012).

Un ruolo importante è svolto dai microrganismi che vivono nel suolo, in grado di colonizzare la pianta ed influire (direttamente e indirettamente) sulla sua resa produttiva, sulla salute e sulla crescita (Compant *et al.*, 2010). Diversi batteri benefici per le piante, denominati con l'acronimo PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) sono in grado di migliorare l'attività fotosintetica, conferire tolleranza agli stress (Bashan *et al.*, 2008; Gamalero *et al.*, 2009), aumentare la soppressione delle malattie (Garbeva *et al.*, 2004), migliorare le prestazioni dell'acquisizione di ferro (Zhang *et al.*, 2009). La biostimolazione dell'accrescimento vegetale da parte dei PGPR avviene attraverso: 1)

l'aumento della disponibilità e dell'assimilazione di nutrienti minerali, come azoto, fosforo e ferro; 2) la sintesi di fitormoni come auxina, citochinina, acido abscisico e gibberellina; 3) la modulazione dei livelli di etilene nei tessuti vegetali; e 4) la soppressione dei fitopatogeni con l'attivazione della resistenza sistemica indotta e dell'antibiosi (Glick, 2012; Gamalero & Glick, 2015).

I principali gruppi di PGPR appartengono ai phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*; nella gamma di batteri che migliorano la crescita e inibiscono i patogeni delle piante sono presenti varie specie di *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Paraburkholderia* (Compant *et al.*, 2005; Sessitsch *et al.*, 2005; Soltani *et al.*, 2010).

Alcuni bioagrofarmaci sono stati registrati per il controllo dei batteri patogeni delle piante di pomodoro, cipolla, drupacee e contro il fuoco batterico delle pomacee (Mauch-Mani & Métraux, 1998).

### 1.1.5 Interazioni tra fattori: triangolo e tetraedro della malattia

Le piante sono sottoposte a continui tentativi di attacco da parte di fattori di stress biotici come funghi, batteri, fitoplasmi, virus e fitofagi. Tuttavia, la malattia è l'eccezione piuttosto che la regola, poiché per progredire, l'attacco deve superare le diverse strategie di difesa che le piante schierano contro l'invasore (Thordal-Christensen, 2003).

Per l'insediamento del patogeno e per la diffusione della malattia, oltre all'ospite suscettibile e al patogeno virulento, sono fondamentali i fattori ambientali che agiscono nell'area in cui si trova il focolaio iniziale (Keane & Kerr, 1997).

Se uno qualsiasi di questi elementi manca o non è ottimale, la gravità della malattia in una popolazione viene ridotta. Inoltre, anche le attività umane, principalmente le pratiche agricole, come la scelta di determinati sistemi di coltivazione o ampie applicazioni di pesticidi, possono favorire lo sviluppo di malattie (Lucas, 2011).

Dagli anni '60, questo paradigma è stato spesso illustrato come il *triangolo* della malattia (Francl, 2001). Esso può essere utilizzato per indicare la gravità o la probabilità della malattia: ciascun lato del triangolo è quindi proporzionale ai fattori ad essa favorevoli e, di conseguenza, l'area della figura illustra l'effetto degli elementi che favoriscono la malattia delle piante (Figura 1.1) (Agrios, 2005).

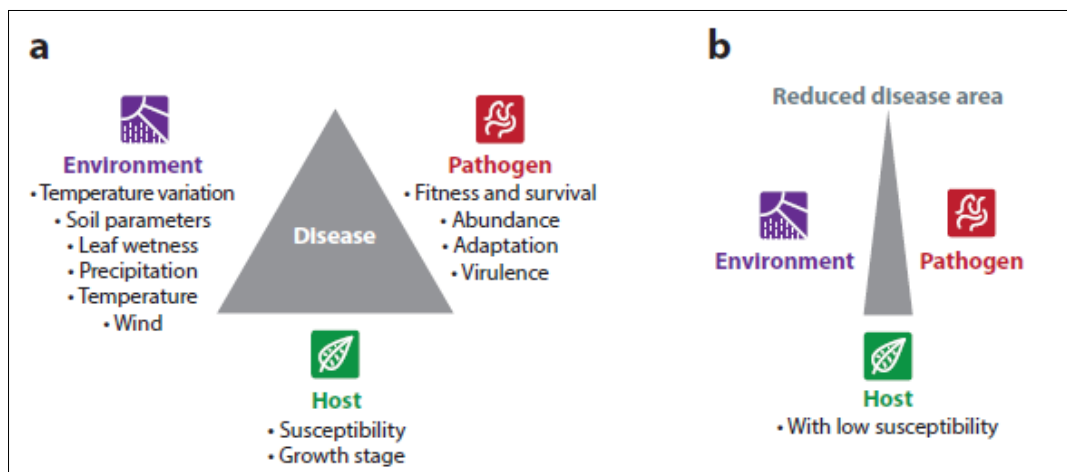


Fig. 1.1 Fattori per la manifestazione di una malattia delle piante. (a) Il triangolo della malattia classica. (b) Un triangolo della malattia modificato che illustra quantità limitate di malattia in un ospite meno suscettibile o resistente (Brader *et al.*, 2017).

Il genotipo dell'ospite (ad esempio varietà resistenti o tolleranti) o altre variazioni genetiche, la densità delle popolazioni dell'ospite o la sua età potrebbero ridurre al minimo il potenziale di sviluppo della malattia. Anche le condizioni ambientali possono favorire o ridurre lo sviluppo della malattia: umidità/temperatura ottimali e le loro variazioni tempestive nelle diverse fasi dell'infezione, esposizione topografica, vento, ecc. Per completezza, altri parametri come il fattore umano, i vettori della malattia e il tempo sono stati aggiunti al triangolo della malattia (Francl, 2001).

In senso lato, l'ambiente delle colture agrarie e forestali è, infatti, costituito dal clima, dal suolo, dalle relazioni tra gli organismi presenti, dal condizionamento derivante dalle pratiche colturali e dalle piante stesse (con il loro stato nutrizionale e di salute complessivo e con il microbiota ad esse associato).

Il riconoscimento che le piante sono colonizzate da un gran numero di microrganismi, principalmente commensali o mutualisti (Hardoim *et al.*, 2015; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011), e l'osservazione che alcune malattie potrebbero essere causate o condizionate dalla cooperazione / coinfezione di diversi agenti patogeni (Lamichhane & Venturi, 2015), ha portato alla postulazione del *patobioma*, in cui l'agente patogeno è descritto come una componente integrata del suo ambiente biotico (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014).

È noto che il microbioma svolge un ruolo di primo piano nella salute delle piante e nella soppressione dei patogeni (Berendsen *et al.*, 2012). Considerando pertanto la complessità naturale e l'importanza delle interazioni biotiche, è stato proposto un *tetraedro* della malattia, che implementa i fattori biotici come quarta dimensione per illustrare l'interazione tra i vari elementi determinanti la malattia (Figura 1.2). Questi fattori aggiuntivi includono i vettori che trasmettono agenti patogeni e in particolare il microbiota, che modula la patogenesi e la difesa delle piante.

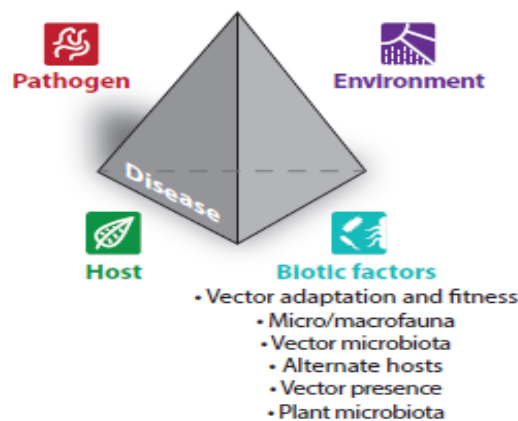


Fig. 1.2 Il tetraedro della malattia considera separatamente il fattore biotico: lo sviluppo di una malattia potrebbe essere inibito o modulato, o può anche dipendere, da un vettore di trasmissione (animale), da un ospite alternativo (pianta o animale) e da altri microbi associati alle piante. ((Brader *et al.*, 2017).

Ad esempio, l'impatto della fitopatia nota come Rogna dell'olivo, causata dal batterio *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (PSV) sulle comunità fungine epifitiche ed endofitiche di tre diverse cultivar di olivo, è stato studiato nelle condizioni di campo. Il sequenziamento ITS-DNA dei funghi coltivabili, ha mostrato che *P. savastanoi* disturba le comunità fungine residenti; in particolare, sono state osservate una riduzione dell'abbondanza e della diversità delle epifitiche e cambiamenti nella loro composizione. Rispetto agli epifiti, i funghi endofiti erano meno sensibili al PSV, ma la loro abbondanza, in particolare di potenziali patogeni, era aumentata nelle piante con la Rogna dell'olivo (Gomes *et al.*, 2019).

In linea generale ogni fattore, dai parametri climatici e le caratteristiche del suolo alle pratiche colturali, può influire direttamente sul patogeno e sul microbioma, indirettamente sulla pianta modificandone la predisposizione o, contemporaneamente, su tutti i componenti del sistema. La complessità delle azioni e delle relazioni in campo rende inevitabile, ai fini della comprensione degli effetti dell'ambiente sulle malattie delle piante, la scomposizione del medesimo e l'analisi dei singoli elementi che determinano il patosistema (Matta *et al.*, 2017).

In relazione al “disseccamento rapido dell'olivo”, di seguito vengono analizzate le principali caratteristiche dell'ospite (la pianta di olivo) e i più importanti fattori ambientali (clima, acqua e suolo) rilevati nel Salento; a seguire, nel paragrafo 1.2 sono riportate le caratteristiche del patogeno (*Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST. 53).

## 1.1.6 L'ospite: l'olivo

### 1.1.6.1 Descrizione della coltura

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una specie arborea da frutto sempreverde, longeva e ad accrescimento lento (Angiolillo *et al.*, 1999; Reale *et al.*, 2006).

Secondo stime di larga massima del COI (Consiglio Oleicolo Internazionale), circa il 30% degli oliveti nel mondo sono “moderni”, cioè relativamente giovani, intensivi, condotti abbastanza razionalmente e forniscono circa il 50% della produzione totale; la percentuale maggiore di oliveti sono “tradizionali” (circa il 50%) e forniscono il 40% della produzione; il restante 20% sono da considerarsi “oliveti marginali”, che forniscono il 10% della produzione globale e la cui

sopravvivenza è motivata, più che dalle potenzialità economiche, dalla multifunzionalità: salvaguardia idrogeologica, valorizzazione paesaggistica, integrazione del reddito (Luchetti, 2002).

La sua coltivazione in Italia è praticata in prevalenza al Mezzogiorno, dove è in coltura oltre l'80% della superficie nazionale e dove si produce l'85% della produzione italiana di olive. In Puglia viene raccolto circa tra il 30% del prodotto nazionale; nelle province salentine di Lecce e Brindisi sono investiti ad olivo 160.200 ha (per una produzione di 3.195.000 q) (ISTAT, 2020).

L'olivicoltura italiana si distingue da quella degli altri paesi mediterranei per la presenza di un enorme patrimonio genetico. In esso sono comprese varietà dalle molteplici caratteristiche biologiche e produttive, piante "migliorate" perché ottenute con interventi di ibridazione, di mutagenesi o da selezione clonale, e olivi secolari che sono presenti in gran numero negli impianti tradizionali e costituiscono una ricca riserva di biodiversità "autoctona".

Una caratteristica peculiare dell'olivo, che ne influenza la crescita e le pratiche agronomiche, è rappresentata dai ricchi complessi gemmari costituiti da gemme latenti e ammassi iperplastici di gemme avventizie (sferoblasti ed ovoli) ad elevato potenziale morfogenetico. Ad essi è legata la capacità di ricostituire, a seguito di decadimento del tronco principale, nuovi fusti e nuove radici con elevato grado di giovanilità (Barone & Di Marco, 2003).

Questa caratteristica specifica dell'olivo contribuisce a conferire a questa coltura una singolare capacità di rigenerazione dei tessuti e una longevità grazie alla quale possiamo oggi osservare esemplari con centinaia di anni di età e persino ultramillenni.

#### **1.1.6.2 L'olivo e le condizioni ambientali**

In riferimento alla temperatura, quasi tutti i processi metabolici sono alterati con temperature lontane da valori medi inferiori a 5°C o superiori a 35°C. Gli effetti delle alte temperature si manifestano soprattutto in mancanza di un'adeguata disponibilità idrica e con una ridotta traspirazione. Queste condizioni causano l'innalzamento della temperatura superficiale dei vari organi e determinano ustioni a livello fogliare, sul tronco e sulle branche. In ambienti caratterizzati da temperature estive medie giornaliere superiori ai 30°C, lo sviluppo vegetativo della pianta avviene in primavera e in autunno mentre rallenta, fino a fermarsi, in estate (Franchini *et al.*, 2006).

Oltre il 90% dell'olivicoltura mondiale è situata in ambiente mediterraneo. L'olivo, che è una specie adattata al lungo periodo di siccità estiva tipico di questo clima, è in grado di sopravvivere anche con precipitazioni annuali di appena 200 mm, mentre mal sopporta l'asfissia radicale (Costantini, 2006).

La capacità, cioè la quantità di acqua che i vari tessuti possono cedere dalle loro riserve al flusso traspirativo dell'olivo, è molto elevata e contribuisce così all'abbassamento del contenuto idrico e alla formazione di un elevato gradiente di potenziale tra foglie e radici. Tale gradiente permette alla pianta di assorbire acqua anche quando il potenziale del suolo raggiunge valori di -2,5 MPa (il punto di appassimento di molte specie arboree da frutto si verifica con un potenziale idrico di circa -1,5 MPa). Tuttavia, se nel periodo primaverile la nutrizione idrica è insufficiente, l'assorbimento dei nutrienti da parte delle radici è notevolmente ridotto, provocando un peggioramento della crescita vegetativa della pianta (Xiloyannis *et al.*, 1999).

#### **1.1.6.3 L'olivo e il suolo**

L'olivo è più tollerante, rispetto alla maggior parte dei fruttiferi, a carenze o eccessi di elementi nutritivi e a substrati pietrosi, aridi e poco fertili. I suoli sui quali cresce e produce generalmente sono meno profondi, più sciolti e con un'alta percentuale di componente litoide (pietrosità e scheletro) rispetto a quelli scelti per le altre colture (Costantini, 2006).

L'olivo si adatta bene in terreni privi di strati impermeabili all'aria e all'acqua, ben strutturati e con tessitura tendenzialmente "franca". Queste caratteristiche, che conferiscono sufficientemente

permeabilità e alta capacità di ritenzione idrica, assicurano l'intensità di scambi gassosi necessaria per lo sviluppo delle radici (Costantini, 2006).

Il passaggio dell'aria nei pori del terreno assicura la respirazione delle radici e dei microrganismi del suolo. Questa situazione favorevole allo sviluppo delle radici può divenire pregiudiziale se i pori del terreno sono scarsi oppure occupati dall'acqua (asfissia radicale) (Costantini, 2006).

L'olivo è una specie sensibile all'asfissia radicale e la sensibilità varia secondo la cultivar (Navarro & Parra, 2001); la resistenza della pianta dipende anche dall'età: alberi giovani, caratterizzati da un accrescimento molto attivo, possono non sopravvivere anche dopo pochi giorni (3 - 4) di permanenza delle radici sott'acqua. Condizioni di terreno saturo d'acqua possono verificarsi in inverno o in primavera per le abbondanti piogge o nei terreni dove si concentra l'acqua di scorrimento superficiale (fondivalle, depressioni), che sono quindi inadatte per la coltivazione dell'olivo.

Una caratteristica del suolo che induce la saturazione di acqua è la presenza di un orizzonte sottosuperficiale scarsamente permeabile e caratterizzato da un insufficiente drenaggio interno. Nei periodi di pioggia intensa, l'acqua, non percolando negli orizzonti sottostanti, impedisce l'aerazione del terreno; il suolo rimane saturo anche molto tempo dopo che le piogge sono terminate. Dove l'aerazione è limitata le radici non si sviluppano e sono prodotte ed accumulate sostanze tossiche per la pianta (Costantini, 2006).

In particolare negli ultimi anni, si sono verificati prolungati ristagni di acqua piovana in primavera, a causa delle ingenti piogge (Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2011) e delle operazioni di rullatura del terreno propedeutiche alla raccolta delle olive cascolate, che determinano forte compattamento del suolo con mancato assorbimento dell'acqua meteorica.

#### **1.1.6.4 L'olivo e i cambiamenti climatici**

L'utilizzo di modelli per prevedere la risposta alle condizioni climatiche previste per il prossimo futuro, ha evidenziato come l'olivo tenderà ad espandersi sempre più verso nord, raggiungendo le latitudini maggiori intorno alla fine del secolo (2100). Nei prossimi decenni il cambiamento delle condizioni climatiche, con aumenti di temperatura associati a prolungati periodi di aridità, potrebbe determinare variazioni senza precedenti nell'areale di coltivazione dell'olivo in tutto il bacino del Mediterraneo. Lo scenario attuale conferma le previsioni: stiamo assistendo a una graduale espansione dell'olivicoltura oltre il 45° parallelo (Moriondo, 2018).

La superficie totale investita a olivicoltura nel bacino del Mediterraneo è complessivamente aumentata di circa 60.000 ettari dal 2012 al 2017, ma il trend produttivo negli ultimi dieci anni segnala una graduale perdita di produzione con forte alternanza annuale dal 2014. Le cause sono molteplici: l'applicazione del disaccoppiamento nella politica agricola comunitaria e le forti oscillazioni che si riscontrano nei prezzi, specialmente sul mercato italiano, hanno sicuramente inciso sulle scelte dei produttori. Il cambiamento climatico potrebbe essere un'altra componente: numerose osservazioni pervenute dagli *stakeholders* in un workshop organizzato nell'ambito del progetto "Olive Miracle" (progetto di ricerca europeo sulle soluzioni modellistiche per le migliori strategie gestionali per l'olivicoltura contro i futuri cambiamenti climatici), hanno messo in evidenza un sostanziale impatto dell'andamento meteorologico sulla biologia della specie, in particolare sulla fenologia fiorale (Zelasco, 2018).

#### **1.1.6.5 Le varietà di *Olea europaea* nel Salento**

La presenza dell'olivo nel Salento risale all'età del bronzo (Primavera *et al.*, 2017), e nei millenni successivi ha sempre rappresentato una componente fondamentale dell'agricoltura e del paesaggio locale. La specie, introdotta in tempi remoti nella penisola salentina, ha trovato qui un habitat ideale e nei secoli si è adattata, dando origine a quella che ancora oggi viene definita "la foresta di olivi", in grado di trasformare profondamente il territorio.

Nella maggior parte dei casi, gli oliveti attualmente esistenti sono stati ottenuti innestando piante di olivo selvatico con marze di cultivar locali, ovvero Ogliarola Salentina e Cellina di Nardò.

Come confermano le notizie storiche, la composizione varietale dell'olivicoltura salentina è rimasta, nei secoli, sostanzialmente invariata, pur essendo caratterizzata da un germoplasma molto ricco di biodiversità. Con il tempo, l'evolversi delle tecniche di coltivazione, le mutate utilizzazioni del prodotto e, soprattutto, l'azione di fenomeni naturali (agenti climatici, patogeni, ecc.) hanno inciso sul patrimonio varietale in modo "disordinato". Alcune varietà sono state progressivamente abbandonate fino a scomparire, sostituite da altre che meglio rispondevano agli obiettivi della coltivazione e/o erano più dotate di capacità di adattamento alle tecniche colturali sempre più avanzate (Bruno, 2012).

Attualmente gli oliveti sono costituiti prevalentemente dalle due varietà autoctone per eccellenza: l'Ogliarola Salentina e la Cellina di Nardò, che rappresentano oltre il 90% degli impianti olivicoli salentini. Nel passato, invece, come rilevato in letteratura, la composizione dell'oliveto era ricca di cultivar sia a drupa piccola sia a drupa grossa (Bruno, 2012).

Il fatto che a distanza di secoli le tipologie "minori" non abbiano trovato diffusione, testimonia l'elevata specificità del patrimonio varietale salentino. (Cimato *et al.*, 2001).

Oltre a oliveti coetanei e della stessa cultivar ottenuti per propagazione clonale e allevati con spazi regolari, sono molti gli appezzamenti dove coesistono alberi di età diverse e le due cultivar prevalenti si mescolano. Inoltre è abbastanza frequente la presenza di alberi centenari, solitamente ottenuti per innesto di piante selvatiche della zona.

Gran parte degli oliveti sono tradizionali, risalendo come struttura a quelli del cinquecento/seicento, con un numero di alberi per ettaro che varia tra 80 e 120 (Cimato *et al.*, 2001); gli alberi sono allevati a vaso con tre o quattro branche principali, impalcati in genere ad altezze superiori al metro e mezzo. In Puglia, secondo dati SIAN del 2013, si concentra quasi il 40% di olivi secolari e monumentali sul totale nazionale (MIPAAF, 2015). Un patrimonio varietale così antico, che si è evoluto nel tempo attraverso la selezione antropica dei fenotipi più rispondenti e grazie all'incrocio con la sottospecie selvatica *O. europaea oleaster*, rappresenta un ricco serbatoio di biodiversità genetica (Fiorino, 1998).

Gli impianti più moderni, costituiti in genere con cultivar non autoctone, sono in aumento ma rappresentano una piccola percentuale rispetto agli oliveti tradizionali. Il 62% degli oliveti ha una densità d'impianto inferiore alle 200 piante per ettaro con sestri superiori a 7x7 m., solo il 9% ha sestri di 5x5 m o 6x6 m (Sardaro *et al.*, 2015).

Le due cultivar prevalenti producono un olio caratterizzato da un altissimo contenuto di polifenoli, se allevato con tecniche di coltivazione e raccolta razionali (Coco *et al.*, 2014). La loro produzione è regolamentata dalla Commissione Europea secondo le norme dell'Indicazione Geografica Protetta (IGP). La loro diffusione così ampia è dovuta ad un processo di adattamento plurisecolare alle condizioni ambientali e alla resilienza mostrata nella storia nei confronti di stress biotici ed abiotici di varia natura.

In relazione all'attuale sindrome da disseccamento rapido, la risposta di queste cultivar mostra una manifestazione dei sintomi non omogenea sul territorio. La diffusione della malattia, caratterizzata nei primi anni da un andamento a macchia di leopardo, sebbene sia ormai generalizzata, ancora oggi evidenzia un pattern irregolare, una discontinuità anche tra oliveti contigui (Scortichini, 2020a).

In particolare, la cultivar Cellina di Nardò, anche in test controllati ha mostrato reazioni fenotipiche diverse in base alle condizioni ambientali. In uno studio condotto tra il 2014 e il 2015 per verificare, tra l'altro, la suscettibilità di alcune varietà di olivo a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, piante di Cellina di Nardò inoculate con una sospensione del patogeno e mantenute in serra in condizioni di temperatura e umidità controllate e costanti, nel corso del tempo hanno evidenziato infezione a livello sistemico e gravi sintomi da disseccamento rapido dell'olivo (Saponari *et al.*, 2017).

In un esperimento parallelo condotto nell'ambito dello stesso studio, piante della medesima varietà, anch'esse inoculate artificialmente con *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ma allevate in serra aperta a condizioni ambientali naturali, hanno dato risultati diversi. In queste piante la concentrazione batterica era significativamente inferiore rispetto a quelle dell'esperimento effettuato in condizioni controllate; delle piante esposte alle condizioni naturali, 7 sono risultate positive al batterio nel punto di inoculo ma solo 3 sono state poi infettate a livello sistemico nei 12 mesi successivi. In nessuna di queste il batterio è stato rilevato nella porzione apicale dei germogli e nelle radici. Alcune piante hanno rivelato sintomi di disseccamento fogliare all'inizio della primavera, ma i sintomi non sono progrediti nel corso della stagione e sono rimasti confinati a poche foglie, mentre la nuova vegetazione dei mesi successivi è rimasta asintomatica; la lentezza della colonizzazione batterica era associata alla mancanza di sintomi.

La spiegazione dei ricercatori per queste differenti risposte di piante della stessa cultivar, è stata che "le basse e alte temperature che si verificano nell'area in cui è stato eseguito l'esperimento hanno influenzato significativamente la progressione delle infezioni e la colonizzazione batterica delle giovani piante inoculate artificialmente" (Saponari *et al.*, 2017). L'effetto delle diverse condizioni ambientali era chiaro.

Un altro aspetto interessante emerso dai dati di questo studio e meritevole di approfondimento, è che le piante di Cellina di Nardò infettate e allevate nella serra aperta sono cresciute in altezza più delle piante sane.

Appare importante, alla luce di questi dati, allargare il campo della ricerca anche agli effetti delle condizioni ambientali sullo sviluppo della malattia nelle piante di queste cultivar, che caratterizzano la quasi totalità degli oliveti della zona infetta.

L'importanza e il valore dell'olivicoltura in questa zona non è quantificabile solo in termini economici, ma anche in relazione alla caratterizzazione del tipico paesaggio dell'area mediterranea. L'olivo nel Salento rappresenta un elemento tutto interno alla cultura delle comunità che abitano il territorio, le quali sul rapporto con questa pianta millenaria dai molti utilizzi hanno costruito struttura sociale, identità, valori e tradizioni. Il connubio di tutte queste caratteristiche contribuisce fortemente a fare del Salento un agroecosistema che mette insieme storia, paesaggio, commercio e tradizioni sociali legate dall'olivicoltura, che rappresenta quindi una risorsa notevole per l'intero territorio.

#### **1.1.6.6 Principali avversità dell'olivo nel Salento**

Nell'ecosistema oliveto convivono circa 300 specie di parassiti, tra cui un centinaio tra funghi, batteri ed altri organismi dannosi. Ciononostante, esso può essere considerato, da un punto di vista fitosanitario, tra gli agroecosistemi più stabili, come dimostra la sua millenaria coltivazione nel bacino del Mediterraneo. Le cause di tale stabilità sono molteplici e molta attenzione deve essere rivolta al loro mantenimento (Iannotta *et al.*, 2012).

Tuttavia, specialmente in conseguenza di interventi antropici relativamente recenti (monocoltura, interventi chimici destabilizzanti, metodi di propagazione e operazioni colturali sanitariamente non corrette e altro) e di cambiamenti climatici, alcuni patogeni provocano malattie e danni tali da richiedere specifici interventi fitoiatrici, con la necessità di organizzare apposite strategie di difesa fitosanitaria (Iannotta *et al.*, 2012).

Contrariamente a molte altre specie legnose, in realtà l'olivo mostra una situazione fitopatologica relativamente semplice. Infatti, fra i patogeni, una sola specie batterica (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) e pochi funghi (*Spilocaea oleagina*, *Verticillium dahliae*, *C. gloeosporioides* – *C. acutatum*) hanno in passato assunto incidenza e diffusione tali da compromettere l'assetto vegetativo, la produzione o la stessa vitalità della pianta. Si segnalano, inoltre, altre malattie (marciume radicale, carie e fumaggine) dovute all'azione multipla di più agenti fungini appartenenti a generi diversi. Per quanto riguarda i virus, invece, sebbene isolati in cospicuo numero, non sono ancora del tutto definiti

i danni che possono provocare sulla produzione. In quanto alle singole malattie, notevole importanza riveste l'epidemiologia, per gli stretti legami esistenti tra la biologia del patogeno e le condizioni ambientali in cui vive l'ospite, oltre naturalmente ai rapporti ospite/parassita (Iannotta *et al.*, 2012). L'ampia distribuzione dell'olivo e le numerose diversità morfologiche e microclimatiche presenti, unite alla diversità di cultivar, determinano una notevole variabilità nella diffusione e nell'incidenza del danno provocato dai parassiti (Franchini *et al.*, 2006).

Le malattie dell'olivo possono essere fortemente condizionate dai cambiamenti climatici in atto, che possono influenzarne incidenza e gravità. Inoltre, l'alterazione della distribuzione geografica dell'olivicoltura può modificare la distribuzione spaziale dei patogeni e favorire l'emergere di nuove problematiche fitosanitarie (Graniti *et al.*, 2011).

La limitata dannosità dei fitofagi su questa specie spesso è da ricercare nel clima delle aree olivicole, nell'adattamento delle diverse cultivar e nella loro risposta alle infestazioni, nonché nell'elevata presenza di antagonisti naturali. Nell'oliveto, inoltre, non si sono verificate introduzioni frequenti di fitofagi esotici e la maggioranza delle specie non raggiunge, di norma, densità di popolazione tali da determinare perdite economiche, in quanto controllate da fattori biotici e abiotici (Rotundo & De Cristofaro, 2003). La fauna dell'agroecosistema è particolarmente complessa e differenziata in relazione alle diverse aree di coltivazione. Sono presenti numerose specie, in gran parte insetti, sia fitofaghe che entomofaghe (Rotundo & De Cristofaro, 2003).

Una peculiarità dell'olivo è la scarsa rilevanza fitosanitaria di afidi, acari, nematodi e la contenuta incidenza di malattie crittogamiche (Delrio, 1995).

Delle circa 50 specie di fitofagi più comuni, solo tre sono in grado di arrecare danni rilevanti alla produzione: *Bactrocera oleae* (Gmel.), *Prays oleae* (Bern.) e *Saissetia oleae* (Oliv.).

### **Avversità emergenti**

Il panorama fitosanitario dell'olivo, negli ultimi anni, in seguito alla siccità, al cambiamento nella quantità e distribuzione delle precipitazioni, all'aumento delle temperature, ha visto aumentare le segnalazioni di danni causati da funghi patogeni come la lebbra (*Colletotrichum gloeosporioides*) e da fitofagi secondari come la Cecidomia suggestiscorza (*Resseliella oleisuga*) (Vizzarri, 2018).

A ciò si aggiunga che, dopo millenni di sostanziale equilibrio nelle coltivazioni mediterranee, l'agroecosistema oliveto negli ultimi decenni ha subito un notevole attacco determinato dall'uso talora massiccio degli agrochimici, con conseguente destabilizzazione degli equilibri biologici e diffuso degrado ambientale (Iannotta, 2003).

Recentemente, in oliveti del Salento sono stati rinvenuti di frequente patogeni e parassiti secondari, quali: *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.), *Rosellinia necatrix* (Prill), *Zuzera pyrina* L., *Resseliella oleisuga* (Targ.-Tozz.), funghi responsabili della Carie del legno (D'Amico *et al.*, 2018; Nigro *et al.*, 2013; Assopoli Bari, 2016).

Che l'oliveto possa essere considerato, da un punto di vista fitosanitario, tra gli agroecosistemi più stabili, è dimostrato dall'incredibile longevità degli alberi e dalla loro millenaria coltivazione nel bacino del Mediterraneo (Iannotta *et al.*, 2012). La principale causa di tale stabilità è l'elevata adattabilità della specie dovuta alla variabilità genetica legata al gran numero di cultivar esistenti, alle modificazioni del genotipo fissate per via vegetativa e alle fluttuazioni nell'espressione dei caratteri varietali nei diversi ambienti. A ciò si aggiunge la capacità di risposta dell'albero alle infestazioni dei fitofagi, il clima delle aree di coltivazione, nonché l'elevata presenza di antagonisti naturali. Tali peculiarità rappresentano una risorsa endogena preziosa per gli olivicoltori, quindi molta attenzione deve essere rivolta al loro mantenimento (Rotundo & De Cristofaro, 2003).

La coltura dell'olivo, presente nel Salento da circa 4000 anni, ha subito nel corso del tempo diverse e gravi avversità. Verso la fine del Settecento e all'inizio del Novecento, alterazioni della chioma

hanno causato ingenti danni agli alberi coltivati principalmente nella parte occidentale della Penisola Salentina. La bruciatura fogliare (o “brusca”) osservata nel Salento era stata causata da un disturbo nell'approvvigionamento idrico degli olivi, la cui causa può essere di origine abiotica (“brusca non parassitaria”), dovuta a insufficiente umidità nel terreno, radici danneggiate, carenza di nutrienti, a venti caldi, secchi o salmastri; oppure di origine biotica (“brusca parassitaria”) determinata da deboli patogeni fungini come lo *Stictis panizzei* (De Not.) o da altri funghi o batteri invasori dello xilema che ostruiscono i vasi conduttori dell'acqua (Frisullo *et al.*, 2014). Tuttavia, l'agroecosistema olivicolo attaccato ha espresso la propria capacità di resilienza ed è tornato, in entrambi i periodi, alla sua precedente integrità.

Altre problematiche fitopatologiche di rilievo nel Salento a carico dell'olivo erano state segnalate nel 2006 dalle autorità fitosanitarie della regione Puglia, consistenti in disseccamenti sugli alberi, successivamente attribuiti a “Lebbra delle Olive” (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*). Le cause scatenanti la malattia furono ricondotte a mutamenti macro e micro climatici ed a condizioni agronomico-colturali; vennero quindi attivati campi sperimentali e infine definite strategie di controllo sotto forma soprattutto di misure agronomiche (Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2011).

Ulteriori approfondimenti in relazione a informazioni sulle esigenze pedoclimatiche, sulle cultivar e sulle avversità sono reperibili nell'[Appendice 1](#).

### 1.1.7 L'ambiente

Vengono di seguito esaminate alcune caratteristiche generali dell'ambiente di coltivazione dell'olivo nel Salento, con riferimento al clima, alle acque e al suolo. Questi argomenti sono ulteriormente approfonditi nell'[Appendice 2](#).

#### 1.1.7.1 Il clima

L'olivo è una delle specie arboree più importanti nel bacino del Mediterraneo, la cui coltivazione è fortemente condizionata dal clima

A livello globale si è evidenziato che: a) la presenza della specie di olivo può essere considerata come uno dei migliori indicatori del clima Mediterraneo, mentre la sua area di coltivazione può essere utilizzata come bioindicatore in relazione ai futuri cambiamenti climatici in tutto il bacino; b) nei prossimi decenni il cambiamento delle condizioni climatiche, con aumenti di temperatura associati a prolungati periodi di aridità, potrebbe determinare variazioni senza precedenti nell'areale di coltivazione dell'olivo in tutto il bacino del Mediterraneo (Moriondo, 2018).

La penisola salentina, per la sua posizione geografica compresa tra il mar Jonio e quello Adriatico, per la sua ampiezza limitata, per il suo enorme sviluppo costiero e per l'assenza di veri e propri rilievi montuosi, ad eccezione del limitato e basso sistema collinare delle Serre, è caratterizzata da un particolare clima notevolmente differenziato rispetto al clima regionale (Macchia, 1984).

Il clima del Salento è di tipo termomediterraneo, caratterizzato da estati calde e poco piovose ed inverni non eccessivamente freddi e mediamente piovosi, con abbondanza di precipitazioni durante la stagione autunnale.

Le estati fanno registrare temperature medie comprese fra i 25°C ed i 30°C e punte di oltre 40°C nelle giornate più calde. Sul versante ionico, durante il periodo estivo, si possono raggiungere temperature particolarmente elevate, anche superiori a 30 - 35°C per lungo tempo. Gli inverni sono relativamente temperati e la temperatura scende di rado sotto lo 0°C (Cotecchia, 2017).

### Le precipitazioni piovose nel Salento

I dati pluviometrici rilevano precipitazioni particolarmente abbondanti verso il Salento meridionale, con valori massimi superiori a 850 mm annui, che però diminuiscono procedendo verso i limiti settentrionali del Salento, a meno di 650 mm; il settore ionico presenta i valori annui di precipitazioni più bassi, con 600 mm a Nord di Gallipoli, evidenziando due fasce pluviometriche sugli opposti versanti, jonico ed adriatico (Carlino, 2010).

In linea generale, nella penisola salentina le precipitazioni hanno un comportamento stagionale anomalo: è possibile rilevare, infatti, un solo valore massimo molto elevato durante l'inverno e una quasi assenza di pioggia durante l'estate, che determina un'accentuata aridità (Zito *et al.*, 1991). In estate è possibile che si verifichino rari eventi di pioggia intensa molto concentrati, ma di breve durata. Questo clima fa sì che alla ricarica degli acquiferi contribuiscano significativamente solo le precipitazioni del tardo periodo autunnale e quelle invernali. Le precipitazioni del primo autunno e quelle estive, infatti, contribuiscono a ricostituire il contenuto d'acqua solo negli strati più superficiali; quelle estive, inoltre, vanno perse in modo significativo anche per evapotraspirazione. Gli eventi di pioggia abbondanti ma concentrati, con precipitazioni di breve durata e notevolissima intensità influiscono in maniera rilevante e negativa sui meccanismi di infiltrazione dell'acqua e sulla disponibilità delle risorse idriche sotterranee (Cotecchia, 2017).

L'andamento delle precipitazioni rilevato per le stazioni pluviometriche del Salento mostra in maniera evidente la riduzione delle precipitazioni registrata tra la fine degli anni Settanta e l'inizio dei Novanta, cui segue una fase di precipitazioni stabili (Cotecchia, 2017).

Nel Salento la riduzione complessiva delle precipitazioni e la contemporanea accresciuta intensità delle stesse, unitamente ai prolungati periodi di assenza di piogge nel periodo estivo, stanno determinando un'insufficiente ricarica degli acquiferi e la carenza di disponibilità delle risorse idriche sotterranee (Cotecchia, 2017).

A questa situazione che determina periodi di siccità prolungata, con ricadute negative sulla produttività e sullo sviluppo delle colture, si associa il problema del ridotto assorbimento da parte del suolo della copiosa quantità d'acqua riversata dai sempre più frequenti fenomeni anomali.

### Effetti dei cambiamenti climatici sulla produzione e sullo stato fitosanitario degli olivi

Il clima influenza l'incidenza e la distribuzione temporale e spaziale delle malattie delle piante. Esso condiziona tutte le fasi della vita del patogeno e dell'ospite e pone una sfida a molti patosistemi. Il cambiamento ambientale, soprattutto se combinato con l'introduzione di agenti patogeni e ospiti, può portare a effetti senza precedenti (Ahanger *et al.*, 2013).

Si riscontra da alcuni anni una crescente recrudescenza di diversi patogeni e parassiti, alcuni già noti, altri che fino ad ora non erano considerati particolarmente dannosi (Fila, 2018).

Negli ultimi anni le precipitazioni di elevata intensità sono aumentate in tutto il bacino del Mediterraneo (Polade *et al.*, 2017). Nel Salento questi eventi estremi hanno frequentemente prodotto danni diretti alla vegetazione a causa della grande quantità di pioggia caduta in poche ore, talvolta accompagnata da grandine e vento forte; ciò può causare lesioni agli alberi e favorire la colonizzazione di fitopatogeni, come *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Scortichini, 2020b).

Inoltre, a causa del suolo fortemente compattato negli oliveti, dovuto ad errate pratiche agronomiche, si è verificata in diverse annate una prolungata permanenza dell'acqua piovana negli appezzamenti, con conseguenze negative indirette per la fisiologia degli alberi.



Figura 1.12 Oliveto in provincia di Lecce con allagamento prolungato in seguito a precipitazioni intense verificatesi in breve tempo; il suolo estremamente compatto non permette all'acqua di infiltrarsi. (Scortichini, 2020b)

Questa situazione favorisce inoltre lo sviluppo di funghi fitopatogeni, contribuendo ad uno stato di deperimento generalizzato degli olivi. In particolare, come documentato per alcune zone del Salento dall'Osservatorio Fitosanitario Regionale, le condizioni climatiche caratterizzate da abbondanti piogge verificatesi per due anni consecutivi, nel 2009 e 2010, hanno favorito lo sviluppo degli agenti della “Lebbra delle olive” (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*). Le cause sono state attribuite a eventi non prevedibili, come quelli climatici, ma anche a condizioni agronomiche che contribuiscono a favorire le infezioni dei funghi. Il progressivo abbandono delle corrette tecniche agronomiche, quali la potatura almeno biennale con aerazione della chioma, e la diffusa pratica della raccolta delle olive da terra, sono state individuate dalle autorità fitosanitarie regionali come cause predisponenti la diffusione e la virulenza della malattia (Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2011).

L'elemento climatico che negli ultimi anni ha inciso maggiormente nella penisola salentina – con diversa modulazione tra le varie zone – è la siccità estiva, determinata da elevate temperature congiunte ad assenza di pioggia e a venti caldi. Nel periodo luglio-agosto 2015 per più di 40 giorni consecutivi la temperatura massima nelle aree della provincia di Lecce è stata di 1–4° C superiore ai record storici per l'area, mentre nell'estate 2017, nelle stesse zone, la piovosità totale è stata di solo 7,8 mm dal 1° giugno al 30 agosto (Scortichini *et al.*, 2018). La siccità rappresenta uno dei fattori più critici per il mantenimento delle colture nel bacino del Mediterraneo (Brito *et al.*, 2019), poiché provoca una diminuzione del contenuto di acqua fogliare, con conseguente perdita di turgore e associata riduzione della fotosintesi. Il potenziale xilematico diminuisce e ciò può determinare un aumento della cavitazione, che può causare embolia e l'interruzione del trasporto dell'acqua dalla radice alla chioma (Fernández *et al.*, 2006).

Tali eventi climatici avversi e ricorrenti possono indebolire le piante e predisporle negativamente a perturbazioni biotiche e abiotiche, includendo eventualmente anche il “disseccamento rapido dell'olivo”.

La stretta connessione delle variabili bioclimatiche con lo sviluppo e la diffusione di *X. fastidiosa* è stata evidenziata da diversi studi (Godefroid *et al.*, 2018; Bosso *et al.*, 2016) che sulla base di numerosi parametri climatici hanno previsto la sua potenziale ulteriore diffusione.

### 1.1.7.2 L'acqua

#### Area idrogeologica del Salento

Per la sua natura carsica, il Salento è privo di reti idrografiche organizzate. Sono diffusi, tuttavia, canali di drenaggio che sfociano a mare e in specchi d'acqua salmastra o, nelle zone interne della penisola, in inghiottitoi carsici e in doline di crollo ingegnerizzate.

Le riserve idriche sotterranee del Salento e, in particolare, quelle dell'acquifero carbonatico profondo hanno rappresentato nell'ultimo secolo la principale fonte per la crescita del settore agricolo dell'area, oltre che costituire la risorsa basilare per il settore potabile, contribuendo quindi allo sviluppo socio-economico di questa terra.

La falda profonda è soggetta, tuttavia, a un'intensa e incontrollata attività estrattiva, spesso condotta in forma abusiva, responsabile nel tempo della riduzione di spessore della lente di acqua dolce e del conseguente incremento della concentrazione salina delle acque di falda. Verosimile diventa dunque lo scenario di un futuro, neppure troppo lontano, in cui ci si dovrà confrontare con un'autentica catastrofe idrogeologica, indotta dalla progressiva e incontrollata ingressione dell'acqua marina nel continente (Delle Rose *et al.*, 2003).

Negli ultimi decenni, una progressiva e preoccupante crescita della salinità dell'acqua della falda profonda ha interessato il Salento (Cotecchia *et al.*, 1986; Tulipano & Fidelibus, 1989; Federico, 1999).

La salinizzazione delle acque della falda profonda del Salento è un fenomeno molto più preoccupante rispetto alle altre forme d'inquinamento prodotte dalle attività antropiche (Napoli & Vanino, 2011).

Nel Salento le pressioni sulle acque superficiali sono causate in buona parte dalle attività agricole che, in seguito al consumo di idrico per l'irrigazione, determinano l'assottigliamento delle falde e la loro salinizzazione e ne alterano i parametri chimici con l'uso di pesticidi e nitrati.

La situazione idrica del Salento sta diventando sempre più grave e questo ha una ricaduta diretta sullo stato del suolo e delle piante coltivate.

#### Olivo e stress idrico

L'olivo riesce a tollerare la carenza idrica attraverso una serie di adattamenti anatomici, fisiologici e biochimici.

La capacità dell'olivo di non risentire eccessivamente della carenza idrica è legata alle caratteristiche fisiche del suolo: se questo è in struttura, sarà in grado di fornire alla pianta l'acqua necessaria nel periodo secco.

Nel Salento, a causa delle operazioni necessarie per la raccolta delle olive da terra, una grandissima parte delle aziende olivicole applica una sequenza di lavorazioni che danneggiano lo stato strutturale del terreno. L'effetto, soprattutto dopo molti anni di tale gestione, è un suolo tenacemente compattato, impermeabile all'aria e all'acqua, con ridotta attività microbiologica. Questo terreno non è in grado di immagazzinare le acque meteoriche del periodo autunno-invernale, anche perché, a causa dei cambiamenti climatici, le precipitazioni assumono spesso caratteri di fenomeni estremi con grandi quantità d'acqua piovute in poco tempo.

Nel Salento tale situazione è resa ancor più grave dalle ridotte riserve idriche del suolo e dalla progressiva e crescente salinizzazione degli acquiferi. In queste condizioni, le piante sono indebolite e più esposte ad eventuali stress abiotici e biotici, favorendo tra l'altro lo sviluppo di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (D'attoma *et al.*, 2019).

Infatti, sebbene i sintomi dello stress idrico indotti da *X. fastidiosa* nella vite siano quantitativamente e qualitativamente diversi da quelli indotti dalla ridotta disponibilità di acqua, è stato dimostrato che condizioni di stress idrico esterno favoriscono lo sviluppo della malattia (McElrone *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2013).

Anche su caffè i sintomi da *X. fastidiosa* sono più gravi in condizioni di stress idrico, mentre in primavera l'aspetto della pianta torna a migliorare con produzione di nuovi germogli; gli alberi generalmente non muoiono o solo dopo alcuni anni (De Lima *et al.*, 1998). Negli Agrumi, lo stress idrico può aggravare i sintomi di CVC (Janse & Obradovic, 2010).

Janse e Obradovic (2010), sulla base di studi condotti su più specie vegetali (vite, caffè, agrumi, pesco ed altri ospiti), hanno riscontrato che una volta che una pianta è stata infettata da *X. fastidiosa*, gli stress sono spesso fattori determinanti nello sviluppo dei sintomi; di conseguenza, le pratiche colturali dovrebbero essere indirizzate a tutelare la salute complessiva delle piante e a fornire un'alimentazione adeguata per garantirne la crescita (Janse & Obradovic, 2010). Si conferma, quindi, l'importanza delle tecniche colturali per ridurre gli stress e lo sviluppo dei sintomi della malattia.

### **1.1.7.3 Il suolo**

Le peculiari caratteristiche pedologiche del Salento vanno considerate congiuntamente alla profonda azione antropica sull'uso del suolo, operata principalmente per le attività agricole, industriali o per rendere abitabili zone inospitali.

La penisola salentina rientra nella zona pedoclimatica delle *terre rosse* o delle *terre brune* dei luoghi semiaridi. Sono suoli dallo scarso spessore, e questa loro superficialità è accompagnata spesso dalla presenza di roccia affiorante, anche nei luoghi pianeggianti, o da abbondante materiale assai grossolano (scheletro). Inoltre, sono caratterizzati da un elevato grado di aridità, che deve oramai essere considerato per l'intera penisola salentina come uno "stato naturale", determinato oltre che da una forte antropizzazione, anche da fattori generali e da alcuni locali (Carlino, 2010).

La particolare morfologia della regione incrementa notevolmente il grado di aridità generale di queste terre, collocandole fra quelle idricamente più povere (Battista *et al.*, 1987).

#### La degradazione del suolo

Le funzioni del suolo possono essere seriamente compromesse da una serie di fenomeni, derivanti in gran parte dalle azioni antropiche, sino a giungere all'ultimo stadio della degradazione: la desertificazione (APAT, 2008).

Il fenomeno della desertificazione del suolo è un processo irreversibile che interessa i suoli soggetti a svariati rischi e minacce, quali l'*erosione*, la *diminuzione di materia organica*, la *contaminazione* locale o diffusa, l'*impermeabilizzazione (sealing)*, la *compattazione*, l'*erosione della biodiversità*, la *salinizzazione*, le *alluvioni* e gli *smottamenti*. Quando questi rischi s'innestano su condizioni climatiche aride o semiaride, il suolo perde di fertilità e diventa suscettibile al processo di desertificazione (Lacarbonara, 2012).

Sulla base di indici riferiti a clima, suolo, copertura vegetale e gestione del territorio, l'applicazione della metodologia ESA (Kosmas *et al.*, 1999) fornisce una valutazione delle aree sensibili alla desertificazione e al degrado del territorio in Italia. Tutte le regioni hanno aree sensibili ma con gradi d'intensità e con estensione delle aree interessate diverse. Tra le regioni con una percentuale di territorio "molto sensibile", superiore alla media nazionale, vi è anche la Puglia.

Nel futuro con elevata probabilità i cambiamenti climatici avranno un forte impatto sui processi di desertificazione, a causa del progressivo assottigliarsi delle riserve idriche e dell'aumento degli eventi siccitosi, di cui peraltro non esiste ancora un quadro conoscitivo esaustivo (Castellari *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda il fenomeno dell'erosione, particolarmente delicata è la situazione dei paesaggi delle Murge e del Salento, con molte aree completamente prive di suolo, soprattutto nelle zone con pendenze accentuate (Bellino, 2008).

La diminuzione di materia organica nel suolo desta particolari preoccupazioni nelle zone mediterranee (Commissione Europea, 2006) perché influenza fortemente le proprietà fisico-chimiche e biologiche e quindi la capacità produttiva del suolo (Castellari *et al.*, 2014).

Il contenuto di sostanza organica nei suoli viene influenzato dalle tecniche di lavorazione, oltre che dall'andamento climatico, che nel Salento è abbastanza arido e soleggiato per lunghi periodi durante le stagioni calde. Ciò facilita fenomeni di rapida mineralizzazione che portano ad abbassamenti del contenuto in sostanza organica (APAT, 2008).

Le coste del Salento, come la maggior parte delle aree costiere italiane, sono interessate dall'intrusione salina, generalmente attribuita al sovrasfruttamento degli acquiferi e al conseguente abbassamento dei livelli di falda (INEA, 2011).

I principali fattori che nel Salento contribuiscono al fenomeno della salinizzazione sono dovuti alla particolare lunghezza delle coste, alla geologia e morfologia del territorio, al forte utilizzo delle acque di falda a scopi agricoli, industriali e civili e ai lunghi periodi di siccità (APAT, 2008).

La diminuzione della biodiversità espone maggiormente il suolo ad altri processi di degrado. La biodiversità è quindi utilizzata come indicatore complessivo dello stato di salute del suolo.

L'attività biologica nel suolo dipende in larga misura dalla presenza di adeguate concentrazioni di materia organica; l'uso inadeguato di pesticidi può avere effetti molto negativi per via della loro scarsa selettività: alcuni studi indicano che determinati erbicidi sopprimono in maniera significativa l'attività di funghi e batteri (Commissione Europea, 2006, *Strategia tematica per la protezione del suolo*).

La compattazione si verifica quando il suolo è soggetto a pressioni meccaniche in seguito all'uso di macchinari pesanti o al pascolamento eccessivo, soprattutto se umido.

Il deterioramento complessivo della struttura del suolo provocato dalla compattazione limita la crescita delle radici, la capacità di stoccaggio dell'acqua, la fertilità, l'attività biologica e la stabilità. Inoltre, in caso di precipitazioni intense, l'acqua non riesce più a infiltrarsi facilmente nel suolo (Commissione Europea, 2006, *Strategia tematica per la protezione del suolo*).

La compattazione del suolo nel Salento, insieme all'erosione e alla diminuzione del contenuto di sostanza organica, sono effetti dovuti alle pressioni esercitate da lavorazioni agricole non razionali. Ciò è in grado di determinare, tra gli altri impatti, una diminuzione delle funzioni del suolo e una modificazione della stabilità degli ecosistemi (Iannetta & Trotta, 2008).

Nell'area delle Murge e del Salento, dove i suoli presentano il regime idrico e termico caratteristico dei suoli di tipo xerico secco-termico, sono in atto diversi processi degenerativi.

I suoli di queste aree sono classificati di III, IV e V classe, a causa dello scarso spessore, della rocciosità e dell'aridità.

Nel Salento lo stato di salinizzazione dei suoli è dovuto alla pressione esercitata dalle irrigazioni con acque salmastre e dallo sfruttamento eccessivo degli acquiferi costieri. Le lavorazioni non razionali determinano erosione, compattazione e diminuzione della sostanza organica.

#### **1.1.7.4 Linee di intervento**

La copertura vegetale gioca un ruolo determinante nella conservazione del suolo. Buona parte del territorio è caratterizzata da una copertura vegetale fortemente disturbata dalle attività antropiche, che rende il territorio più sensibile a fenomeni di degrado (Castellari *et al.*, 2014).

Alla ridotta estensione della vegetazione naturale si aggiunge una gestione non sempre razionale delle specie coltivate. Per quanto riguarda l'olivicoltura, sono diverse le pratiche agricole sotto accusa nei processi di degrado del suolo.

La fertilizzazione organica degli oliveti è diventata una pratica rara nel contesto salentino e sono diminuite di molto le superfici ove viene praticato il sovescio o l'inerbimento controllato.

Nell'ultimo decennio è venuta meno anche la restituzione al suolo della sostanza organica proveniente dai residui di potatura; infatti, a causa della sempre più ridotta redditività della coltura e dell'elevato costo della manodopera, i contratti con le ditte contoterziste di potatura prevedono molto spesso l'asportazione dall'appezzamento del legname, quale parziale compenso per il lavoro effettuato.

In tutta l'area negli ultimi decenni sono diventate rare le erpicature leggere della superficie del suolo, mentre la strategia di contenimento delle infestanti è incentrata sull'utilizzo di erbicidi, principalmente glifosato, che ha anche la funzione di coadiuvante nel preparare il terreno per la raccolta del prodotto (Collavo, 2012). Questa tipologia di gestione, se eseguita per un lungo periodo e più di una volta l'anno, può avere effetti negativi sugli olivi: il ripetuto e massiccio utilizzo di erbicidi negli anni diminuisce la disponibilità e il contenuto complessivo di materia organica, azoto e fosforo nel suolo (Ferreira *et al.*, 2013); può immobilizzare micronutrienti (Glass, 1984) e determinare una ridotta assimilazione di zinco e rame nella pianta (Serra *et al.*, 2011). Un altro impatto ecologicamente grave si sostanzia nell'alterare l'assetto microbico del suolo a vantaggio dei patogeni (Kremer *et al.*, 2005; Kremer & Means, 2009).

L'elevato consumo di diserbanti nel Salento è documentato da uno studio basato su dati ISTAT, secondo il quale tra il 2003 e il 2009 nella provincia di Lecce è stata impiegata una quantità per ettaro di erbicida fino a due volte superiore rispetto alla provincia di Bari e fino a quattro volte la provincia di Foggia (Ciervo, 2016).

È evidente che una situazione di degrado del suolo e della sua fertilità fisica, chimica e biologica può avere una ricaduta negativa anche sulla salute delle piante: le condizioni ambientali possono influenzare profondamente la pianta anche quando affronta una malattia e la corretta gestione del suolo è fondamentale per applicare strategie efficaci di controllo dei patogeni (Keane and Kerr, 1997; Ghorbani *et al.*, 2008). L'alterazione delle funzioni del suolo viene amplificata se concorrono anche una fragilità delle condizioni climatiche ed una situazione idrologica critica: in questo quadro ambientale di modificazione della stabilità degli ecosistemi, le piante possono essere maggiormente esposte a stress di diversa natura.

## 1.2 Il patogeno: *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*)

*Xylella fastidiosa* è un batterio fitopatogeno Gram negativo che appartiene alla famiglia delle *Xanthomonadaceae* (classe *Gammaproteobacteria*). L'etimologia del nome mette a fuoco due aspetti fondamentali della sua biologia: *Xylella* deriva dal greco ξύλον che significa *legno*, indicando la nicchia biologica del patogeno all'interno delle sue piante ospiti, cioè lo xilema; in batteriologia i “*fastidious bacteria*” sono batteri con esigenze nutrizionali complesse e per questo refrattari alla coltivazione *in vitro* (Stefani & Boscia, 2019).

La vigente normativa europea indica *X. fastidiosa* quale organismo da quarantena, contro il quale è obbligatoria la lotta. Inizialmente compresa nella lista A1 dell'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) dove sono presenti gli organismi da quarantena assenti nella regione EPPO, da settembre 2017 è stata spostata nella Lista A2, contenente gli organismi da quarantena presenti ma non ampiamente diffusi nella regione (*Xylella Fastidiosa (XYLEFA)[Categorization]/EPPO Global Database*).

In termini storici, il patogeno ha fatto la sua prima comparsa nel 1882 su piante di vite in California; i danni da *Xylella* su vite cominciarono a farsi evidenti e a richiamare l'attenzione degli scienziati nel 1885 e raggiunsero dimensioni epidemiche già nel 1887. Dal primo sito la malattia si è poi diffusa ad altre contee della California e successivamente anche ad altri 28 Stati degli USA e al Canada, su piante anche diverse dalla vite (Surico, 2015).

Il primo allarme, poi rivelatosi infondato, sulla possibilità che *X. fastidiosa* potesse essere presente in Europa, fu dato da alcuni ricercatori francesi nel 1989. Dopo un successivo caso dubbio in Kosovo nel 1998, nell'ultimo decennio ci sono state nuove segnalazioni nel Mediterraneo orientale come Turchia, Libano, Iran. Nell'ottobre 2013 l'Italia ha notificato il ritrovamento di *X. fastidiosa* nel Salento (Puglia); nel luglio del 2015 la Francia ha comunicato il ritrovamento del patogeno in Corsica, seguita dalla Spagna nel 2016, che ne ha rilevato la presenza sull'isola di Maiorca su ciliegio. Infine, nel 2018 *X. fastidiosa* è stata ritrovata su mandorlo in Israele e nell'ottobre 2019 in Portogallo su lavanda. La presenza ufficializzata di *X. fastidiosa* in Europa riguarda quindi: Italia, Francia, Spagna, Portogallo ed altri Paesi con casi sporadici, quasi sempre eradicati (Stefani & Boscia, 2019).

La vasta distribuzione geografica, la molteplicità delle piante ospiti colpite da malattia, le analisi filogenetiche dei ceppi batterici isolati e caratterizzati, indicano che *X. fastidiosa* è presente in Europa da oltre un decennio (Stefani & Boscia, 2019).

La diffusione a livello globale del batterio, l'ampia gamma degli ospiti, i numerosi insetti che fungono da vettori, testimoniano l'elevata capacità di ricombinazioni tra le sottospecie, le quali sono a loro volta differenziate in sub-popolazioni con diversità di caratteristiche: ciò raffigura un'incredibile plasticità genetica del patogeno, un'alta capacità di adattamento e caratteristiche biologiche peculiari dei diversi ceppi, come la patogenicità su ospiti specifici e la simbiosi con diversi insetti vettori (Stefani & Boscia, 2019).

Attualmente sono state classificate quattro sottospecie di *X. fastidiosa*, ciascuna specifica per una particolare gamma di piante ospiti e una zona nativa. Queste sono: *fastidiosa*, che causa, tra le altre, la Malattia di Pierce (PD) sulla vite e la Bruscatura fogliare infettiva del mandorlo (SLA) nell'America settentrionale e centrale; *sandyi* che causa Bruciatura delle foglie dell'oleandro (OLS) in California; *multiplex* (polifaga), associata a malattie da bruciatura di un'ampia gamma di alberi: mandorlo, pesco, albicocco, susino, quercia, platano, olmo in Sud America, olivo in California; *pauca* (pochi ospiti), che si trova principalmente in Sud America su caffè, olivo ed agrumi (Clorosi variegata degli agrumi, CVC) e in Italia su Olivo (Complesso del disseccamento rapido dell'olivo, CoDiRO). Sono state proposte due sottospecie aggiuntive: *morus*, che include isolati che infettano il gelso (Nunney *et al.*, 2014), e *tashke*, da *Chitalpa tashkentensis* negli Stati Uniti sudoccidentali (Randall *et al.*, 2009).

Il genotipo di *X. fastidiosa* rinvenuta nel Salento è la subsp. *pauca* (ST. 53) che, oltre l'olivo, può infettare altre 33 specie, tra piante coltivate e spontanee, appartenenti a 16 famiglie botaniche (Stefani & Boscia, 2019).

All'interno delle sottospecie di *X. fastidiosa* sono individuabili, come detto, comportamenti patologici specifici: ceppi patogeni per la vite non attaccano il pesco ma attaccano il mandorlo e l'erba medica; quelli patogeni del mandorlo appartenenti alla subsp. *fastidiosa* attaccano anche la vite, mentre quelli della subsp. *multiplex* non l'attaccano. Altri ceppi infettano talune piante senza causare sintomi. Le sottospecie di *Xylella fastidiosa* differiscono fra loro per la cerchia di ospiti e, all'interno della stessa sottospecie, genotipi diversi attaccano o possono attaccare ospiti diversi (Surico, 2015).

La sottospecie *pauca* individuata nel Salento, ad esempio, diversamente da quella del Brasile, attacca l'olivo, il mandorlo, il ciliegio ed altre specie: per la numerosità degli ospiti, sembra avvicinarsi al comportamento della sottospecie polifaga *multiplex* (Surico, 2015).

Nell'ultimo decennio si sono verificati ripetuti eventi d'introduzione di differenti ceppi da diverse sottospecie in diversi paesi europei e diversi genotipi di questa specie batterica altamente adattabile hanno improvvisamente trovato le condizioni giuste per sopravvivere in nuovi ambienti, come nel caso della Spagna, della Francia e dell'Italia (EPPO, 2019).

In un tale scenario, l'incontro fortuito di diversi genotipi che portano a eventi di ricombinazione omologa intra- e inter-subspecifica è possibile, come già avvenuto con la subsp. *morus*, di recente diffusione negli USA, risultato di ricombinazione omologa inter-subspecifica tra la sottospecie *multiplex*, endemica, e la sottospecie *fastidiosa* proveniente dal Costa Rica (Nunney *et al.*, 2014). Ciò prospetta il rischio che si possano generare forme più virulente o nuovi patotipi (Feil & Spratt, 2001; Nunney *et al.*, 2014).

Sulla base della valutazione che *X. fastidiosa* subsp. *pauca* sia presumibilmente presente nel Salento da almeno un decennio, alcuni autori ipotizzano che forze microevolutive abbiano già potuto iniziare a produrre qualche variazione nella popolazione di questo patogeno geneticamente molto plastico (Ramazzotti *et al.*, 2018).

Già diversi anni fa alcuni ricercatori avevano previsto che nuove malattie da *X. fastidiosa* sarebbero state segnalate in futuro nel mondo, in quanto nuovi incontri tra patotipi si sarebbero verificati a seguito dei movimenti antropici del patogeno, dei vettori e degli ospiti vegetali e i ceppi esistenti si sarebbero evoluti per colonizzare nuovi ospiti (Purcell & Hopkins, 1996).

### 1.2.1 Sintomatologia, biologia e trasmissione

Sull'olivo i sintomi del declino si manifestano inizialmente con necrosi marginali o apicali delle foglie, che si allargano poi all'intera lamina fogliare, e con disseccamenti localizzati di rami e piccole branche. Le foglie non cadono e permangono fino alla stagione autunnale, mentre i rami colpiti disseccano progressivamente, aumentando di numero e dimensione. Gradualmente i sintomi arrivano ad interessare ampie porzioni della chioma. Lo sviluppo dell'intera pianta rallenta e diminuisce il vigore; gli alberi colpiti, infine, deperiscono e muoiono (Martelli, 2016b). La malattia dell'olivo osservata in Salento è stata chiamata "Complesso del Disseccamento Rapido dell'Olivo" (CoDiRO). Nonostante l'indicazione data dal nome, può intercorrere un periodo anche di due o più anni dall'infezione iniziale, perché un olivo possa deperire del tutto (Martelli *et al.*, 2016; Scortichini, 2020b).

I sintomi iniziali sugli alberi di olivo ascrivibili a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* non sono specifici, essendo conseguenti al mancato trasporto di acqua e soluti alla chioma; in generale, gli ostacoli al flusso xilematico possono essere prodotti dal biofilm batterico o da ostruzioni e danni provocati da altri patogeni e fitofagi. Un ruolo centrale in questo processo è svolto dalla produzione di gomme e tille che la pianta genera per ostacolare la diffusione nello xilema dei parassiti vascolari (Matta *et al.*, 2017). La presenza di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* può essere verificata con appropriati esami di laboratorio (Giunta Regionale Puglia, 2013).

La trasmissione di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* alle sue piante ospiti avviene con l'ausilio di insetti vettori: sono state individuate decine di specie di potenziali vettori tra *Cicadellidae*, *Aphroforidae* e *Cercopidae*.

Questi insetti sono xilemofagi che attingono il loro nutrimento dai vasi conduttori attraverso punture del tessuto vegetale che raggiungono il vaso xilematico con il relativo flusso di linfa. Gli omotteri menzionati hanno come caratteristica comune quella di possedere un apparato boccale pungente-succhiante. Durante la puntura di suzione, il vettore può acquisire il batterio eventualmente presente nel vaso xilematico e può trasmetterlo a piante sane nelle successive punture di alimentazione (G. P. Martelli *et al.*, 2016).

In Puglia sono stati identificate tre specie di insetti in grado di veicolare il batterio: il primo ad essere scoperto ed il più importante è *Philaenus spumarius* (Sputacchina media), cui si sono successivamente affiancati *Neophilaenus campestris* e *Philaenus italosignus* (Cavaliere *et al.*, 2018). Le forme giovanili delle tre specie di vettori più importanti svolgono il loro ciclo su specie erbacee, immerse nella spuma da loro prodotta; gli adulti vivono liberi nell'ambiente, spostandosi, da fine aprile a novembre, fra diverse piante erbacee o legnose. Pertanto, il comportamento degli insetti vettori è importante dal punto di vista epidemiologico. Gli insetti vettori di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* sono perlopiù polifagi, quindi un notevole ruolo epidemiologico viene assolto dalle cosiddette piante serbatoio, dove il batterio può essere presente, spesso in forma latente, e dalle quali il vettore può prelevare e trasmetterlo alle sue piante ospiti (Stefani & Boscia, 2019).

In aree d'insediamento della malattia, le piante ospiti infette costituiscono un inoculo primario per la diffusione dell'infezione. L'inoculo primario può essere presente anche negli insetti vettori, che in tal modo possono avviare nuovi cicli infettivi della malattia in aree sempre diverse: in Puglia, è stato verificato che gli insetti vettori in alcuni casi possono diffondersi anche per diversi chilometri. In particolare, le sputacchine sono state definite "autostoppisti", cioè insetti che frequentemente si spostano da un territorio all'altro grazie al movimento di persone o cose con veicoli di ogni tipo (Stefani & Boscia, 2019).

Nelle piante ospiti *X. fastidiosa* subsp. *pauca* colonizza lo xilema, lì si moltiplica e, attraverso il tessuto xilematico, può diffondersi con movimento sia acropeto, sia basipeto. È pertanto possibile reperire il patogeno in ogni parte della pianta, incluse le radici (Martelli *et al.*, 2016).

Temperature mediamente alte, tra i 18 e i 32°C, favoriscono la moltiplicazione del batterio e la comparsa della malattia: ciò è abbastanza tipico per batteri fitopatogeni appartenenti alla famiglia delle *Xanthomonadaceae*, di cui è ipotizzata l'origine tropicale o sub-tropicale (Stefani & Boscia, 2019).

La diffusione ed il ciclo biologico di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* sono fortemente influenzati dalle variabili climatiche: l'inverno mite assicura una buona sopravvivenza del batterio e le temperature in primavera ed estate favoriscono la rapida crescita del patogeno. Sulla base di questi ed altri parametri è stata prevista la sua potenziale ulteriore diffusione in areali esterni alla Puglia, quali: Calabria, Basilicata, Sicilia, Sardegna e aree costiere della Campania, Lazio e Toscana meridionale (Bosco, Russo, *et al.*, 2016).

### 1.2.2 **Eziologia di *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* nella pianta ospite**

La colonizzazione dei vasi xilematici da parte del batterio può portare alla loro occlusione, compromettendo in tal modo il trasporto di acqua e soluti (Sabella *et al.*, 2019). L'occlusione dei vasi e la conseguente embolia possono avvenire sia per la produzione di biofilm da parte del patogeno, sia per la formazione di gomme e tilosi da parte del tessuto vegetale come risposta all'infezione batterica. Questo processo conduce al graduale disseccamento della parte distale della chioma (Scala *et al.*, 2019).

Uno studio effettuato su vasi xilematici in rami di tre diverse cultivar di *Olea europaea* infette/non infette da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, ha constatato che le occlusioni riscontrate nei vasi degli olivi naturalmente infetti sono causate da tilosi e gomme e non da aggregati cellulari del batterio e che tali occlusioni non sono comunque responsabili della sintomatologia del disseccamento rapido dell'olivo (De Benedictis *et al.*, 2017). In una successiva ricerca, sono stati messi in relazione sintomi da "disseccamento rapido dell'olivo" in alberi di olivo con occlusioni dei vasi xilematici dei piccioli fogliari da parte di cellule batteriche e matrice extracellulare. Sembra quindi che le occlusioni dello xilema siano determinanti a livello delle foglie piuttosto che dei rami (Cardinale *et al.*, 2018). Quest'ultimo aspetto sarebbe da approfondire.

La regolazione da parte *X. fastidiosa* della crescita sessile, ossia del biofilm piuttosto che dello stile di vita planctonico, potrebbe essere collegato ad una risposta adattativa di tipo parassitico-transitorio rispetto allo stile commensale, anche in relazione alle interazioni con gli altri endofiti presenti nella pianta (Roper *et al.*, 2007).

È noto che in alcuni dei suoi numerosi ospiti vegetali questo batterio partecipi a relazioni apparentemente commensali, comportandosi come un endofita benigno, mentre in altri ospiti adotta un fenotipo patogenico virulento e provoca malattie devastanti che sfociano in epidemie: ciò lo rende un buon modello per esplorare i determinanti delle relazioni parassitarie e commensali sia dal punto di vista microbico sia da quello della pianta ospite. Recenti scoperte su come il patogeno imponga a sé stesso comportamenti auto-limitanti indicano che, anche nella sua forma parassitaria, *X. fastidiosa* mostra i tratti distintivi di uno stile di vita commensale (Roper *et al.*, 2007). Per adottare varie strategie di controllo più appropriate, sarebbe utile comprendere gli elementi di alterazione e/o distorsione delle interazioni commensalistiche di *X. Fastidiosa*, tanto da indurre manifestazioni patologiche.

*X. fastidiosa* è molto abile nel formare biofilm con una complessa architettura tridimensionale (Monteiro *et al.*, 2017); in termini di patogenesi batterica, la formazione di biofilm è un comportamento spesso critico, legato alla virulenza e alle infezioni batteriche croniche. E' stato possibile verificare nel germoplasma suscettibile di vite che i mutanti di *X. fastidiosa* variano la loro virulenza in funzione del loro stato aggregativo (Gouran *et al.*, 2016; Burbank & Stenger, 2017).

*X. fastidiosa* entra nello stile di vita biofilmogeno modulando accuratamente i suoi comportamenti endofitici in modo da non colonizzare/invadere troppo rapidamente la pianta ospite; questo comportamento autolimitante durante il parassitismo negli ospiti sintomatici può essere un residuo del suo stile di vita come commensale negli ospiti non sintomatici. L'attenuazione delle risposte chemiotattiche nella vite gli permette di mantenere un equilibrio tra parassitismo e commensalismo, al fine di garantirsi la possibilità di sopravvivenza in una pianta ospite sensibile, nonché la sua probabilità di essere trasmessa da insetti vettori a nuovi ospiti vegetali prima di uccidere la sua pianta ospite (Lindow *et al.*, 2014).

Il dogma generale è che invertire o prevenire la formazione del biofilm batterico può essere terapeutico per le infezioni correlate al biofilm (Koo *et al.*, 2017). Tuttavia, nel caso in cui il biofilm sia legato a comportamenti auto-limitanti, uno strumento terapeutico progettato per annullare l'architettura del biofilm o indurre la dispersione del biofilm, potrebbe diventare controproducente e darebbe luogo a una popolazione batterica altamente dispersiva che colonizzerebbe rapidamente l'ospite, traducendosi così in un fenotipo ipervirulento. La questione aperta è quindi valutare se la strategia di controllo più vantaggiosa sia quella di progettare terapie che mirino allo stato di dispersione o che piuttosto incoraggino l'adesione per bloccare permanentemente la popolazione batterica nel suo stato di autolimitazione (Lindow *et al.*, 2014).

### 1.2.3 *Xylella fastidiosa* e comunità endofitica

Il ruolo della comunità endofitica nel patosistema *Xylella*-ospite deve essere ancora compreso in profondità.

Poiché il patogeno viene inoculato direttamente nella nicchia desiderata dai suoi insetti vettori e non ha bisogno di attraversare le barriere strutturali della pianta, inizialmente non viene rilevato dal sistema immunitario dell'ospite e non suscita una risposta immunitaria quantificabile durante la fase iniziale dell'infezione (Rapicavoli *et al.*, 2018). In questo lasso di tempo il batterio non viene rilevato dalla pianta come uno stress biotico, ma piuttosto come uno stress abiotico correlato alla siccità e alla disidratazione (Rapicavoli *et al.*, 2018).

Per questo motivo la pianta sovraregola i percorsi relativi alla fortificazione delle cellule vegetali e alla prevenzione della perdita d'acqua, ma non fornisce una difesa efficace contro i batteri, che arriva solo in un momento successivo, troppo tardi per prevenirne l'ingresso, in quanto i batteri si sono già stabiliti nella pianta. Nei vigneti, le conseguenze a valle delle infezioni da *X. fastidiosa* si manifestano nell'abbondante formazione di tilosi nello xilema allo scopo di isolare il patogeno. I batteri inducono quindi una sindrome autoimmune in cui la pianta continua a produrre tilosio, nonostante la sua inefficacia, con una esacerbazione dei sintomi: la pianta essenzialmente danneggia sé stessa a causa dell'esteso blocco vascolare che si determina nello xilema (Sun *et al.*, 2013).

L'approccio riduzionista che porta a studiare le relazioni tra *X. fastidiosa*, la sua pianta e gli insetti ospiti come *interazioni binarie* tra la pianta e il batterio o tra l'insetto e il batterio, che ha fatto molta luce su importanti meccanismi, può essere integrato con lo studio del sistema a una maggiore complessità ecologica, per includere anche altri microbi che fanno parte del sistema patologico (Berendsen *et al.*, 2012).

Una ricerca condotta su vigneti in aree ad alta pressione PD (Pierce disease), ha voluto verificare l'ipotesi se la comunità microbica edafica della vite conferisse un fenotipo indenne alla malattia in viti che mostravano sintomi ridotti o nulli. Questo studio sul microbioma ha evidenziato che l'endosfera del tessuto legnoso della vite ospita una bassa diversità microbica e che la concorrenza tra *Pseudomonas spp.* e *X. fastidiosa* può essere un driver del fenotipo della malattia. Un aspetto interessante da indagare è se l'interazione *Pseudomonas* – *X. fastidiosa* sia puramente competitiva o se specifici ceppi di *Pseudomonas* interagiscono con il sistema immunitario della pianta determinando un effetto di innesco della malattia che tempera lo sviluppo del PD (Deyett *et al.*, 2017). Le relazioni tra commensalismo e patogenicità non possono essere considerate come strette ma piuttosto come relazioni che operano su un *continuum*, in cui gli organismi possono cadere nello spettro dell'uno o dell'altro comportamento simbiotico. Anche nel suo stato patologico, *X. fastidiosa* condivide i tratti distintivi della sua vita come commensale (Roper *et al.*, 2019).

Queste osservazioni svolte sul patosistema *X. fastidiosa*-vite potrebbero essere utili anche nello studio del patosistema *X. fastidiosa*-olivo, per individuare la strategia terapeutica più efficace in relazione alla produzione di biofilm. Si potrebbe valutare con maggior rilievo il ruolo degli endofiti, sia nella soppressione diretta del patogeno, sia nel determinare lo spettro del comportamento parassitismo/commensalismo da parte di *Xylella* nel contesto delle plurime interazioni microbioma-patogeno-ospite influenzate dal resto della comunità microbica, come osservato su vite da Roper *et al.* (2019).

### 1.3 Analisi dell'ecologia microbica dell'olivo: la rizosfera

Il declino degli alberi di olivo nel Salento è un fenomeno che si inserisce in un processo di dimensioni più vaste, che riguarda numerose colture arboree. Negli ultimi decenni, infatti, il declino delle piante coltivate ha interessato sempre più specie. Esso può essere definito come una degenerazione a lungo termine dei tessuti vegetali a seguito di una successione di molteplici eventi negativi (ad es. stress abiotici, cambiamenti climatici, comparsa di nuovi patogeni o fitofagi alieni, strategie agricole) (Anderson *et al.*, 2004).

Il declino degli alberi può anche essere visto come una diminuzione, su più anni, della produttività, che può portare (o meno) alla morte improvvisa.

La longevità delle piante arboree rende la loro fisiologia, lo sviluppo e l'ecologia, diverse dalle piante annuali. Esse sono particolarmente vulnerabili agli agenti patogeni, poiché l'esposizione dura per un periodo più lungo rispetto alle piante annuali (Koskella *et al.*, 2017). Le colture sono inoltre sempre più esposte agli agenti patogeni a causa delle tecniche colturali e soprattutto della globalizzazione, che favorisce la rapida dispersione di specie microbiche lungo le rotte commerciali.

Le interazioni tra piante e agenti patogeni vengono di solito semplificate come una “guerra di trincea” tra due parti, un rapporto binario, ignorando l'importanza di parti aggiuntive che possono influenzare in modo significativo il processo di infezione.

Un albero che cresce in condizioni di campo non può essere considerato un individuo a sé, ma va visto come una comunità complessa: le piante non vivono sole, ma sono colonizzate e circondate da microbi e la colonizzazione microbica, sia epifitica che endofitica, varia tra i tessuti vegetali. Un'ampia varietà di taxa microbici è coinvolta in queste associazioni, passando da patogeni a benefici fino a quelli apparentemente neutri.

Con il termine *microbiota* ci si riferisce a tutti i microbi (batteri, *Archaea* e funghi) associati a una pianta in un particolare ambiente, mentre la totalità dei genomi di un microbiota corrisponde al *microbioma* e spesso viene usato per descrivere l'entità dei tratti microbici (cioè delle funzioni) codificati da un microbiota (Compant *et al.*, 2016; Schlaeppli and Bulgarelli, 2015).

Le comunità microbiche associate alle piante sono complesse e dinamiche, le interazioni ospite-microbo e microbo-microbo a breve e lungo termine mediano sia le proprietà dell'ospite che quelle microbiche e sono essenziali per la salute dell'ospite (Mercado-Blanco *et al.*, 2018; Berendsen *et al.*, 2012; Berg *et al.*, 2016). Alcuni elementi microbici sono dannosi e causano malattie, altri promuovono la crescita delle piante e migliorano l'acquisizione di nutrienti e la tolleranza agli stress biotici e abiotici attraverso una moltitudine di meccanismi. Una grande frazione della comunità microbica può essere definita come commensale: microrganismi che trovano la loro nicchia nell'associazione con le piante ma non hanno alcuna funzione nota per i loro ospiti (Brader *et al.*, 2017).

In realtà l'equilibrio tra commensalismo e patogenicità è un argomento affascinante: queste relazioni non possono essere considerate come strette ma piuttosto come relazioni che operano su un *continuum*, in cui gli organismi possono cadere nello spettro dell'una o dell'altra forma di simbiosi in seguito a condizioni diverse. Questo discorso riguarda anche *X. fastidiosa*, che in molte piante ospiti si comporta come un endofita benigno, ma in alcuni ospiti adotta un fenotipo patogenico virulento, provocando malattie devastanti che sfociano in epidemie. Anche nel suo stato patologico, *X. fastidiosa* condivide i tratti distintivi della sua vita come commensale (Roper *et al.*, 2019); uno studio su piante di vite asintomatiche in un'area a forte pressione di malattia di Pierce (PD) ha ipotizzato che la comunità microbica del suolo potesse conferire questo fenotipo esente da malattia (Deyett *et al.*, 2017).

A seconda dei diversi ambienti vegetali, il microbiota associato alle piante può trovarsi all'esterno delle piante, nella rizosfera o nella fillosfera, o all'interno delle piante, l'endosfera. Le piante possono

essere colonizzate da agenti patogeni e da endofiti non patogeni, che trascorrono almeno parte del loro ciclo vitale all'interno delle piante.

I complessi microbici associati alle radici appartengono a tre sfere diverse: l'endosfera (interno della radice), il rizopiano (superficie della radice) e la rizosfera (il terreno vicino alla superficie della radice), ciascuno dei quali possiede un microbioma distinto.

La ectorizosfera è quella parte di suolo attaccato alle radici o in loro prossimità ed influenzato dagli essudati delle radici stesse (Balandreau and Knowles, 1978; Shi *et al.*, 2016).

Le piante vivono in stretta associazione con i microbi che popolano il suolo in cui crescono; le comunità microbiche del suolo rappresentano il più grande serbatoio di diversità biologica finora conosciuto al mondo (Curtis *et al.*, 2002; Torsvik *et al.*, 2002; Buée *et al.*, 2009). La rizosfera è infatti considerato un "punto caldo" della diversità microbica: può contenere fino a  $10^{11}$  cellule microbiche per grammo radice (Egamberdieva *et al.*, 2008) e più di 30.000 specie procariote (Mendes *et al.*, 2011). Il genoma collettivo di questa comunità microbica è molto più grande di quello della pianta.

Le interazioni tra suolo, pianta e microbi sono molto complesse e decidono la crescita delle piante: il rizobioma è considerato un genoma alternativo delle piante, che guida diverse attività fisiologiche ed ecofisiologiche delle piante stesse. Considerando l'importanza delle funzioni svolte, diversi autori interpretano il microbioma come un *secondo genoma vegetale*; la combinazione della pianta ospite e del microbiota viene quindi indicata come *olobionte*, che può essere definita come "il riflesso genomico della complessa rete di interazioni simbiotiche che collega un individuo di un dato *taxon* al microbioma ad esso associato" (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015; Berg *et al.*, 2014; Guerrero *et al.*, 2013).

I microrganismi associati alle radici rappresentano la chiave fondamentale per l'evoluzione delle piante terrestri e per evidenziare i processi fondamentali dell'ecosistema (Fitzpatrick *et al.*, 2018). Il rizomicrobioma delle piante arboree gioca un ruolo significativo in diverse funzioni fondamentali: la nutrizione delle piante, ad esempio la fissazione dell'azoto o la solubilizzazione del fosfato; il controllo biologico, competendo direttamente con i patogeni o inducendo la resistenza nelle piante; la crescita delle piante e la riduzione degli stress mediante la produzione o la degradazione di fitormoni (Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Berendsen *et al.*, 2012; Gaiero *et al.*, 2013).

Al pari di quanto osservato negli esseri umani, dove gli effetti delle comunità microbiche intestinali sulla salute stanno diventando sempre più evidenti (Bron *et al.*, 2012), si è ipotizzato che un ruolo simile può essere ascrivito alle comunità microbiche della rizosfera delle piante (Ramírez-puebla *et al.*, 2013). La recente esplosione nel numero di studi sul microbiota intestinale umano ha evidenziato legami tra l'alterazione del microbiota (disbiosi) e lo sviluppo di patologie immunomediate e metaboliche come l'obesità, il diabete di tipo 2 o il cancro (Forslund *et al.*, 2015); in questo contesto, si può immaginare una trasposizione allo studio dei legami tra la composizione tassonomica e il funzionamento del microbiota delle piante arboree e il declino di queste ultime.

Le malattie delle piante sono spesso associate a cambiamenti o deviazioni di composizione di un *microbiota centrale* dell'olobionte (Lundberg *et al.*, 2012). Il concetto di "microbiota centrale" è emerso con la scoperta che il microbiota vegetale differisce dal microbiota rizosferico: in breve, piante sane favoriscono la colonizzazione da parte di microbi commensali ed evitano la colonizzazione da parte di patogeni (Jesús Mercado-Blanco *et al.*, 2018; Lundberg *et al.*, 2012). Il microbiota centrale varia con l'età e il compartimento della pianta, nonché con le proprietà del suolo (Hamonts *et al.*, 2018; Zarraonaindia *et al.*, 2015).

Il ruolo del microbiota nel favorire uno stato di salute delle piante ospiti è da riferirsi al concetto di *facilitazione* dell'ecologia vegetale, essendo il microbiota considerato un elemento "facilitatore" che fornisce funzioni aggiuntive all'olobionte e si adatta a quelle condizioni ambientali ottimali per la sopravvivenza e per mantenere o rafforzare l'omeostasi della pianta (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2017). La comunità microbica del suolo può influenzare la sopravvivenza, la crescita e la tolleranza delle

piante a stress biotici e abiotici e indurre resistenza sistemica contro parassiti e patogeni sia nelle foglie che nelle radici (Berendsen *et al.*, 2012; Syed Ab Rahman *et al.*, 2018; Pineda *et al.*, 2017). I batteri benefici della rizosfera (PGPR) possono promuovere la crescita delle piante attraverso una vasta gamma di meccanismi, sia diretti che indiretti, quali: la sintesi di fitormoni, l'aumento di disponibilità dei nutrienti presenti nel suolo e dei prodotti di degradazione della sostanza organica; possono agire come agenti di biocontrollo o biopesticidi attraverso l'inibizione o la soppressione degli organismi fitopatogeni grazie all'antibiosi e alla resistenza sistemica indotta (Hayat *et al.*, 2010; Gamalero & Glick, 2015; Bashan & Holguin, 1998).

### 1.3.1 Quali fattori determinano la struttura del microbiota rizosferico?

La densità di popolazione microbica nella rizosfera è molto più elevata che nel terreno circostante: questo fenomeno è noto come "effetto rizosfera"; in generale, le comunità microbiche della rizosfera sono meno diversificate rispetto a quelle del *bulk soil* (Van Der Putten, 2017; Berg *et al.*, 2006).

La composizione e la struttura del microbiota associato ad una determinata coltura arborea subiscono alterazioni nel tempo e nello spazio dovute a fattori quali cambiamenti ambientali (improvvisi o a lungo termine), proprietà fisico-chimiche del suolo, materia organica ed essudati del suolo (Fierer, 2017), azioni antropiche, pratiche agronomiche (Hardoim *et al.*, 2015), fattori climatici, stadio di sviluppo della pianta, stress biotici ed a biotici.

Insieme al tipo di suolo e ai fattori ambientali, il genotipo vegetale svolge un ruolo chiave come motore della composizione della comunità microbica nella rizosfera (Jesús Mercado-Blanco *et al.*, 2018). Le specie vegetali reclutano microrganismi dal suolo, dove la morfologia delle radici, gli essudati e il tipo di rizodeposizioni giocano un ruolo significativo (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Hartmann *et al.*, 2009; Ladygina & Hedlund, 2010).

È stato osservato che le comunità microbiche associate alle radici di diverse specie vegetali coltivate sullo stesso suolo differiscono frequentemente (Garbeva *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2006). D'altra parte, le stesse specie vegetali coltivate in terreni diversi possono originare comunità microbiche simili (Miethling *et al.*, 2000). Differenze nelle comunità microbiche della rizosfera sono state inoltre osservate in diversi genotipi della stessa specie vegetale (Glick, 2015; Micallef *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013).

La struttura della comunità batterica associata alla pianta è influenzata da fattori legati all'ospite, come l'età, lo stadio di sviluppo e il suo stato di salute, che a loro volta influenzano la segnalazione della pianta stessa (resistenza sistemica indotta) e la composizione degli essudati radicali (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Aleklett *et al.*, 2015).

Attraverso la rizodeposizione le piante modellano attivamente il microbioma associato, selezionando dal suolo non rizosferico (*bulk soil*) quei microrganismi che sono in grado di utilizzare in modo efficiente gli essudati radicali (Berg & Smalla, 2009; Ladygina & Hedlund, 2010). Il microbiota della maggior parte dei suoli non rizosferici è infatti sottoposto a stress da privazione di carbonio (Garbeva *et al.*, 2011), mentre le piante secernono fino al 40% dei loro fotosintati nella rizosfera (Bais *et al.*, 2006). Le radici rilasciano composti a basso peso molecolare (zuccheri, amminoacidi e acidi organici), zuccheri polimerici (mucillagine) e cellule morte della cuffia radicale. Queste rizodeposizioni sono utilizzate come fonti di carbonio dai microrganismi del suolo e rappresentano circa il 25% del carbonio allocato nelle radici di cereali e foraggi (Jones *et al.*, 2009) È stato sperimentalmente dimostrato che i batteri sono in grado di assimilare gli essudati delle radici (Haichar *et al.*, 2008).

Le rizodeposizioni possono contenere anche metaboliti secondari, come composti antimicrobici, nematocidi e flavonoidi (Oldroyd, 2013; Bais *et al.*, 2006), che sono coinvolti nelle fasi di attivazione delle biocenosi associative e nelle simbiosi o nell'allontanare i patogeni e i parassiti, agendo così come una forza trainante cruciale per definire le interazioni multitrofiche nella rizosfera.

### 1.3.2 Effetti della segnalazione di difesa sul microbioma radicale: quando la pianta è attaccata, il microbiota arriva in soccorso

Emerge quindi che gli essudati radicali delle piante stabiliscono un complesso sistema di comunicazione con gli organismi viventi della rizosfera ed in particolare con i batteri.

Bulgarelli *et al.* (2015) hanno studiato il microbiota radicale di diverse accessioni di orzo e hanno scoperto che il sistema immunitario innato dell'ospite e i metaboliti della radice sono in grado di definire la struttura della comunità microbica della radice.

Diversi studi hanno inoltre approfondito gli effetti della segnalazione di difesa sulla microflora commensale. Sono state osservate differenze nelle comunità microbiche sia nella fillosfera (Jousset *et al.*, 2011) che nella rizosfera (Hein *et al.*, 2008; Doornbos *et al.*, 2011) di piante di *Arabidopsis* selvatiche, poste a confronto con mutanti alterati nella segnalazione di difesa. Inoltre, gli ormoni vegetali legati alla difesa, come l'acido jasmonico e l'acido salicilico, possono mediare i cambiamenti nella composizione degli essudati delle radici (Badri *et al.*, 2008). Ciò suggerisce che i cambiamenti negli ormoni correlati alla difesa, come osservato durante l'attacco di patogeni e insetti dei tessuti fogliari (Pieterse *et al.*, 2009), influenzando la composizione degli essudati delle radici, modificano la composizione del microbioma nella rizosfera (Berendsen *et al.*, 2012).

Studi su peperone hanno rilevato che attacchi da parte di fitofagi, in particolare la mosca bianca (*Bemisia tabaci*) (Yang *et al.*, 2011) ed afidi (*Myzus persicae*) (B. Lee *et al.*, 2012), hanno suscitato resistenza contro un batterio patogeno delle radici (*Ralstonia solanacearum*) ed hanno determinato cambiamenti significativi nella comunità microbica della rizosfera, aumentando le popolazioni di batteri benefici.

Il reclutamento di un batterio rizosferico benefico è stato dimostrato anche per *Arabidopsis* quando le foglie sono state infettate da un batterio patogeno (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) (Rudrappa *et al.*, 2008). Lo studio ha rivelato che una maggiore secrezione di acido malico ha attratto chemiotatticamente il ceppo di *Bacillus subtilis* FB17, mentre altri rizobatteri non lo erano. La colonizzazione delle radici di *Arabidopsis* da parte di FB17 ha indotto ISR e ha protetto le parti aeree delle piante dall'infezione da *P. syringae*. Questi dati indicano una relazione reciprocamente vantaggiosa tra *Arabidopsis* e FB17, per cui FB17 viene reclutato per aiutare nella difesa della pianta e la pianta fornisce al batterio acido malico.

Gli studi sopra descritti indicano che le piante rispondono all'attacco dei patogeni reclutando specifici microrganismi benefici del suolo e che questi conferiscono immunità contro una vasta gamma di malattie fogliari, attivando le difese delle piante, riducendo così la suscettibilità di una pianta all'attacco dei patogeni. La dimostrazione che le radici producono selettivamente essudati e segnalano efficacemente i rizobatteri, stabilisce un ruolo regolatore dei metaboliti radicali nel reclutamento di microbi benefici.

Esistono indicazioni secondo cui anche il genotipo della pianta può influenzare l'accumulo di microrganismi che la aiutino a difendersi dagli attacchi dei patogeni. Infatti, sono state trovate differenze nella capacità di varie cultivar di grano di arricchire nel suolo *Pseudomonas fluorescens*, che ha determinato una diversa soppressione di malattie fungine a carico degli alberi di melo consociati (Gu & Mazzola, 2003): diverse cultivar di frumento supportano in modo differenziale batteri specifici del controllo biologico, il che mette in evidenza il grado di alta specificità nelle interazioni tra il genotipo delle piante e la composizione della loro comunità microbica (Meyer *et al.*, 2010).

### 1.3.3 Ruolo del suolo, del clima e delle azioni antropiche nella composizione delle comunità dei batteri rizosferici

Le proprietà del suolo sono modificate da una serie di processi che si verificano durante la crescita degli alberi, che a loro volta influenzano le comunità microbiche della rizosfera.

Il pH del suolo, un importante motore delle comunità microbiche (Fierer & Jackson, 2006; Bru *et al.*, 2011), può aumentare o diminuire fino a due unità nella rizosfera a causa del rilascio e dell'assorbimento di ioni da parte delle radici (Hinsinger *et al.*, 2009).

L'assorbimento di acqua e la respirazione delle radici influenzano la pressione dell'ossigeno nel suolo, influenzando così la respirazione microbica. Inoltre, la disponibilità di nutrienti del suolo viene modificata nella rizosfera dall'assorbimento da parte delle piante e dalla secrezione di chelanti, come i fitosiderofori, per sequestrare i micronutrienti metallici (Philippot *et al.*, 2013).

La temperatura e le precipitazioni, insieme alle variazioni stagionali, sono tra le principali componenti climatiche / meteorologiche che controllano la crescita e la moltiplicazione microbica: questi fattori abiotici possono influenzare sostanzialmente il microbiota del suolo di piantagioni e di popolamenti arborei forestali (Mercado-Blanco *et al.*, 2018).

I fattori antropici, quali l'inquinamento causato dalle attività industriali e minerarie o i sistemi di gestione agronomica, possono modellare il microbiota associato alle colture arboree e agli alberi da legno. Nelle foreste, ad esempio, l'attività di raccolta del legname esercita un effetto significativo e persistente sulle comunità batteriche e fungine del suolo attraverso la rimozione di materiale organico e la compattazione del suolo (Hartmann *et al.*, 2012).

Fattori come i metodi di coltivazione, in particolare quella biologica rispetto a quella convenzionale, contribuiscono in modo diverso sui vari microbiomi (Edwards *et al.*, 2015).

Spesso le parti morte annuali delle colture arboree vengono rimosse perché si ritiene che possano contenere microrganismi dannosi. Tuttavia, esse rappresentano una preziosa fonte di carbonio e la loro rimozione può contribuire alla riduzione dei composti organici nel suolo, che a sua volta influenzerebbe il microbioma del suolo (Achat *et al.*, 2015; Trumbore & Czimczik, 2008). La macinazione dei residui di potatura e l'incorporazione al suolo potrebbe essere una valida alternativa; se in alcuni casi i rischi di contaminazione sono troppo alti, un'altra opzione potrebbe essere quella di ammendare il suolo con le parti morte dopo la combustione completa o parziale.

È stato dimostrato che la diversità degli organismi (piante, animali e microbi) è influenzata positivamente nei sistemi a gestione biologica o a bassa coltivazione, rispetto ai sistemi a gestione integrata (Compant *et al.*, 2019). La diversità del suolo è stata studiata, in particolare nei vigneti, dove è stato trovato un legame tra i suoli gestiti con sovescio e la più alta diversità del microbiota del suolo, rispetto ad altre pratiche di gestione agricola (Longa *et al.*, 2017).

Poiché il microbiota associato alle piante può variare da una specie all'altra, e anche da un individuo all'altro all'interno della stessa specie, si potrebbero considerare strategie di associazione di diverse specie all'interno dello stesso sistema agricolo (inerbimento, consociazione) (Wei & Jousset, 2017), così che una pianta potrebbe sfruttare gli effetti benefici del microbiota rizosferico della pianta vicina. Montes-Borrego *et al.* (2013) in un'analisi comparativa dei sistemi di olivicoltura biologica e convenzionale nel sud della Spagna hanno rilevato come le pratiche di gestione hanno influenzato le proprietà chimiche e biologiche del suolo, indicando che gli oliveti condotti con gestione biologica hanno mostrato una maggiore diversità microbica rispetto ai frutteti gestiti convenzionalmente.

Anche altri studi hanno dimostrato che le pratiche agricole influenzano la composizione delle comunità batteriche del suolo (Cheng *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2014) e l'applicazione di tecniche di gestione sostenibile può migliorare la qualità degli ecosistemi del suolo (Mäder *et al.*, 2002; Cavigelli *et al.*, 2013) e può tutelare la presenza e l'attività di importanti *taxa* batterici con funzioni fisiologiche e protettive per le piante (Fausto *et al.*, 2018).

Come si è visto, il microbioma della rizosfera può avere un effetto diretto nel controllare malattie delle piante coltivate e a sua volta può essere condizionato da attacchi di patogeni o fitofagi. Studi diversi sono stati condotti sulle modificazioni del microbioma rizosferico durante le malattie e sull'applicabilità di agenti di biocontrollo (BCA) nella soppressione o nella riduzione di agenti patogeni.

Alcuni studi hanno riguardato la Verticilliosi dell'olivo (VWO), malattia vascolare causata dal fungo *Verticillium dahliae*: varietà di *Pseudomonas* spp. sono stati isolati dalla rizosfera di olive e hanno dimostrato di sopprimere il VWO in giovani piante prodotte in vivaio (Mercado-Blanco *et al.*, 2004; Triki *et al.*, 2012). Quando viene applicato nel sistema delle radici di olivo, il ceppo *P. fluorescens* PICF7 sembra essere cruciale per l'efficace soppressione del VWO (Cabanás *et al.*, 2017).

Altri studi hanno riguardato anche la soppressione di patogeni non terricoli. Trivedi *et al.* (2011) hanno indagato le fluttuazioni nelle comunità batteriche associate alle radici di alberi di agrumi in risposta all'infezione dei fitopatogeni appartenenti al genere *Candidatus Liberibacter* spp. (batteri da quarantena limitati al floema, che vengono trasmessi da due psille come insetti vettori e sono responsabili di Huanglongbing-HLB, la malattia più devastante degli agrumi in Asia, America e Africa). Alberi HLB sintomatici e asintomatici, sebbene crescano nello stesso sito, sembrano ospitare diverse popolazioni batteriche, in termini di diversità, abbondanza e attività PGP: HLB non influenza solo la salute delle piante, ma ristrutturata anche la comunità batterica associata alle radici degli agrumi. La maggior parte dei batteri isolati dai campioni asintomatici appartenevano ai *Proteobacteria* (*Pseudomonas* sp.), *Actinobacteria* e *Firmicutes* (*Bacillus* sp., *Microbacterium* sp); tra gli isolati, alcuni hanno mostrato attività battericida contro *Ca. Liberibacter*.

Gli studi citati, come molti altri, condotti su diversi patogeni, dimostrano sia la reciproca influenza tra i microbi associati alla pianta nei suoi diversi compartimenti, sia il ruolo attivo di quelli presenti nella rizosfera nel contrastare direttamente agenti patogeni edafici e nell'aumentare la capacità difensiva nelle parti fuori terra della pianta (Zamioudis & Pieterse, 2012).

La maggior parte dei microbi potrebbe non influenzare direttamente la pianta né l'agente patogeno, perché magari occupano nicchie ecologiche diverse (microrganismi commensali), ma è probabile che influenzino ogni altro organismo in una certa misura attraverso una complessa rete di interazioni. Nella battaglia per le risorse, i microbi benefici limitano il successo del patogeno attraverso la produzione di composti biostatici, il consumo di (micro) nutrienti o stimolando il sistema immunitario della pianta (Berendsen *et al.*, 2012).

Lo stile di vita microbico può passare da epifitico a endofitico, a seconda dei fattori ambientali (Uroz *et al.*, 2019) e le comunità batteriche che provengono dal suolo possono raggiungere le parti aeree delle piante attraverso la linfa dello xilema (Deyett *et al.*, 2017; Fausto *et al.*, 2018). È stato osservato su vite che comunità specifiche degli organi fuori terra (foglie, bacche e fiori) erano più simili alle comunità sotterranee del suolo di quanto non lo fossero tra loro (Deyett *et al.*, 2017). È noto, inoltre, che i batteri che abitano il suolo e la fitosfera (cioè parti diverse di una pianta e l'ambiente confinante) scambiano frequentemente il loro materiale genetico tramite coniugazione (Lotareva & Prozorov, 2005; Filonov *et al.*, 2005; El Yacoubi *et al.*, 2007).

I risultati di Schilirò *et al.* (2012) e di Cabanás *et al.* (2017) hanno dimostrato che la colonizzazione delle radici di olivo da parte del ceppo *P. fluorescens* PICF7 innesca ampi cambiamenti trascrittomici, sia a livello locale (radici) che sistemico (tessuti fuori terra).

La resistenza sistemica indotta (ISR) è uno stato in cui il sistema immunitario della pianta è pronto per l'attivazione accelerata della difesa (Bakker *et al.*, 2007; Conrath *et al.*, 2006; De Vleeschauwer & Höfte, 2009; Van Wees *et al.*, 2008).

L'induzione dell'ISR in *Arabidopsis thaliana* da parte del rizobatterio *Pseudomonas fluorescens* WCS417, che promuove la crescita delle piante, è stata ben studiata. A livello locale, nelle radici, WCS417 è in grado di sopprimere le risposte immunitarie attivate dalla flagellina attraverso la secrezione apoplastica di una o più molecole a basso peso molecolare (Millet *et al.*, 2010). Sebbene l'immunità locale delle piante sia soppressa, viene avviata a livello sistemico una cascata di segnalazione immunitaria che conferisce resistenza contro un ampio spettro di agenti patogeni e persino insetti (Pineda *et al.*, 2010; Van Oosten *et al.*, 2008). L'inizio di questa ISR nelle radici di *Arabidopsis* è regolato da un fattore di trascrizione specifico della radice, che agisce localmente nella generazione o traslocazione di un segnale sistemico (Van Der Ent *et al.*, 2008). La risposta ISR spesso

non è associata all'attivazione della difesa diretta, ma piuttosto al *priming* per l'espressione genica correlata alla difesa accelerata e all'aumentata deposizione di callosio nel sito di ingresso del patogeno (Van der Ent *et al.*, 2009). La formazione di WCS417-ISR nei tessuti fogliari dipende dagli ormoni acido jasmonico ed etilene e richiede (co)attivatori trascrizionali (Pozo *et al.*, 2008).

#### 1.3.4 Microbioma dell'olivo nel Salento

Recentemente sono state condotte ricerche che hanno indagato il microbioma di alberi di olivo affetti dal disseccamento rapido.

I primi studi avevano come obiettivo di caratterizzare le comunità microbiche nella linfa xilematica di cultivar di olivo tolleranti e sensibili per prevedere una strategia di controllo basata sulla manipolazione delle comunità batteriche residenti e per identificare endosimbionti che potessero essere utilizzati per ridurre la gravità dei sintomi da “disseccamento rapido dell'olivo” (Giampetruzzi *et al.*, 2016; Cameirão *et al.*, 2018; Baptista *et al.*, 2019) o per valutare se singoli ceppi batterici (es. *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN), con effetti benefici nella riduzione della gravità dei sintomi causati da *X. fastidiosa* nella vite, potessero svolgere un ruolo come agente di biocontrollo contro *X. fastidiosa* ssp. *pauca* ceppo CoDiRO (Morelli *et al.*, 2017).

Nel 2020 è stato pubblicato da Vergine *et al.* (2020) il primo studio ricognitivo sul microbioma associato ad olivo affetto da “disseccamento rapido dell'olivo”: sono stati confrontati i microbiomi di alberi infetti e non infetti da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* nel Salento, confrontando le cultivar “Leccino”, considerata resistente, e la “Cellina di Nardò”, riconosciuta come sensibile. Gli autori sono partiti dal presupposto che il microbioma associato alla pianta gioca un ruolo centrale nel mantenimento della forma fisica dell'ospite e che la pianta è ora considerata un *olobionte*, cioè una singola unità di evoluzione che include la pianta stessa e l'intera comunità di microbi ad essa associata. Con gli obiettivi di valutare le differenze di composizione, diversità e struttura del microbiota nativo tra le due cultivar, di comprendere la relativa risposta all'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e di identificare taxa specificamente associati alla cultivar Leccino, sono stati analizzati per tre anni (dal 2016 al 2018) alberi di età simile delle due cultivar, con stato di malattia comparabile, ricadenti nell'areale primario dell'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* con caratteristiche pedo-climatiche omogenee, in aziende ove erano state adottate le stesse pratiche agronomiche negli ultimi tre anni. L'ipotesi era che taxa microbici differenziali associati alla cv “Leccino” contribuissero alla sua resistenza a *X. fastidiosa*, subsp. *pauca*, ad esempio inibendo l'agente patogeno tramite interazioni microbo-microbo o innescando la reazione del sistema immunitario della pianta. L'obiettivo finale della ricerca era di identificare specie microbiche o consorzi di esse da utilizzare per il controllo biologico del declino rapido dell'olivo. I risultati della ricerca vengono qui brevemente riassunti.

I taxa dominanti in entrambi le cultivar erano quelli tipici associati alle piante, noti anche per essere endofitici, come *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Methylobacterium*; i campioni di Cellina di Nardò infettati da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* sono apparsi gravemente disbiotici, soprattutto per i batteri endofitici fogliari. Il Leccino infettato da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, invece, ha mostrato un assemblaggio batterico e una struttura simile a quello dei campioni non infetti. È stato ipotizzato, quindi, che la stabilità del microbiota endofitico di Leccino durante l'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* contribuisca al mantenimento di un buono stato di salute della pianta. Inoltre, il microbiota più diversificato di tale cultivar può ridurre gli effetti dell'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* o comunque modificare il suo effetto di output per la pianta.

I taxa Leccino-specifici includono specie note per esercitare effetti benefici sulle piante ospiti, come *Rhizobium*, *Burkholderiaceae*, *Sphingomonas* e *Enterobacter*, mentre *Pseudomonas* e *Sediminibacterium* sono stati ridotti nella Cellina di Nardò infettata.

Secondo gli autori, le interazioni microbo-microbo possono cambiare l'effetto netto di un microbioma sulle piante, pertanto sono state studiate le correlazioni negative, che potrebbero indicare un'inibizione diretta di *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, ma anche le correlazioni positive, che potrebbero

indicare specie benefiche che crescono insieme al patogeno ma allo stesso tempo modificano il suo metabolismo e ne riducono la patogenicità.

I dati raccolti prefigurano potenziali applicazioni biotecnologiche per il trattamento biologico della sindrome da declino rapido dell'olivo nel Salento.

Un dato interessante che andrebbe approfondito riguarda la presenza di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* negli olivi: la concentrazione osservata nei campionamenti del 2016 nella cultivar Cellina di Nardò è andata progressivamente diminuendo nel corso dei tre anni (Vergine *et al.*, 2020, tab.S7), mentre, al contrario, quella del Leccino è cresciuta fino ad eguagliare la concentrazione registrata nella varietà sensibile.

Lo scopo dello studio di Zicca *et al.* (2020) era, invece, l'identificazione di batteri antagonisti potenzialmente impiegabili come agenti di controllo biologico contro *X. fastidiosa* subsp. *pauca*.

A tal fine sono stati utilizzati due approcci, ovvero la valutazione dell'attività antagonista di: i) batteri endofitici isolati da olivi situati in una zona infetta ma con sintomi lievi o assenti, e ii) ceppi di *Bacillus*, già conosciuti come agenti di controllo biologico.

La caratterizzazione degli isolati batterici endofitici ha rivelato che la maggior parte di questi apparteneva a diverse specie dei generi *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Micrococcus* e *Curtobacterium*. Tuttavia, quando sono stati testati in vitro contro *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ST53, nessuno di loro ha mostrato attività antagonista. Viceversa, quando in questi test sono stati inclusi ceppi appartenenti a specie diverse del genere *Bacillus*, si sono registrate notevoli attività antagoniste. Alcuni ceppi di *B. velezensis* hanno anche prodotto filtrati di coltura con attività inibitoria contro *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ST53. L'ipotesi avanzata a proposito del ruolo degli endofiti dell'olivo nel limitare la comparsa dei sintomi, è che vi possa essere un effetto dovuto a una complessa comunità di batteri endofitici, o l'attivazione da parte degli stessi della resistenza sistemica indotta (ISR) nella pianta ospite.

La dinamica delle infezioni da *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* nel contesto del microbioma endofitico è stata studiata in piante coltivate in campo delle cultivar di olivo sensibili (“Kalamata”) e resistenti (“FS17”) da Giampetruzzi *et al.* (2020). La progressione delle infezioni rilevate in entrambe le cultivar ha svelato chiaramente che *Xylella* tende ad occupare l'intera nicchia ecologica e sopprime la diversità del microbioma endofitico. Tuttavia, questa tendenza è stata mitigata nella cultivar resistente FS17, ospitando dimensioni della popolazione inferiori e quindi un rapporto di abbondanza medio di *Xylella* inferiore rispetto ai batteri totali e una maggiore diversità  $\alpha$ .

Il fattore cultivar ha avuto un effetto trascurabile sulla composizione della comunità e non sono state trovate associazioni chiare di un singolo taxon o di consorzi microbici con la cultivar resistente. L'analisi ha mostrato che l'abbondanza di *Xylella* è notevolmente aumentata nel tempo, tendendo a occupare l'intera nicchia batterica dello xilema, con grande impatto sul resto della comunità microbica.

Tutti gli studi fin qui pubblicati sul microbioma di olivi nel Salento, in zona colpita dal disseccamento rapido, hanno indagato gli endofiti presenti nelle foglie, nei rami e nello xilema delle piante di olivo. Sono stati confrontati i microbiomi di coppie di cultivar (resistente vs. sensibile) al fine di verificare l'esistenza di taxa differenziali; spesso sono state isolate popolazioni batteriche da alberi infetti o non infetti. L'obiettivo comune a tutti i lavori era comunque di individuare singoli ceppi batterici o loro consorzi in grado di essere utilizzati come potenziali agenti di biocontrollo nei confronti di *X. fastidiosa* ssp. *pauca* ST53.

In particolare, diverse ricerche in corso stanno approfondendo il ruolo che gli endofiti svolgono nei tratti di resistenza e/o tolleranza della cv. Leccino. In piante di questa cultivar si osserva una capacità di rallentare la crescita di cellule di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e lo sviluppo dei sintomi specifici del declino rapido, la cui progressione avviene con minor velocità rispetto ad altre cultivar (es. Cellina di Nardò), sebbene sia più accelerata in confronto ad altre (es. Coratina) (Saponari *et al.*, 2017).

Questi studi, avendo come oggetto principale il microbioma del Leccino, non affrontano un fenomeno che riteniamo importante approfondire.

Nel Salento i disseccamenti degli alberi di olivo hanno avuto una diffusione irregolare: frequentemente si osservano impianti gravemente danneggiati vicino ad altri indenni o paucisintomatici. In molti casi alberi della stessa varietà, coltivati nella stessa zona infetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, presentano risposte fenotipiche diverse con livelli differenti di sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo”. L’indagine sul microbioma del Leccino e il confronto tra questa cultivar ed altre maggiormente suscettibili non contribuiscono a spiegare questo fenomeno, che però riveste un’importanza fondamentale nel quadro della problematica del declino degli olivi nel Salento, poiché due cultivar tradizionali, la “Cellina di Nardò” e la “Ogliarola Salentina”, da sole ricoprono oltre il 90% della SAU ad oliveto della provincia di Lecce.

Per tentare di capire i motivi della diversa risposta alla malattia da parte di alberi della stessa cultivar, si è ritenuto di confrontare impianti di Cellina di Nardò di età simile e con caratteristiche pedoclimatiche omogenee. In questi oliveti abbiamo scelto di studiare la struttura del microbioma della rizosfera perché, come visto in precedenza, esso è in grado di determinare, con le sue specifiche funzioni, la crescita e la salute delle piante, in particolare di quelle arboree con le quali stabilisce interazioni profonde e durature negli anni.

Infatti, anche se gli organismi simbiotici delle piante in generale sono stati ampiamente studiati, i fattori che contribuiscono alle interazioni ospite-microbioma e l'evoluzione e l'ecologia delle simbiosi sono poco conosciuti. Le comunità microbiche associate all'ospite, grazie alle complesse interazioni multitrofiche, svolgono un ruolo importante anche sulla virulenza dei patogeni: il rizomicrobioma è la più popolosa ed elaborata di tutte quelle associate alle piante superiori; secondo diversi autori, pertanto, la chiave fondamentale per l'evoluzione delle piante terrestri e per i processi fondamentali dell'ecosistema sono i microrganismi associati alle radici (Fitzpatrick *et al.*, 2018; Backer *et al.*, 2018).

Per quanto di nostra conoscenza, non sono stati pubblicati al momento studi sul microbioma rizosferico dell’olivo nel Salento in zona affetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Il presente studio, pertanto, potrebbe aprire un ambito di ricerca ancora inesplorato in quest’ambiente.

Uno studio interessante di Fausto *et al.* (2018) ha approfondito il microbioma endofita e rizosferico di una cultivar locale di olivo coltivata in Basilicata, ponendo a confronto diversi sistemi di gestione agronomica degli oliveti. Il fatto che in questo studio una parte del microbioma riscontrato nella linfa sia risultata essere in comune con il microbioma del suolo e con quello della fillosfera, conferma che, in accordo con Mercado-Blanco & Lugtenberg (2014), una parte delle comunità batteriche provenga dal suolo e raggiunga la fillosfera attraverso la linfa dello xilema. Nel terreno i phyla più abbondanti sono risultati: *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Planctomiceti*.

Nella situazione specifica del Salento si è valutato di indagare la struttura del microbioma della rizosfera per evidenziare eventuali disbiosi negli oliveti presenti sul territorio. Sebbene specifici microrganismi siano in grado di proteggere la pianta direttamente o indirettamente dai patogeni, la soppressione di malattie non sembra possa essere attribuita esclusivamente a un singolo taxon, in quanto la sua efficacia sarebbe largamente influenzata dal resto della comunità microbica. Si può sostenere che tutti i microrganismi attivi si influenzino a vicenda in un modo o nell'altro, anche se indirettamente. Ad esempio, nella rizosfera di piante di barbabietola coltivate in un suolo soppressivo di *Rhizoctonia solani* erano presenti più di 33.000 OTU di batteri e *Archaea*; tuttavia, né il numero né la presenza esclusiva di taxa microbici sembravano essere correlati alla soppressione di malattia, che invece corrisponderebbe con l'abbondanza relativa di diversi taxa (Berendsen *et al.*, 2012).

Per questi motivi, è apparso fondamentale documentare in dettaglio tutti i microbi presenti nei campi agricoli nelle specifiche condizioni di crescita. Le informazioni sulla struttura e le funzioni dei rizomicrobiomi in piante affette da “disseccamento rapido dell’olivo” ma con manifestazioni

sintomatiche differenziate sono un ambito di ricerca molto promettente, che potrebbe permettere in futuro di registrare le interazioni all'interno del microbioma o tra la pianta e i microbi. Sebbene siano disponibili alcune informazioni con sistemi vegetali modello come *Arabidopsis* (Lundberg *et al.*, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2012; Schläeppli *et al.*, 2014), per comprendere il principio alla base della benefica interazione tra i microrganismi e le piante nel favorire la crescita di queste ultime, è importante capire come i rizobiomi sono assemblati in strutture specifiche con la loro peculiare composizione nella coltura di nostro interesse (Raghavendra & Santhoshkannada, 2020).

Dal momento che le comunità microbiche del suolo sono condizionate, oltre che dal genotipo vegetale e dalle condizioni ambientali, anche dalle tecniche agronomiche adottate, una maggiore comprensione dei legami tra il microbiota del suolo e gli alberi è certamente utile per lo sviluppo di strategie di gestione delle colture arboree più efficaci e sostenibili (Mercado-Blanco *et al.*, 2018).

## 1.4 Il Disseccamento Rapido dell'olivo nel Salento

Negli ultimi decenni, il declino delle piante arboree ha interessato sempre più specie (Anderson *et al.*, 2004). Il declino può essere definito come una degenerazione a lungo termine dei tessuti vegetali a seguito di una successione di molteplici eventi negativi (ad es. stress abiotici, squilibri climatici, comparsa di nuovi patogeni, introduzione di parassiti esogeni, pratiche agricole) con una diminuzione in più anni della produttività, che può portare (o meno) a una morte improvvisa della pianta. I principali responsabili sembrano essere agenti patogeni (fungini, batterici o virali) che possono scatenare malattie su alberi sani, agendo come 'fattori primari', o come 'fattori secondari' quando il patogeno beneficia dell'indebolimento dell'albero (es. un'altra malattia, ferite, siccità, fluttuazioni estreme delle condizioni meteorologiche, fertilizzanti eccessivi, pratiche d'impianto improprie, cattive condizioni del suolo, ecc.) (Bettenfeld *et al.*, 2020).

La problematica nota come Complesso del Disseccamento Rapido dell'Olivo (CoDiRO) vede il declino di numerosi alberi di olivo nel Salento (Puglia). Questo fenomeno rappresenta un crescente problema di natura economica (diretta e indiretta) con potenziali gravi conseguenze sull'agricoltura locale e sull'olivicoltura italiana (di cui quella pugliese rappresenta tra il 35% e il 50% in base alle annate), come su altri comparti produttivi (primi fra tutti il turismo, l'industria agroalimentare, l'artigianato). Vanno inoltre considerati ulteriori gravi danni ai valori immateriali (culturali, storici, sociali) e ai servizi ecosistemici (ambientali, paesaggistici) (Almeida, 2016).

### 1.4.1 L'olivicoltura salentina: un'attività legata alle piccole aziende

L'olivicoltura leccese, la provincia integralmente colpita dal disseccamento degli olivi, ricalca, accentuandoli, i caratteri di quella italiana. A livello nazionale, anche a causa delle ridotte dimensioni aziendali, sono definite "competitive" solo il 37% delle aziende, mentre 520.000 (il restante 63%) sono considerate "marginali" (ISMEA, 2019). Questo settore, che ha un ruolo produttivo importante e in molti casi ha trovato interessanti sbocchi sul mercato estero, svolge comunque importanti funzioni a livello occupazionale, culturale e di tutela ambientale e del paesaggio: un presidio del territorio realizzato proprio grazie alla diffusione capillare e alle caratteristiche peculiari della piccola proprietà contadina.

Nella sola provincia di Lecce esistono 65.738 aziende olivicole su una superficie di circa 97.000 ettari, con un'estensione media aziendale di 1,48 ha. L'olivo è una coltura che connota profondamente questo territorio, essendo presente nel 92% delle aziende agricole della provincia e ricoprendo il 60,4% della SAU.

Solo il 3,7% delle aziende hanno una superficie superiore a 5 ha, quindi oltre 63.000 agricoltori (96,3%) non rientrano nei parametri dell'impresa agraria olivicola. Le aziende con salariati sono l'1,3% (n.854) e detengono l'11,2% della superficie (10.900 ha); il 98,3% delle aziende è a conduzione diretta. Il 96,2% di esse ha una dimensione economica inferiore a 8.000 € l'anno (Brunetta, 2013).

L'Italia è il primo paese importatore di olio di oliva al mondo, con circa 1/3 delle importazioni globali (ISMEA, 2019). La produzione realizzata nel Salento concorre significativamente a soddisfare la domanda interna e contribuisce a ridurre il deficit nazionale; in questo quadro, anche quel 72,7% di agricoltori della provincia che producono prevalentemente per l'autoconsumo familiare e locale svolgono un importante ruolo economico (Brunetta, 2013).

In questi anni decine di migliaia di famiglie hanno condotto gli oliveti e li hanno tenuti in produzione nonostante la redditività si sia molto ridotta, svolgendo così un ruolo non solo produttivo, ma anche sociale e di tutela del paesaggio, con ricadute economiche indirette anche su altri settori economici.

Su un totale di oltre 10 milioni di alberi di olivo nella Provincia di Lecce, il 62% è coltivato con una densità d'impianto inferiore alle 200 piante per ettaro (circa 3 milioni sono alberi secolari – fonte *SIAN, 2013*), dunque con sestri superiori a 7x7 m. Gli impianti intensivi (sesti 5x5 m o 6x6 m) costituiscono meno del 10% degli oliveti dell'area (*Sardaro et al., 2015*).

Le province pugliesi nel loro insieme si contraddistinguono per la concentrazione di olivi secolari e monumentali: le piante con oltre 100 anni di età localizzate nella regione rappresentano quasi il 40% del totale nazionale (*SIAN, 2013*). L'olivicoltura in Puglia rappresenta una realtà importante non solo in termini economici e sociali, ma anche in relazione alla caratterizzazione del tipico paesaggio dell'area mediterranea.

#### 1.4.2 Genesi del Disseccamento rapido degli olivi

I primi sintomi di una malattia dell'olivo di origine sconosciuta sono stati osservati nella zona di Gallipoli (provincia di Lecce) intorno al 2007-2008, quando sono state notate bruciature delle foglie e deperimento di ramoscelli e rami su alberi giovani e centenari (*Martelli et al., 2016*). Considerando il tempo che intercorre tra la colonizzazione dell'albero da parte dell'agente patogeno e la comparsa dei primi sintomi, l'infezione iniziale potrebbe aver preso avvio qualche anno prima. Successivamente, la malattia si è diffusa nell'area circostante Gallipoli.

Al momento della prima registrazione ufficiale (ottobre 2013) il numero di ettari che mostravano sintomi di “disseccamento rapido dell'olivo” era compreso tra 8000 e 10.000 (*Cariddi et al., 2014; Martelli, 2016*), corrispondenti a circa 800.000 – 1.000.000 di olivi.

Le piante colpite presentavano la seguente sintomatologia:

- disseccamenti della chioma che interessavano rami isolati, intere branche e/o l'intera pianta;
- imbrunimenti del legno a diversi livelli dei rami più giovani, delle branche e del fusto;
- foglie disseccate nella parte apicale e/o marginale.

Il 15 ottobre 2013 viene data la comunicazione ufficiale dell'identificazione di *Xylella fastidiosa* da parte del CNR, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante di Bari.

In seguito alle indagini, nell'area colpita sono stati individuati diversi agenti parassitari:

- *Xylella fastidiosa*, batterio fitopatogeno da quarantena;
- *Zeuzera pyrina* o Rodilegno giallo (lepidottero), fitofago polifago;
- *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium parasiticum*, *P. rubrigenum*, *P. aleophilum*, *P. alvesii*, *Pleurostomophora richardsiae* e *Phaemoniella* spp., miceti lignicoli vascolari (*Nigro et al., 2013*).

*X. fastidiosa*, un patogeno trasmesso da insetti vettori che si nutrono di linfa, essendo stato spesso trovato associato a sintomi di declino su alberi di olivo, oleandro e mandorlo, è stato considerato il principale responsabile della malattia (*Martelli et al., 2016*).

Il genotipo di *X. fastidiosa* rinvenuta nel Salento è la subsp. *pauca* (ST. 53) che, oltre l'olivo, può infettare altre 36 specie, tra piante coltivate e spontanee, appartenenti a 16 famiglie botaniche.

All'identificazione di *X. fastidiosa* negli olivi affetti da disseccamento rapido si è giunti sia per il tipo di sintomi, che ricordava le violente manifestazioni di brusca fogliare (*leaf scorch*) di fruttiferi e piante da ombra (platano, acero, olmo, querce, ecc.) attribuite a questo batterio dalla bibliografia nord americana, sia per le modalità di diffusione della malattia, che sembravano anch'esse compatibili con quelle delle infezioni di *X. fastidiosa*. La sospettata presenza di *X. fastidiosa*, è stata quindi confermata da saggi sierologici (ELISA) e molecolari (PCR) (*Saponari et al., 2013*).

Durante la primavera-estate del 2014, un'ulteriore diffusione è stata registrata, con nuovi focolai rilevati sempre in provincia di Lecce. Pochi mesi dopo, a marzo 2015, ad Oria (provincia di Brindisi),

viene riscontrato un ulteriore focolaio di CoDiRO (Dirigente del Servizio Agricoltura Regione Puglia, 2015).

### 1.4.3 Precedenti storici

Nella storia vi sono diversi precedenti di deperimento e danni gravi agli olivi nel Salento. Verso la fine del Settecento e all'inizio del Novecento, alterazioni della chioma hanno causato ingenti danni agli alberi coltivati, principalmente nella parte occidentale della Penisola Salentina. La bruciatura fogliare (o “brusca”) lì osservata era stata causata da un disturbo di origine abiotica (“brusca non parassitaria”) nell'approvvigionamento idrico degli olivi, dovuta a insufficiente umidità nel terreno, radici danneggiate, carenza di nutrienti, venti caldi, secchi o salmastri. Concorreva anche un agente biotico nel determinare la “brusca parassitaria”, indotta da deboli patogeni fungini come lo *Stictis panizzei* (De Not.) o da altri funghi o batteri invasori dello xilema che ostruiscono i vasi conduttori dell'acqua (Frisullo *et al.*, 2014).

Successivamente, nel 1974, in campi di agrumi in agro di Gallipoli (provincia di Lecce) vennero osservati su numerosi alberi di olivo consociati dei sintomi quali: ingiallimento delle foglie, disseccamento apicale e defogliazione. Si appurò che la causa era stato il Bromacile, un erbicida utilizzato nei campi di agrumi che, assorbito dalle radici, causò agli alberi di olivo seri danni (Luisi & De Cicco, 1975).

Altre problematiche fitopatologiche di rilievo nel Salento a carico dell'Olivo erano state segnalate a partire dal 2006 dalle autorità fitosanitarie della regione Puglia, consistenti in disseccamenti sugli alberi, successivamente attribuiti a “Lebbra delle Olive” (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*). Le cause scatenanti la malattia furono ricondotte a mutamenti macro e micro climatici ed a condizioni agronomico-colturali; vennero quindi attivati campi sperimentali e infine definite strategie di controllo sotto forma soprattutto di misure agronomiche (Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2011).

Nonostante i ricorrenti episodi di grave declino, gli olivi hanno ripreso a vegetare e produrre, esprimendo un comportamento fortemente resiliente, dovuto probabilmente alle loro caratteristiche fisiologiche e all'adattamento all'ambiente maturato da parte delle varietà autoctone in circa 40 secoli di coltivazione in questo territorio.

### 1.4.4 Caratteristiche della fitopatia e stato della ricerca scientifica

La diffusione di CoDiRO ha avuto fin dall'inizio un andamento irregolare, interessando alcune aree in maniera più severa di altre. Un'elevata variabilità nell'intensità dei sintomi era osservabile anche tra oliveti contigui o presenti in aree circoscritte: nella stessa provincia di Lecce si trovano ancora appezzamenti con alberi all'apparenza completamente disseccati, altri con vari gradi di sintomatologia, altri ancora privi di sintomi da “disseccamento rapido dell'olivo” (figure da 1.14 a 1.18).



Fig. 1.14 Lecce: oliveti con chioma verde contigui ad olivi con chioma disseccata. (40.393814; 18.221259) (Ortofoto Riprese AGEA 2016)  
<http://webapps.sit.puglia.it/freewebapps/MonitoraggioXFSintesi/>



Fig. 1.15 Torchiarolo (BR): oliveti con chioma verde contigui ad olivi con chioma disseccata. (40.393814; 18.221259)



Fig. 1.16 Trepuzzi (LE): oliveti con chioma verde contigui ad olivi con chioma disseccata (40.425957; 18.061183). Triangoli rossi = positivi a *X. fastidiosa* subsp. *pauca*; triangoli verdi = negativi a *X. fastidiosa* subsp. *pauca*.

(consultato il 09/10/2016)

<http://webapps.sit.puglia.it/freewebapps/MonitoraggioXFSintesi/>



Fig. 1.17 Otranto (LE): Olivi sottoposti a diversi metodi di gestione con diversa sintomatologia (40.138095; 18.467825) (Fonte: Scortichini, 2020a)



Fig. 1.18 Nardò (LE): Olivi sottoposti a diversi metodi di gestione con diversa sintomatologia (40.187637; 17.987413) (Fonte: Scortichini, 2020a)

Nel 2013, ai primi riscontri ufficiali dei disseccamenti, nelle piante sintomatiche sono stati individuati funghi tracheomicotici di diversi generi e la presenza di larve di fitofagi. A seguito dei rilievi che attribuivano congiuntamente ad insetti e microorganismi l'eziologia del disseccamento, le autorità fitosanitarie e gli istituti responsabili delle ricerche definirono la fitopatia come *Complesso del disseccamento rapido dell'Olivo* (CoDiRO) (Guario *et al.*, 2013).

Le risultanze molecolari raccolte dall'Università di Bari fino ad ottobre 2013 indicavano che il ceppo salentino di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* apparteneva a un genotipo che non infettava vite o agrumi ed era dotato di scarsa patogenicità per l'olivo. Di ciò era stata data notizia al Servizio Fitosanitario Regionale e al Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali; inoltre, se n'era parlato nei numerosi incontri con tecnici e agricoltori che si erano tenuti nelle zone colpite. In conclusione, vi erano a quel momento evidenze che indicavano come *X. fastidiosa* subsp. *pauca* da sola non fosse in grado di indurre lo stato patologico, ed altri fattori interagivano nell'eziogenesi del disseccamento rapido dell'olivo (Martelli, 2013).

Tuttavia, a causa della rilevanza e della pericolosità dei fitopatogeni da quarantena, la maggior parte degli studi si è concentrata su *X. f.* subsp. *pauca* e i suoi vettori.

Molti studi riportano che la presenza di *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* determina un'infezione sulle piante di olivo che si diffonde sistematicamente a partire dalle foglie, colpendo ramoscelli, rami, tronco e radici, causando inesorabilmente la morte dell'intera pianta entro 2-4 anni (Martelli *et al.*, 2016; Jeger *et al.*, 2018; Fierro *et al.*, 2019; D'attoma *et al.*, 2019; Martelli, 2016a).

Di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ceppo CoDiRO (ST 53) è stato caratterizzato il genoma (Cariddi *et al.*, 2014) e poi nel marzo 2016 è stato completato il test di patogenicità. Diversi studi hanno poi individuato quale vettore del batterio l'Emittero Afroforide *Philaenus spumarius* (Sputacchina media) endemico nel Salento (Saponari *et al.*, 2014). Si conviene unanimemente, comunque, che anche l'uomo con i suoi spostamenti, contribuisca attivamente alla diffusione dell'insetto.

Successivamente, è stato scoperto che possono svolgere il ruolo di vettori anche *Neophilaenus campestris* e *Philaenus italosignus* (Cavaliere *et al.*, 2018).

Sulla base dei primi dati, sia la ricerca scientifica sia le misure adottate dalle autorità fitosanitarie si sono poste come obiettivo "l'eradicazione" del batterio, considerato il responsabile unico del disseccamento.

Secondo i criteri chiariti da Sosnowski *et al.* (2009), per un'eradicazione efficace dei patogeni in una determinata area, si richiede: (a) la pronta identificazione dell'agente causale trovato in un nuovo sito, (b) un'area infetta ristretta e limitata, (c) un'organizzazione locale efficace per lo sradicamento delle

colture, e (d) caratteristiche biologiche del microrganismo che ne garantiscano la completa eliminazione.

La situazione nel Salento era diversa, in quanto l'area infetta, al momento dell'identificazione ufficiale della malattia, era estremamente vasta; inoltre, il fatto che *X. f. subsp. pauca* potesse sopravvivere in molte specie di piante coltivate e selvatiche non ha reso possibile l'eliminazione affidabile del microrganismo dall'area.

Infatti, nonostante l'estirpazione di migliaia di alberi di olivo, le potature drastiche, i trattamenti insetticidi per il contenimento del vettore e gli interventi per l'eliminazione delle erbe infestanti, non si è riusciti ad ottenere l'effetto ipotizzato.

L'infezione ha proseguito la sua espansione e la cosiddetta "Zona Cuscinetto" è stata in più riprese spostata a nord per complessivi 80 chilometri circa (Dirig. Serv. Agricoltura Regione Puglia, 2015; Dirig. Osserv. Fitosanitario Puglia, 2019).

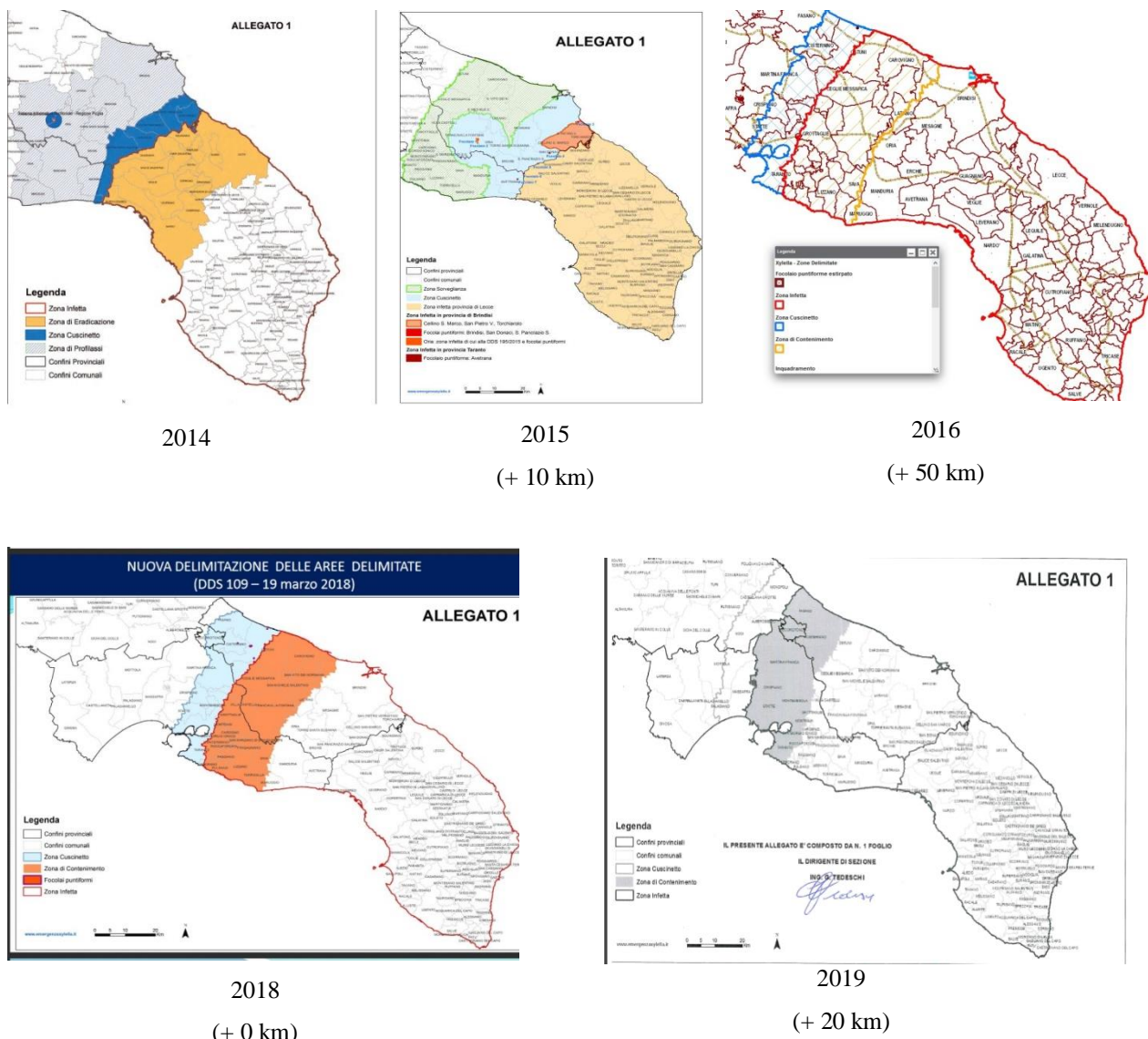


Fig. 1.18 Avanzamento della Zona Infetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* in Puglia dal 2014 al 2019. (cartine allegate alle Determinazioni dirigenziali del Servizio Agricoltura o dell'Osservatorio Fitosanitario Regionale). Tra parentesi sono indicati i km di avanzamento rispetto alla determinazione precedente.

L'obiettivo di eradicare il patogeno, su cui si è basata per anni la strategia d'intervento, è da più parti messo in discussione: l'esperienza maturata negli USA (su vite) e poi nei Paesi del centro e sud America in cui la presenza di *X. fastidiosa* è endemica su differenti specie vegetali, dimostra che questo batterio, una volta individuate condizioni climatiche favorevoli in un determinato areale, vi si insedia stabilmente, diventando di fatto non eradicabile (Lopes *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2011). Anche l'EFSA è giunta alla conclusione che è improbabile l'eradicazione di *X. fastidiosa*, cioè la sua totale eliminazione da una zona focolaio, a causa della estesa gamma di piante ospiti e delle numerose specie di insetti potenziali vettori (EFSA, 2015b).

#### 1.4.5 Il quadro normativo

L'evoluzione della diffusione del patogeno, nonché il miglioramento delle conoscenze sullo stesso e, in particolare, sulle specie potenzialmente sensibili al contagio, ha determinato un articolato corpus legislativo costituito da normativa comunitaria, nazionale e regionale, volta a definire le azioni da intraprendere per il controllo del contagio e a identificare le zone interessate.

Successivamente all'individuazione nel Salento dell'organismo nocivo da quarantena *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* nel mese di ottobre 2013, con la Delibera n. 2023 del 29 ottobre 2013 della Giunta della Regione Puglia vengono prescritte le prime misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione del batterio, prevedendo tra l'altro attività di monitoraggio per suddividere il territorio regionale in "zone", in base alla presenza di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (zona focolaio, zona di insediamento, zona tampone, zona di sicurezza).

Sempre ad ottobre 2013 il Comitato Fitosanitario Nazionale identifica le prime misure urgenti.

Il 13 febbraio 2014 la Commissione UE emana la Decisione di esecuzione 2014/87/UE relativa alle misure per impedire la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa*. Seguiranno la Decisione di esecuzione 2014/497/UE e la Decisione di esecuzione (UE) 2015/789 del 18 maggio 2015. Quest'ultima, in particolare, prevede una demarcazione delle aree colpite dall'organismo da quarantena a seguito di puntuale monitoraggio e all'analisi di laboratorio dei campioni prelevati in campo, nonché l'adozione di specifiche misure necessarie per evitare la diffusione del patogeno in aree indenni; su questa Decisione si è basata la strategia italiana di lotta al patogeno.

Nel frattempo, la Deliberazione di Giunta della Regione Puglia n. 1842 del 5 settembre 2014 richiede la dichiarazione di stato di emergenza fitosanitaria straordinaria e la conseguente emanazione di specifiche norme per l'eradicazione e il contenimento delle infezioni di *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Fa seguito il Decreto Ministeriale n. 2677 del 26 settembre 2014 con cui si crea un "cordone sanitario" per contenere e quindi limitare la diffusione del batterio a nord del Salento.

Con la nomina del Commissario Straordinario all'emergenza *Xylella* (Ordinanza della Protezione civile n. 225 dell'11 febbraio 2015) e l'approvazione del piano d'azione presentato dallo stesso Commissario Silletti, si prevede una linea di confine con una zona cuscinetto, a ridosso della quale si deve provvedere allo sradicamento per evitare che l'epidemia si propaghi nel restante territorio regionale e fuori dalla Puglia. In sintesi gli interventi previsti sono:

- l'eliminazione delle piante ospiti presenti lungo strade, fossi, canali, aree verdi nella zona cuscinetto e nella fascia di eradicazione (Misura A.1);
- il controllo dei vettori presenti su infestanti degli oliveti e frutteti nella zona cuscinetto e in tutta la zona infetta (A.2);
- il trattamento fitosanitario per il controllo degli insetti vettori adulti nella zona cuscinetto e in tutta la zona infetta (A.3);
- l'estirpazione delle piante infette nei focolai puntiformi, nella fascia di eradicazione e in alcune aree della zona infetta (A.4);
- la distruzione delle piante ospiti di *Xylella* presenti nei vivai (A.5).

A livello comunitario, con la Decisione di Esecuzione (UE) 2015/789 del 18 maggio 2015, la Commissione Europea, nell'intento di rafforzare le misure di protezione per impedire l'introduzione e la diffusione di *X. fastidiosa* nell'Unione, ha previsto una diversa definizione della "Zona delimitata", suddivisa in "Zona Infetta" e "Zona Cuscinetto" (di almeno 10 km attorno alla Zona infetta), oltre la quale è istituita una "Zona di Sorveglianza"; inoltre, poiché nella maggior parte della provincia di Lecce non si ritiene più possibile eradicare *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, le misure "di eradicazione" non si applicano più alla Zona Infetta e vengono introdotte misure "di contenimento" da attuarsi nella "Zona di contenimento" di nuova istituzione (una fascia di 20 km della Zona Infetta a ridosso della Zona Cuscinetto).

In data 19 giugno 2015 viene approvato un nuovo Decreto Ministeriale con il quale vengono recepite nell'ordinamento nazionale le nuove disposizioni in materia di contrasto al batterio assunte dall'Unione Europea. Tale decreto sarà successivamente modificato dal D.M. 18 febbraio 2016

Tra le misure fitosanitarie che gli agricoltori devono applicare nei propri oliveti sono previste:

- estirpazione di tutte le piante infette in Zona Contenimento, e anche di quelle ospiti nel raggio di 100 metri nei nuovi focolai esterni alla provincia di Lecce;
- eliminazione di tutte le piante erbacee dagli oliveti;
- obbligo di trattamenti insetticidi per ridurre le popolazioni del vettore;
- arature e fresature del suolo;
- potatura straordinaria severa degli alberi sintomatici con eliminazione di tutta la parte vegetativa della pianta conservando solo il tronco e le branche primarie prive della vegetazione.

Le Decisioni di esecuzione della Commissione Europea (UE) 2015/2417 del 17 dicembre 2015, (UE) 2016/764 del 12/05/2016, (UE) 2017/2352 del 14/12/2017, 2018/927/UE del 27/06/2018 e 2018/1511/UE del 09/10/2018 hanno poi modificato la Decisione di esecuzione (UE) 2015/789 relativa alle misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa*. Agli atti della Commissione Europea sono seguite ulteriori norme nazionali e regionali di adeguamento, tra cui il DM n. 4999 del 13 febbraio 2018, successivamente modificato con il DM del 5 ottobre 2018.

Le decisioni e le misure finora attuate hanno avuto lo scopo prioritario di prevenire la diffusione della malattia nella Zona Cuscinetto e nella parte settentrionale della regione e di limitare la presenza del batterio nelle aree infette (Giunta Regionale Puglia, 2016). Nei focolai iniziali della Zona Infetta da anni non vengono più fatti i campionamenti per monitorare l'andamento della malattia, attualmente tutti concentrati nella Zona di Contenimento e nella Zona Cuscinetto.

Le misure fitosanitarie prescritte per il contenimento di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* non hanno sortito l'effetto voluto, anzi in molti casi hanno modificato in negativo la condizione degli alberi.

Secondo alcuni autori, le lavorazioni frequenti, profonde o che disgregano eccessivamente il terreno hanno un effetto negativo sullo stato fisico e sul ciclo della sostanza organica. Attualmente le lavorazioni sono considerate una tecnica non conservativa delle risorse naturali e pertanto dovrebbero sempre più perdere il ruolo di operazioni principali nella gestione del suolo ed invece assumere quello di interventi complementari in strategie di gestione conservative o aumentative della sostanza organica (Xiloyannis *et al.*, 2015).

La potatura severa generalmente non è considerata una buona pratica per l'olivo (Rodrigues *et al.*, 2018); l'indicazione di intervenire in questo senso alla comparsa dei primi sintomi di disseccamento, nel tentativo di ridurre l'inoculo di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* all'interno dell'albero, provoca un ulteriore indebolimento dello stesso (Saponari *et al.*, 2017). Una potatura troppo severa, soprattutto degli olivi secolari, può aver indebolito gli alberi e averli predisposti ad ulteriori attacchi biotici. Nel 2018 il dr. Schito (Dirigente dell'Ufficio Osservatorio Fitosanitario di Bari) in un'intervista sulle potature drastiche per contrastare il disseccamento, ha confermato che si era trattato di misure adottate come ripiego, non scelte con presupposti tecnici o supportati da teorie: "una misura di quelle, soprattutto nel periodo estivo, non l'avrebbe proposta nessuno dal punto di vista tecnico" (Tioli, 2018).

I trattamenti chimici con insetticidi imposti agli agricoltori per limitare la trasmissione della malattia e controllare gli insetti vettori possono avere conseguenze dirette e indirette sull'ambiente, possono modificare intere reti alimentari con conseguenze a cascata, semplificare l'agroecosistema, alterandone i già precari equilibri (EFSA, 2015a). Ciò potrebbe rendere più deboli gli olivi ed esporli maggiormente agli stress.

Ad agosto 2020, con il Regolamento di Esecuzione (UE) 2020/1201 della Commissione, viene introdotto un approccio più mirato al controllo dell'organismo nocivo basato sul principio di *proporzionalità*, che prevede, tra le altre misure, una minor larghezza delle zone cuscinetto (da 20 km a 5 km) commisurandola al livello di rischio e alla capacità di diffusione del vettore, e la

possibilità nelle aree infette di piantare qualsiasi varietà di olivo, dando la *preferenza* a quelle tolleranti o resistenti (Commissione Europea, *Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201*).

#### 1.4.6 Dall'eradicazione alla convivenza

Nel 2017, preso atto dell'impossibilità di eradicare il patogeno in quel contesto, l'obiettivo della comunità scientifica diventa quello della "convivenza" con l'organismo dannoso. Questo obiettivo si concretizza essenzialmente nell'individuazione di cultivar tolleranti o resistenti a *X. f. subsp. pauca* da utilizzare per nuovi impianti o con le quali praticare innesti sulle piante già esistenti.

Le cultivar attualmente considerate tolleranti a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* sono il Leccino e la selezione clonale FS17, entrambe poco presenti negli oliveti esistenti nel Salento. Nel 2017 la Commissione Europea ha consentito il reimpianto nelle zone infette con varietà valutate tolleranti o resistenti (Commissione UE, 2017). Le due varietà individuate hanno mostrato un aumento della popolazione batterica più contenuto e uno sviluppo dei sintomi molto più rallentato rispetto ad Ogliarola salentina e Cellina di Nardò, le cultivar più diffuse (Boscia *et al.*, 2017). Un'analisi trascrittomiche comparativa tra Leccino e Ogliarola salentina ha messo in luce una differente espressione genica delle due cultivar a seguito di un'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. La selezione FS-17, conosciuta anche col nome di "Favolosa" e nata come portainnesto clonale attraverso la selezione massale di semenzali della varietà Frantoio, ha mostrato una decisa tolleranza a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Stefani & Boscia, 2019).

Sulla parziale resistenza o tolleranza delle due cultivar mancano ancora dati sperimentali ottenuti in molti anni di ricerca. Questa circostanza è stata segnalata dall'Osservatorio Fitosanitario Regionale, il quale afferma, a proposito delle due varietà Leccino e FS17, che non si hanno ancora a disposizione dati riferiti al lungo periodo sia in tenuta della resistenza nel tempo, sia in termini di produttività (Dirigente Osservatorio Fitosanitario Reg. Puglia, 2018). Uno studio condotto dai ricercatori per conto dell'EFSA per valutare la suscettibilità di varietà di olivo al ceppo salentino di *Xylella*, riporta che piante di Leccino, inoculate con sospensioni di *X. f. subsp. pauca* insieme ad altre varietà, 12 mesi dopo l'inoculo mostrano nell'80% dei campioni una colonizzazione a livello sistemico da parte del patogeno e manifestano i caratteristici sintomi in alcune delle piantine esaminate. Al contrario, la varietà Coratina non ha mostrato sintomi di disseccamento in seguito all'inoculazione con il batterio (Saponari *et al.*, 2017).

#### 1.4.7 Intensivizzazione degli impianti

Alcuni ricercatori ed organizzazioni di categoria propongono di utilizzare queste due varietà per ricostituire e rinnovare gli oliveti salentini tradizionali, caratterizzati da ampi sestri d'impianto e dimensioni notevoli degli alberi. L'indicazione è di realizzare impianti intensivi utilizzando Leccino e FS17, perché cultivar che si prestano a tale tipologia gestionale, che a livello nazionale viene praticata su circa 2.000 ha (Tagliavini *et al.*, 2019). Il Decreto del Ministero delle Politiche agricole, alimentari e forestali n.1785 del 14 febbraio 2019 ha previsto finanziamenti per l'espianto di piante di olivo e il reimpianto con varietà tolleranti/resistenti.

Su questa profonda modifica del parco varietale dell'olivo nel Salento sono stati sollevati dubbi da più parti; alcuni amministratori pubblici, ricercatori e associazioni di cittadini ritengono sia un processo da valutare attentamente per diversi motivi.

Questa trasformazione metterebbe in discussione il cardine e la peculiarità dell'olivicoltura italiana, il cui punto di forza è il mantenimento dell'identità e della tipicità delle produzioni. Il modello italiano è da sempre legato a varietà autoctone e tipiche: una diversità biologica unica al mondo che può contare su oltre 400 cultivar adattate nel corso dei secoli allo specifico ambiente pedoclimatico di coltivazione.

Il progetto di espiantare gli oliveti tradizionali per sostituirli con impianti intensivi o superintensivi, che alcuni agricoltori in provincia di Lecce stanno già realizzando, rischia di non essere sostenibile dal punto di vista sia economico, sia ambientale.

L'olivicoltura salentina è costituita nella quasi totalità da aziende piccole (il 96,2% ha una dimensione economica inferiore a 8.000 € l'anno) (Brunetta, 2013), gestite da agricoltori in larga parte anziani, con scarsissima capacità d'investimento finanziario. Tali aziende sarebbero tagliate fuori da questo processo di trasformazione gestionale, a causa degli elevati costi d'impianto legati all'intensivizzazione. L'effetto finale potrebbe essere *tout court* la drastica riduzione dell'olivicoltura contadina nel Salento.

L'intensivizzazione, grazie alla meccanizzazione integrale delle operazioni colturali, determina una forte riduzione della manodopera bracciantile, settore che rappresenta un'importante fonte di reddito per la popolazione locale. I braccianti impegnati nella filiera oleicola sono oltre 7.000 nella sola provincia di Lecce (FLAI-CGIL, 2019).

Sul piano ambientale va considerata la fragilità del territorio salentino, sia dal punto di vista climatico e pedologico, sia per la scarsa qualità e disponibilità della risorsa idrica; l'impianto di cultivar esigenti in termini di apporti idrici e nutritivi pone diversi rischi. Sono inoltre da considerare i problemi fitosanitari registrati negli alberi coltivati con il sistema superintensivo, dovuti soprattutto all'irrigazione stabile e continua e all'ombreggiamento legato alla densità; tali caratteristiche incidono negativamente sulla sostenibilità e ne rendono improbabile la coltivazione biologica.

Il Ministero dell'Ambiente, nel "*Catalogo dei sussidi ambientalmente dannosi e dei sussidi ambientalmente favorevoli*" di dicembre 2019, qualifica come Sussidi Ambientalmente Dannosi (SAD) la misura del governo che incentiva nella zona infetta il reimpianto con piante tolleranti a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, perché favorisce una riduzione di biodiversità, esponendo la specie a nuove epidemie in futuro (Ministero dell'Ambiente, *Catalogo dei sussidi ambientalmente dannosi e dei sussidi ambientalmente favorevoli*, 2019).

L'Associazione Italiana delle Società Scientifiche Agrarie (AISSA), tra gli esempi di colture arboree ad alto grado di intensificazione inserisce l'olivicoltura ad altissima densità per la raccolta con macchine scavallatrici e, tra gli indici di sostenibilità ecologica da valutare, riporta la quantità di acqua irrigua consumata nella fase di produzione vegetale (Tagliavini *et al.*, 2019).

È importante che ogni ipotesi di rigenerazione del patrimonio olivicolo sia valutata in relazione allo specifico contesto territoriale, analizzando le ricadute e gli impatti in relazione alla sostenibilità.

#### 1.4.8 Strategie di convivenza

Si ritiene di dover rendere evidente che agli agricoltori della zona infetta non è mai stata data alcuna indicazione a proposito di possibili interventi fitoiatrici, nutrizionali e/o agronomici di contrasto diretto alla malattia o finalizzati alla rivitalizzazione degli alberi deperiti o alla ricostituzione della fertilità del suolo, la cui compromissione è nota da anni.

Pur se con le dovute differenze per quanto riguarda gli aspetti epidemiologici, esperienze recenti in Italia e nel mondo su altri patogeni di natura batterica, quale ad es. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) su Actinidia, testimoniano la percorribilità della strada della convivenza con il batterio, con un controllo della sua incidenza attraverso il continuo monitoraggio, la costante prevenzione, trattamenti con prodotti cuprici a ridotto titolo, utilizzo di BCA, la riduzione di situazioni di stress fisiologico e mirate tecniche colturali (Balestra *et al.*, 2014).

La mancanza di terapie o rimedi praticabili contro la malattia è diventato un concetto ricorrente, che ha fatto sentire abbandonati a se stessi gli olivicoltori. Per impedire l'avanzata verso nord del batterio si è assistito, anche in zona infetta, all'espianto di alberi secolari positivi al saggio molecolare per *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, sebbene totalmente asintomatici.

Peraltro, i dati disponibili relativi a monitoraggi e campionamenti effettuati dal Servizio Fitosanitario Regionale, mettono in discussione la correlazione diretta ed univoca tra il batterio e la sintomatologia.

*X. fastidiosa* subsp. *pauca* non è sempre stata rinvenuta in campioni prelevati da alberi con sintomi ascrivibili a “disseccamento rapido dell’olivo”: nel monitoraggio 2014/15, su 26.755 alberi campionati, per lo più in zona infetta, i positivi al batterio erano il 2,3% (MIPAAF, 2015); nel monitoraggio 2018/19 erano il 2,5% (Regione Puglia - Osserv. Fitosanitario, 2019).

Uno studio ha analizzato le indagini di monitoraggio eseguite in Zona Infetta-Contenimento e in Zona Cuscinetto tra settembre 2017 e marzo 2018 ed ha riscontrato che il 20% degli alberi privi di sintomi (n. 1653) ha rivelato la presenza di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e il 61% di quelli sintomatici (n. 3300) è risultato negativo ai test (Scortichini & Cesari, 2019).

Questi dati pongono domande e aprono ad elementi di riflessione sul ruolo che può essere svolto da fattori ambientali e di contesto (climatici, pedologici, microbiologici, nutrizionali, agronomici) nello sviluppo dei sintomi del disseccamento rapido degli olivi.

Da una ricerca effettuata su [www.scopus.com](http://www.scopus.com), dal 2013 risultano oltre 500 studi su *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, finalizzati a indagarne la struttura genomica, la sua origine e le tecniche di rilevazione, gli aspetti genetici, il ciclo biologico, la gamma di ospiti, il ruolo e la biologia dei vettori, la sua potenziale diffusione, ecc. Tuttavia, pochi studi hanno finora indagato le condizioni dell'agroecosistema oliveto nel loro insieme e le relazioni tra lo stato nutrizionale e fitosanitario preesistente delle piante e lo sviluppo di sintomi da disseccamento rapido.

Per perseguire la strada della convivenza con il patogeno, appare urgente individuare misure ed azioni che abbiano come obiettivo la riduzione dei sintomi da “disseccamento rapido dell’olivo” e il contenimento dei fattori predisponenti il declino rapido delle piante di olivo. Pratiche agronomiche razionali capaci di ripristinare la fertilità del suolo e di tutelarne l’equilibrio microbiologico potrebbero mettere in condizioni gli olivi salentini di esprimere quella resilienza alle avversità biotiche e abiotiche che li ha sempre caratterizzati.

Tecniche tradizionali e prodotti innovativi sono stati sperimentati con discreto successo ed hanno mostrato che piante malate possono veder ridotti in maniera significativa i sintomi in campo e la concentrazione di cellule patogene nei tessuti vegetali (Scortichini *et al.*, 2018; Bruno *et al.*, 2020). Questi risultati sono molto importanti e meritano un ampliamento delle sperimentazioni, soprattutto in considerazione del fatto che la Commissione Europea ha concesso la possibilità di reimpianto in via preferenziale di varietà tolleranti o parzialmente resistenti al batterio, valorizzando quindi la loro precipua caratteristica di rallentare la manifestazione dei disseccamenti; in tal modo ha ritenuto di applicare il criterio della riduzione dei sintomi e non quello di perseguire l’immunità totale o la scomparsa dell’organismo patogeno dall’ospite.

Per delineare una percorribile strategia integrata di “convivenza produttiva” degli alberi presenti nel Salento potrebbe essere utile prendere come riferimento il “Piano di interventi nel settore olivicolo-oleario” del Ministero dell’Agricoltura con i suoi obiettivi prioritari (MiPAAF, 2016):

- incrementare la produzione nazionale di olio extravergine di oliva senza accrescere la pressione sulle risorse naturali e sulla risorsa idrica;
- razionalizzare la coltivazione degli oliveti tradizionali con l’introduzione di nuovi sistemi che riducano l’uso di mezzi chimici di sintesi e aumentino la fertilità del terreno;
- conciliare la sostenibilità ambientale con quella economica;
- salvaguardare l’olivicoltura a valenza paesaggistica;
- valorizzare l’olivicoltura storica e di difesa del territorio.

Il declino degli olivi nel Salento non è solo una grave fitopatia, ma una problematica che coinvolge in profondità altri importanti elementi del territorio interessato, sui quali sta avendo un impatto drammatico.

Da questa coltura millenaria dipendono le sorti economiche di decine di migliaia di agricoltori, ma anche l’identità culturale di vaste comunità. La valenza storica e paesaggistica, costituita da olivi

secolari e millenari irriproducibili, non può essere sottovalutata. I molteplici servizi ecosistemici forniti da questi alberi maestosi, primo fra tutti la mitigazione del clima, vanno tutelati e ripristinati. La sfida per la comunità scientifica è di riuscire a individuare delle soluzioni efficaci, durature e sostenibili sotto il profilo ambientale, economico e sociale, attraverso un approccio multidisciplinare in una prospettiva agroecologica da sviluppare con urgenza.

Il lavoro enorme fatto finora dai ricercatori ci ha permesso di chiarire la suscettibilità delle cultivar, gli aspetti del rilevamento, la tassonomia, l'origine dei patogeni e la diffusione del vettore nell'area, le implicazioni economiche e le misure di eradicazione. Tuttavia, a distanza di anni dall'insorgenza della malattia, alcune domande restano ancora aperte.

Considerata la biologia e l'etologia dei vettori di *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, resta da spiegare la diffusione irregolare della malattia, inizialmente a macchia di leopardo e che tuttora mostra alberi o campi indenni o paucisintomatici adiacenti ad altri gravemente compromessi.

Dai monitoraggi eseguiti negli anni sul territorio emerge una scarsa corrispondenza tra la positività ai test molecolari e la presenza di sintomi da “disseccamento rapido” sugli alberi di olivo. Data l'ampiezza dei numeri, si potrebbe escludere l'ipotesi dell'inadeguatezza nei prelievi: resta quindi da comprendere il motivo per cui molti alberi, situati in una zona che è stata dichiarata infetta già da diversi anni, risultino positivi al batterio senza mostrare sintomi, mentre in molti alberi sintomatici *X. fastidiosa* subsp. *pauca* non sia stato rilevato (MIPAAF, 2015; Regione Puglia - Osserv. Fitosanitario, 2019; Scortichini & Cesari, 2019).

Nei primi anni, a partire dal 2014, la malattia si è diffusa con una velocità sostenuta, per poi rallentare vistosamente a ridosso dei limiti settentrionali ed occidentali del Salento, nonostante vi sia anche nelle zone indenni la presenza di ospiti suscettibili e di vettori idonei (Dirig. Serv. Agricoltura Regione Puglia, 2015; Dirig. Osserv. Fitosanitario Puglia, 2019; Scortichini, 2020b).

Sarebbe interessante analizzare attentamente alcune caratteristiche epidemiologiche legate al “disseccamento rapido dell'olivo” per comprendere se possano sussistere fattori in grado di determinare una recettività differenziale della malattia di un'area rispetto ad un'altra, e se possa influire su tale recettività una capacità di resilienza degli alberi, riferita a elementi predisponenti collegati allo stato di salute del suolo e alle modalità di gestione agronomica degli oliveti.

## **2 Scopo del lavoro**

L'olivo è una coltura che caratterizza fortemente il bacino del Mediterraneo e ricopre in quest'area un'importanza rilevante, non solo a livello economico, ma anche paesaggistico, ambientale e culturale. Il nostro paese, in particolare, possiede un patrimonio olivicolo unico al mondo ed irripetibile, che proprio in Puglia vede la maggiore estensione e che oggi il “disseccamento rapido dell'olivo” rischia di danneggiare per sempre.

Il “disseccamento rapido dell'olivo” costituisce un quadro sintomatologico grave e complesso, per il quale non sono state ancora individuate strategie efficaci di controllo o di riduzione del danno arrecato nei territori colpiti.

Le condizioni climatico-ambientali, che incidono talvolta in modo molto significativo sull'espressione della malattia, costituiscono a tutt'oggi un aspetto rilevante su cui indagare, anche in considerazione del quadro sintomatologico collegato alla presenza di *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* su olivo.

Il monitoraggio climatico-ambientale, sullo stato nutrizionale delle piante e sulle tecniche di gestione agronomica di contesto all'espressione del “disseccamento rapido dell'olivo” può essere pertanto centrale nel definire uno scenario di riferimento per inquadrare elementi predittivi, interventi preventivi o azioni di contenimento dei danni.

Per definire azioni di monitoraggio opportune, a tutt'oggi non ancora disponibili, si rende necessaria l'adozione di un approccio multidisciplinare integrato allo studio dell'ecologia del suolo e della rizosfera dell'olivo in relazione al contesto chimico-biochimico, in riferimento alla presenza o meno del “disseccamento rapido dell'olivo”.

Il microbioma rizosferico risente delle differenti pratiche agricole messe in atto e condiziona, a sua volta, lo stato nutrizionale e di salute degli alberi di olivo.

L'adeguata presenza di elementi nutritivi nei tessuti vegetali può consentire alle piante di sopportare ed affrontare diversi stress biotici e abiotici.

Lo studio effettuato, partendo dall'osservazione che anche in areali omogenei la malattia ha determinato sintomi di diversa gravità negli alberi colpiti, si è proposto di confrontare impianti con la stessa cultivar di olivo affetti da “disseccamento rapido” rispetto ad uno privo di sintomi, attraverso un'indagine multidisciplinare che ha tenuto conto di analizzare:

- i dati climatici locali e le tecniche di gestione agronomica che possono condizionare l'insorgenza e la gravità della malattia;
- la quantificazione del danno in relazione ai sintomi da “disseccamento rapido dell'olivo”;
- lo stato nutrizionale delle piante e la produzione di metaboliti di difesa;
- le caratteristiche fisico-chimiche di base del suolo;
- gli indicatori chimico-biochimici del suolo;
- l'ecologia batterica dei suoli attraverso tecniche di metabarcoding avvalendosi dell'approccio NGS (*next generation sequencing*);

L'ipotesi è verificare la sussistenza di differenze tra gli impianti oggetto di studio in riferimento agli indicatori individuati e valutare eventuali relazioni tra i parametri indagati e lo sviluppo della malattia.

*PARTE SPERIMENTALE 1*

**3 Gli oliveti oggetto di studio**

Al fine di valutare i potenziali effetti delle specifiche condizioni ambientali sulle interazioni suolo-pianta-microorganismi sono stati individuati degli oliveti situati nel Salento, dei quali sono stati studiati alcuni parametri edafici e fisiologici.

Questa prima fase di studio relativa alla scelta e alla descrizione degli appezzamenti sperimentali, all'indagine sulle loro peculiari caratteristiche fitopatologiche, climatiche e gestionali, era propedeutica alle analisi che sono state condotte nelle due successive fasi, in merito sia alla biodiversità microbica della rizosfera e ad alcune caratteristiche chimico-biochimiche del suolo, sia allo stato nutrizionale degli olivi.

Con i primi sopralluoghi nel 2017 sono stati ispezionati diversi appezzamenti da mettere a confronto, ponendo come condizione che fosse presente la stessa varietà di olivo: si è scelta la cv. Cellina di Nardò, varietà sensibile a *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, una delle due cultivar autoctone più diffuse nel Salento. Tale scelta aveva l'obiettivo di evitare che la variabile varietale potesse influire sulle eventuali differenze tra i dati rilevati negli appezzamenti.

In questa prima fase sperimentale sono stati esaminati la situazione fitopatologica, i principali parametri climatici e sono state raccolte informazioni sulla gestione agronomica degli appezzamenti, per avere un quadro di conoscenze più ampio sulle condizioni effettive dell'agroecosistema oliveto.

### 3.1 Descrizione degli oliveti

Sono stati individuati tre oliveti con alberi dall'età omogenea di circa 40-60 anni ma con diverse manifestazioni di "disseccamento rapido dell'olivo". Le aziende prescelte ricadono tutte nella "Zona Infetta" da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* interessata dal fenomeno del disseccamento di parti della chioma. Gli oliveti individuati si caratterizzano per una diversa manifestazione della sintomatologia tipica da "disseccamento rapido dell'olivo".

Il declino degli alberi si manifesta in tale vasta area ancora oggi con un pattern irregolare, poiché ad estese aree gravemente affette dai sintomi, si alternano oliveti con sintomatologia più leggera ed altri senza evidenze di disseccamenti (Figura 3.1).

#### Oliveto di Alezio (SS)

Un appezzamento è situato nel comune di Alezio, in provincia di Lecce (coordinate GPS 40.070450, 18.043294), contraddistinto con il codice SS; ricade nella zona ove si sono manifestati i primi focolai della fitopatia: in quest'area nei dintorni di Gallipoli, i primi sintomi di una malattia dell'olivo di origine sconosciuta sono stati osservati intorno al 2007-2008, quando sono state notate bruciature delle foglie e deperimento di ramoscelli e rami su alberi giovani e centenari (Martelli *et al.*, 2016) L'azienda in esame ricade nell'area che è stata demarcata come "Zona Infetta" il 18/04/2014 (Dirigente Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2014). Questo appezzamento era quello più compromesso, con sintomi di disseccamento alle branche ed ai rami molto severi ed in stato avanzato (Figura 3.1 c).

L'appezzamento si trova a livello del mare, la giacitura è pianeggiante; il suolo presenta una pietrosità bassa con tessitura sabbioso-argillosa. Confina con una linea ferroviaria locale, un incolto ed un seminativo delimitato da una fila di alberi di olivo.

L'oliveto è diviso in due parti: una costituita da 53 alberi di medie dimensioni appartenenti alle varietà Cellina di Nardò e Ogliarola salentina, impiantato con sesti ampi ed irregolari alla fine degli anni '50, con forma d'allevamento a vaso; l'altra vede la presenza di circa 200 alberi disetanei di diverse varietà impiantate con sesti più fitti nei decenni successivi. In questa seconda parte sono presenti in consociazione agrumi e ad altri fruttiferi (albicocchi, fichi, diospiro, peschi, ecc.). L'intero oliveto è dotato di impianto d'irrigazione.

Per le analisi sono stati scelti 5 alberi appartenenti alla cv. Cellina di Nardò di circa 65 anni di età situati nella prima parte. La loro produzione di olive si aggirava intorno ai 2 q per pianta nelle annate

di carica; l'alternanza di produzione aveva un periodo biennale. L'ultima raccolta è stata eseguita nel 2014.

#### *Oliveto di Torchiarolo (MS)*

Questo oliveto è stato scelto in agro di Torchiarolo, in provincia di Brindisi (coordinate GPS 40.506313, 18.068236 - codice MS), con una situazione fitopatologica intermedia rispetto agli altri due. La zona in cui ricade è stata dichiarata infetta a novembre 2015 (Determinazione del Dirigente Servizio Agricoltura Regione Puglia 5 novembre 2015, n. 571). Anche quest'oliveto è costituito da alberi della varietà Cellina di Nardò di circa 50-60 anni di età, posizionato su un terreno in leggerissima pendenza; la forma di allevamento è il vaso ed il sesto d'impianto è 10 x 8. Confina a Nord con un canale, a Sud con una strada comunale, ad Est ed Ovest con altri oliveti.

L'apezzamento è situato a livello del mare, è privo d'irrigazione e il terreno, di tessitura sabbiosa, ha una bassa pietrosità. Nell'oliveto sono presenti 36 olivi con alcuni mandorli consociati. La produzione di olive oscillava tra i 70 e i 100 quintali l'anno, con una media per albero di 2,0 – 2,8 q. La potatura aveva cadenza quadriennale. L'ultima raccolta è stata effettuata nel 2017.

#### *Oliveto di San Ligorio (AS)*

L'oliveto si trova a San Ligorio, all'interno del comune di Lecce, dichiarato infetto il 16/01/2015 (Dirigente Servizio Agricoltura Regione Puglia, 2015); era stato lievemente interessato da alcuni disseccamenti di ramoscelli ed è attualmente pressoché indenne dalla peculiare sintomatologia da "disseccamento rapido dell'olivo", tranne pochissimi rami terminali con foglie disseccate (coordinate GPS 40.388690, 18.220066 – codice AS). È completamente circondato da altri olivi dello stesso proprietario, la maggior parte dei quali secolari.

La giacitura è pianeggiante, al livello del mare; il terreno è sabbioso-argilloso, mediamente pietroso, in varie zone sono presenti rocce calcaree affioranti. La porzione di oliveto selezionata per il presente studio è costituita da circa 50 olivi coetanei di circa 50 anni della cv Cellina di Nardò. Gli alberi, allevati a vaso, non sono di grandi dimensioni, probabilmente per il ridotto spessore del suolo e per l'assenza di irrigazione; il sesto d'impianto è ampio ed irregolare, come in moltissimi impianti della zona. La produzione è alternante ogni due anni. L'oliveto è attualmente in produzione.

L'indagine negli oliveti oggetto di studio è stata resa possibile dalla collaborazione e dalla disponibilità dei signori: Ivano Gioffreda, Mario Miccoli, Fabio Ingrosso.

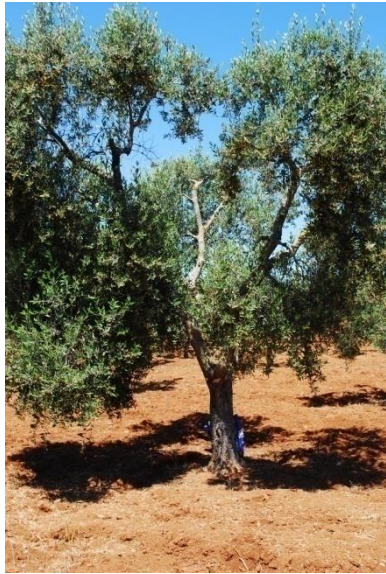


Figura 3.1 Alberi di olivo dei tre appezzamenti campione: S. Ligorio AS (sinistra); Torchiarolo MS (al centro); Alezio SS (a destra). Primavera 2017.

## 3.2 Materiali e metodi

### 3.2.1 Analisi della sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo” negli appezzamenti

Sulla base di quanto già affermato e verificato in un altro studio (D’attoma *et al.*, 2019), poiché *X. fastidiosa* subsp. *pauca* è diffusa nei comuni in cui ricadono i campi campionati da almeno 6 anni, nessun albero può essere ritenuto immune dal contagio in questi appezzamenti: è stata pertanto valutata la severità dei sintomi presenti nei tre oliveti campione. Negli oliveti AS (San Ligorio) e SS (Alezio), la sintomatologia a carico dei singoli alberi era omogenea e, attraverso un’attenta analisi visuale, sono stati individuati cinque alberi campione in ogni appezzamento (circa il 10-13% degli alberi presenti), rappresentativi dello stato di salute dell’oliveto nel suo complesso. Su questi alberi si è tenuto conto di quantificare il danno attraverso la conta di rami e branche affette da disseccamento rapido e/o caratterizzati dalla tipica bruciatura fogliare.

Nell’oliveto MS (Torchiarolo) la situazione sintomatologica era eterogenea; in questo sito, pertanto, è stata effettuata un’analisi iniziale molto più dettagliata, con la conta dei rami mostranti sintomi di disseccamento associati al “disseccamento rapido dell’olivo” su tutti gli alberi presenti. Ciascun albero è stato assegnato ad una classe di valore di gravità dei sintomi calcolando la percentuale di organi vegetativi colpiti ed è stata calcolata l’incidenza relativa al sito, al fine di quantificare il danno (Matta *et al.*, 2017). Sono stati scelti anche in questo appezzamento cinque alberi rappresentativi della situazione fitopatologica, per il confronto con gli altri due siti, e anche al fine di seguirne l’evoluzione nel corso del tempo.

La gravità del disseccamento è stata valutata secondo una scala di gravità di sintomi sulla chioma in cui: 1 = assenza di disseccamento; 2 = disseccamento leggero (1-25 % dei rami presenti); 3 = disseccamento medio (26-50 %); 4 = disseccamento grave (51-75 %); 5 = disseccamento gravissimo (> 75%) (Tab. 3.2). Sono stati effettuati due rilievi fitopatologici a settembre 2017 e settembre 2018.

### 3.2.2 Il clima negli oliveti campione

L’importanza del clima sulla diffusione di *X. fastidiosa* è stata approfondita in diverse ricerche (Bosso *et al.*, 2016; Godefroid *et al.*, 2018). Nel presente studio si è deciso di indagare quei fattori del clima che in letteratura sono legati a modelli predittivi dello sviluppo del patogeno.

Anche in questo caso, l’obiettivo è stato di mettere a confronto i parametri climatici specifici di ciascuna area in cui ricadono i campi sperimentali, per valutare eventuali differenze che potessero essere messi in relazione con il diversificato decorso della sintomatologia.

Per analizzare i parametri climatici sono stati acquisiti i dati della Regione Puglia - Sezione Protezione Civile, Centro Funzionale Decentrato di Modugno (Ba), che gestisce i dati pluviometrici e meteorologici forniti da stazioni di rilevamento diffuse sul territorio regionale.

In particolare, sono stati acquisiti i dati relativi alle precipitazioni giornaliere e totali mensili, alla temperatura minima e massima giornaliera e temperatura media mensile, all’umidità relativa media giornaliera e mensile delle stazioni di rilevamento di: San Pietro Vernotico (situata a meno di 5 km dall’oliveto di Torchiarolo - cod. MS), Lecce (cod. AS) e Gallipoli (posta a circa 5 km dal campo sperimentale di Alezio - cod. SS).

L’analisi è stata realizzata grazie al prezioso contributo del Dr. Luca Mancini, ricercatore dell’ISTAT presso l’Ufficio Territoriale per il Lazio, il Molise e la Calabria di Campobasso.

I dati esaminati sono stati registrati quotidianamente dalle centraline meteorologiche ubicate nei tre areali che partecipano all’esperimento tra il 01.01.2000 e il 31.12.2017.

L'analisi si basa su indicatori calcolati a livello mensile aggregando i valori giornalieri. Gli indicatori sono stati calcolati soltanto per i mesi nei quali tutte le centraline hanno registrato dati utili per almeno 21 giorni. In base a questo criterio,

si fa riferimento ad una sottopopolazione di 5.478 giorni corrispondenti a 183 mesi (rispetto agli originari 6.575 giorni / 216 mesi complessivi), come da Tabella 3.1.

Tabella 3.1 I mesi esclusi dall'analisi dei dati climatici dei tra areali dal 2000 al 2017.

anno	mesi esclusi (1= gennaio,...12=dicembre)	anno	mesi esclusi
2000	1,2,3,4,5,6	2009	
2001	2,3,7,8,12	2010	
2002		2011	
2003	5,6,7,8,9,10	2012	3,4,5,6
2004		2013	8,9
2005		2014	
2006	6,7,8,9,10,11,12	2015	
2007	1,2,3	2016	
2008		2017	

### 3.2.3 Gestione agronomica degli oliveti

L'importanza delle scelte colturali nel controllo delle malattie è stata più volte messa in evidenza (Garibaldi & Gullino, 2010; Janse, 2012).

Nell'ambito del presente progetto di studio, al fine di avere un quadro di conoscenze più completo sui fattori che possono aver inciso sulle diverse risposte che piante della stessa cultivar hanno dato al diffondersi della fitopatologia nella penisola salentina, sono state raccolte informazioni sulle tecniche di gestione degli oliveti da un punto di vista agronomico e fitosanitario.

Sono stati effettuati numerosi sopralluoghi negli appezzamenti e sono state realizzate interviste con i conduttori degli oliveti. Si è ritenuto estremamente importante acquisire conoscenze ed opinioni di chi ha sempre vissuto quella realtà agricola specifica ed ha conoscenze particolareggiate sull'ambiente di coltivazione, sulla risposta delle piante alle sollecitazioni ambientali e colturali e sulle pratiche agricole utilizzate nel corso degli anni. Dalle interviste con gli agricoltori è emerso un quadro delle principali tecniche agricole applicate negli oliveti oggetto di studio.

### 3.3 Risultati

#### 3.3.1 Analisi della sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo” negli appezzamenti

Dall’analisi iniziale si rileva che nell’oliveto AS (San Ligorio) la sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo” era circa del 4% (Figura 3.2), nel SS (Alezio) oltre l’80% (Figura 3.3) e l’oliveto MS (Torchiarolo) presentava un impatto intermedio rispetto agli altri due, di circa il 22% (Figura 3.4).

Tabella 3.2 Quantificazione del danno in termini di percentuale di rami colpiti da disseccamento rapido e bruciature fogliari su ogni albero-campione e percentuale media dell’appezzamento.

ALBERO	RAMI DISSECCATI	CL. GRAVITÀ	ALBERO	RAMI DISSECCATI	CL. GRAVITÀ	ALBERO	RAMI DISSECCATI	CL. GRAVITÀ
AS1	4%	2	MS1	58%	4	SS1	75%	4
AS2	0%	1	MS3	36%	3	SS2	84%	5
AS3	13%	2	MS2	11%	2	SS3	87%	5
AS4	1%	2	MS4	8%	2	SS4	76%	5
AS5	2%	2	MS5	0%	1	SS5	83%	5
Media AS	4%		Media MS	22%		Media SS	81%	



Fig. 3.2 Alberi campione dell’oliveto AS di San Ligorio (anno 2017)



Fig. 3.3 Alberi campione dell’oliveto SS di Alezio (anno 2017)



Fig. 3.4 Alberi campione dell'oliveto MS di Torchiarolo (anno 2017)



Fig. 3.5 Alberi campione dell'oliveto MS di Torchiarolo (anno 2018)

### 3.3.2 Il clima negli oliveti campione

I grafici presentati di seguito mostrano l'andamento in serie storica dei seguenti indicatori:

- Media mensile di pioggia giornaliera caduta (in mm) (Figura 3.6)
- Totale mensile di pioggia giornaliera caduta (in mm) (Figura 3.7)
- Numero di giorni nell'arco del mese in cui è caduto almeno 1 mm di pioggia (Figura 3.8)
- Tasso medio mensile di umidità (%) (soltanto per Lecce e Gallipoli) (Figura 3.9)
- Temperature media mensili (sia per le massime che per le minime giornaliere) in °C (Figura 3.10 e 3.11)
- Numero di giorni nell'arco del mese in cui le massime hanno superato i 35 °C (Figura 3.12)
- Numero di giorni nell'arco del mese in cui le minime sono scese al di sotto degli 0 °C (Figura 3.13)

Tutti i grafici mostrano righe di demarcazione (tratteggiate) che dividono l'arco temporale 2000-2017 in tre sotto-periodi: A. "pre-contagio" (luglio 2000 - dicembre 2008 circa); B. "contagio latente e conclamato" (gennaio 2009 – settembre 2014), C. "contromisure" (ottobre 2014 – dicembre 2017).

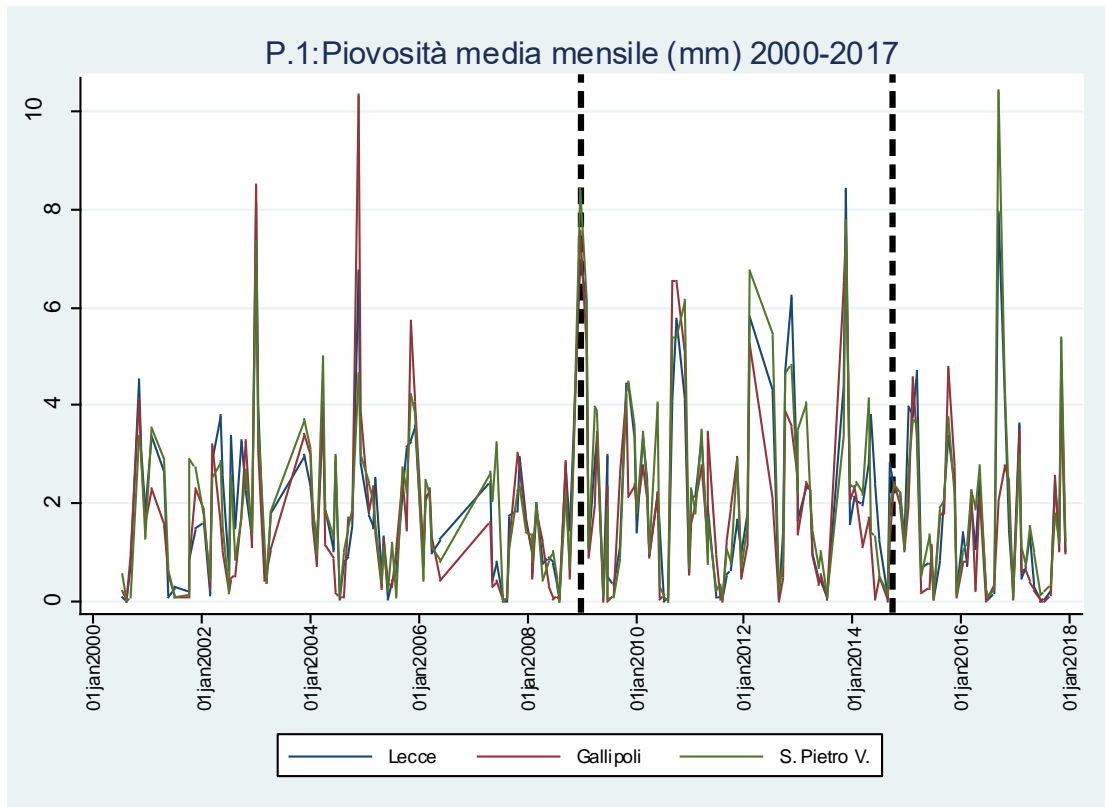


Figura 3.6 Media mensile di pioggia giornaliera caduta (in mm) per i tre areali dal 2000 al 2017.

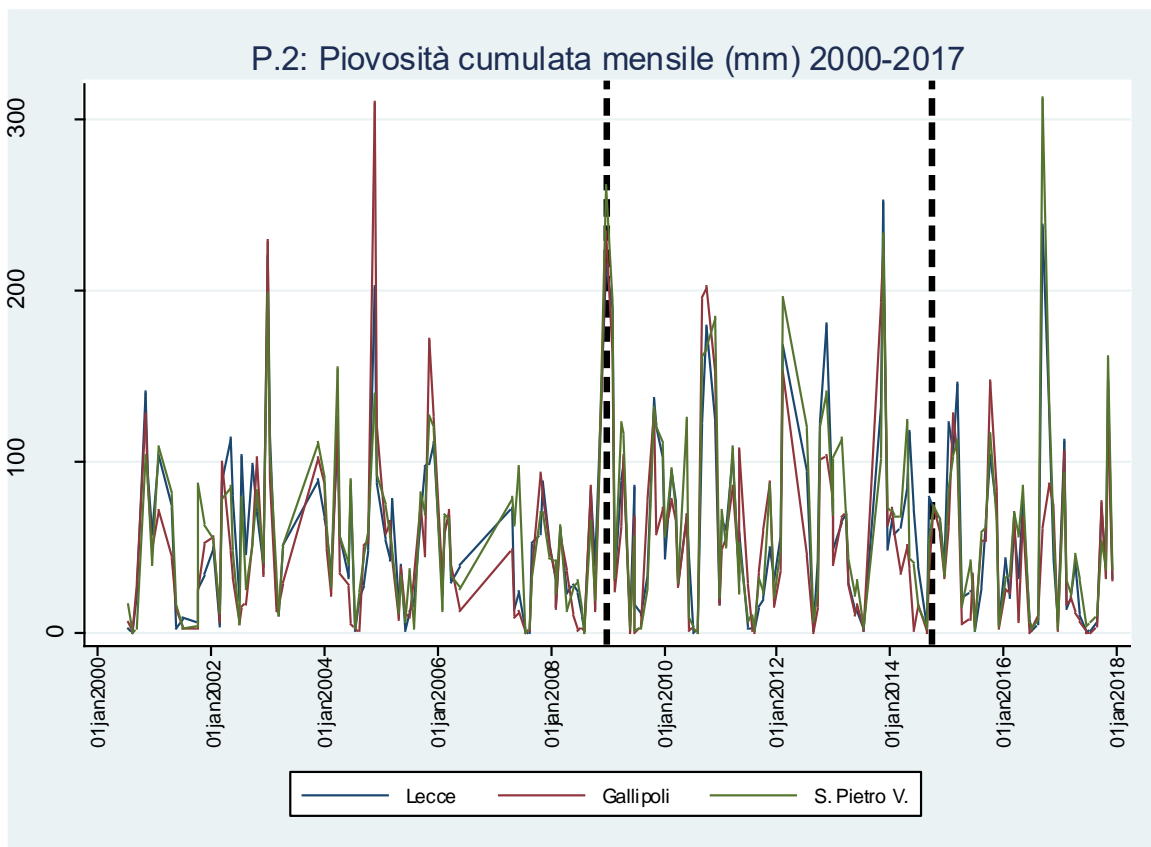


Figura 3.7 Totale mensile di pioggia giornaliera caduta (in mm) per i tre areali dal 2000 al 2017.

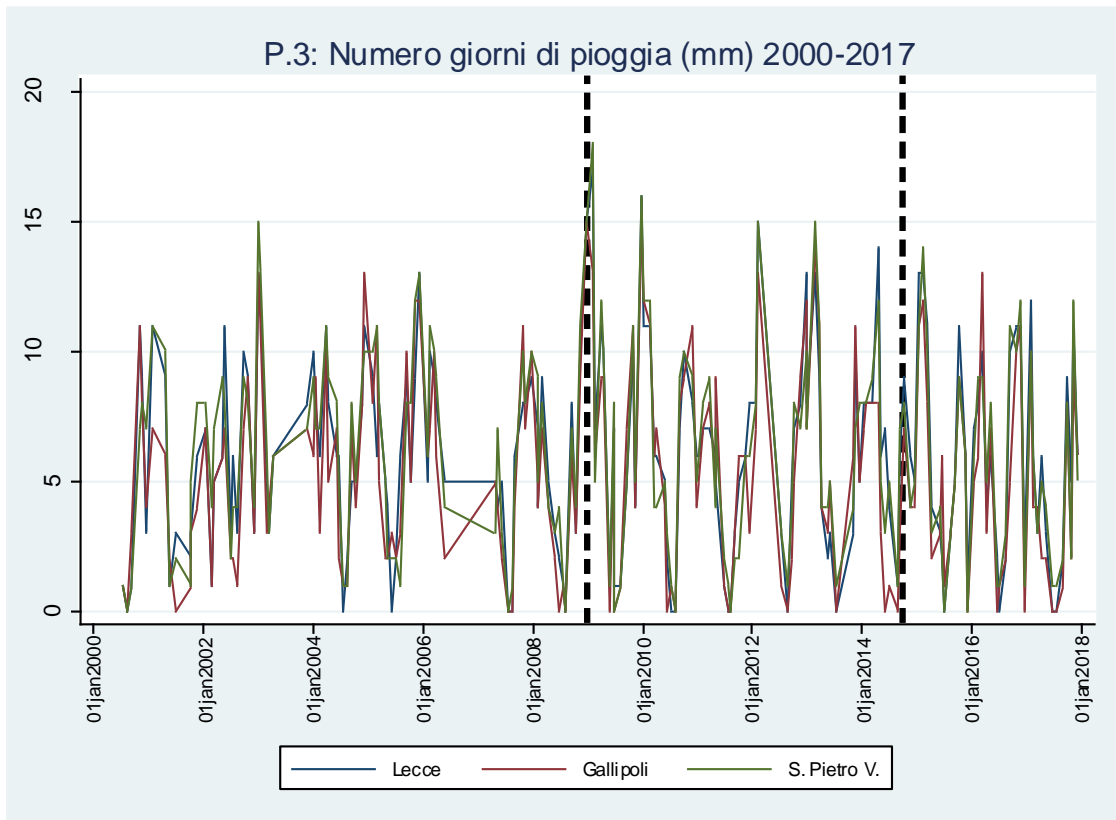


Figura 3.8 Numero di giorni nell'arco del mese in cui è caduto almeno 1 mm di pioggia per i tre areali dal 2000 al 2017.

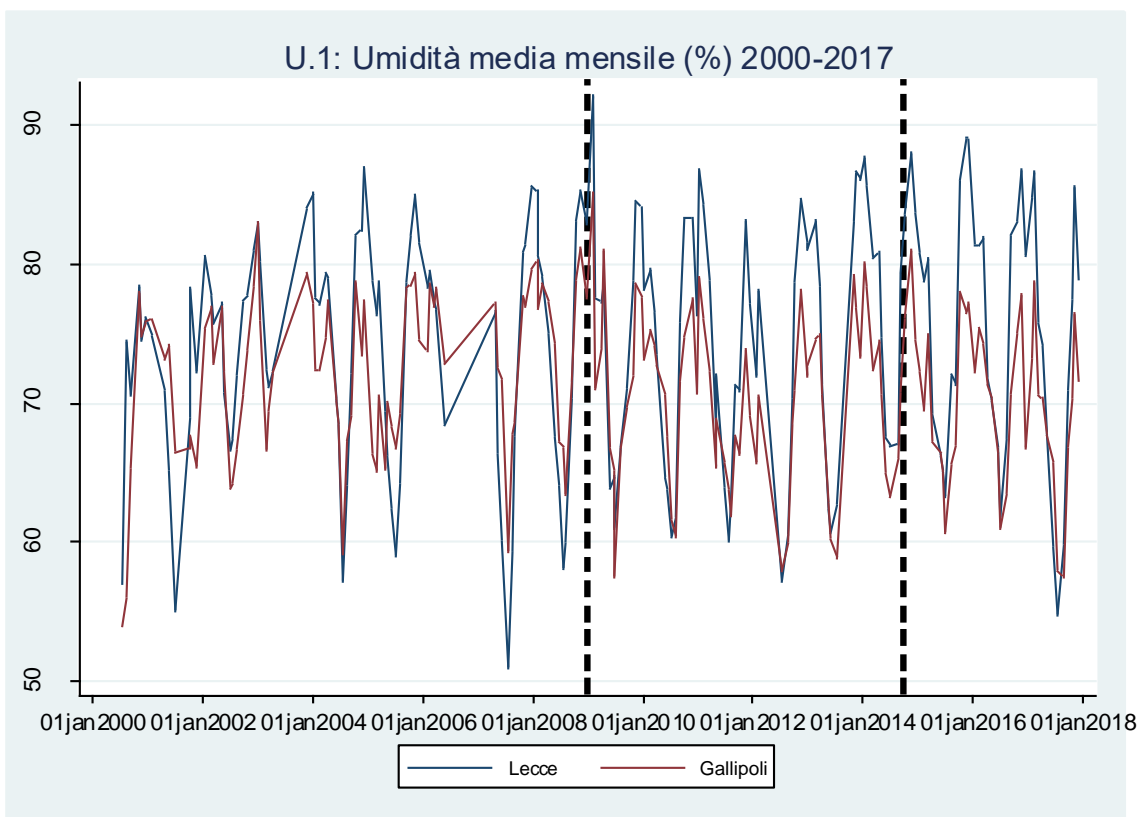


Figura 3.9 Tasso medio mensile di umidità (%) (soltanto per Lecce e Gallipoli) dal 2000 al 2017.

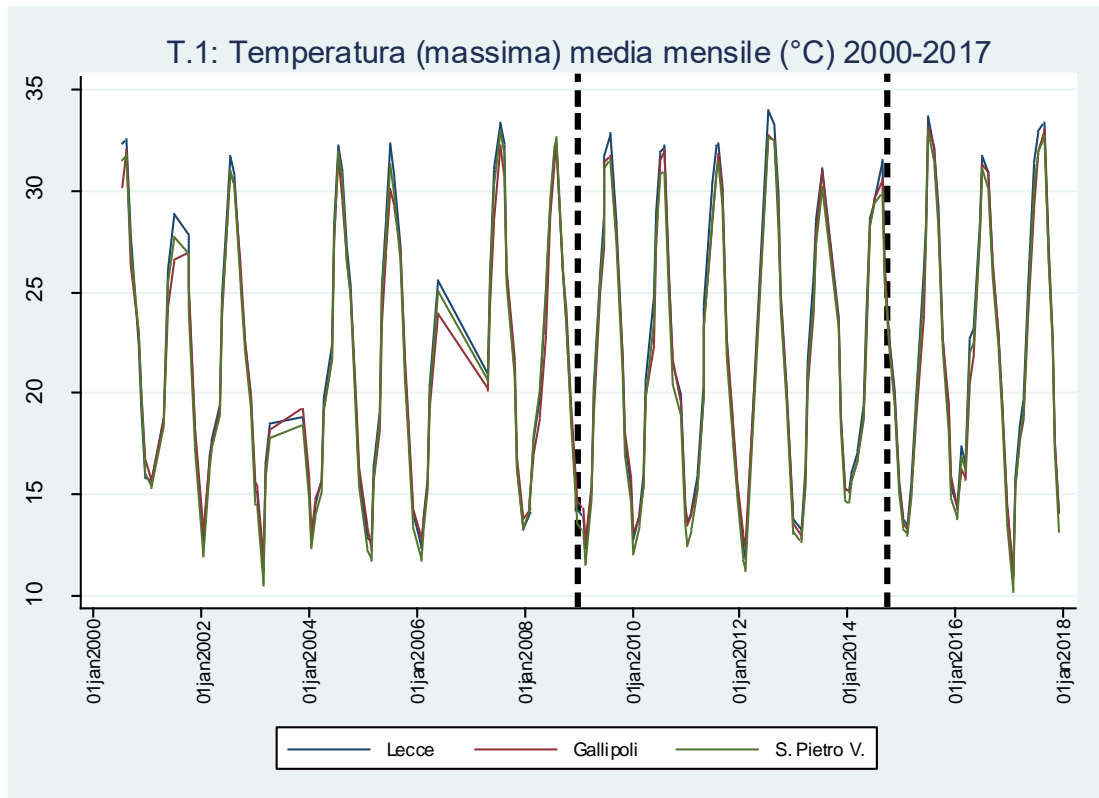


Figura 3.10 Temperatura (massima giornaliera) media mensile in °C per i tre areali dal 2000 al 2017.

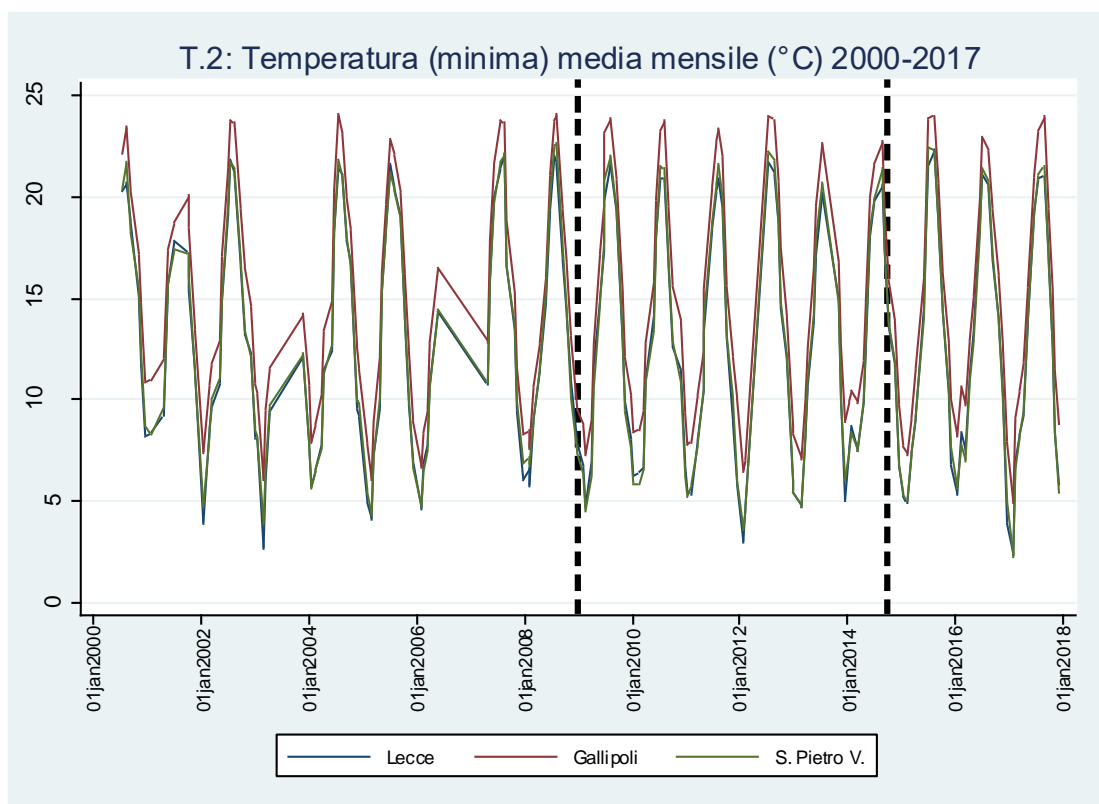


Figura 3.11 Temperatura (minima giornaliera) media mensile in °C per i tre areali dal 2000 al 2017.

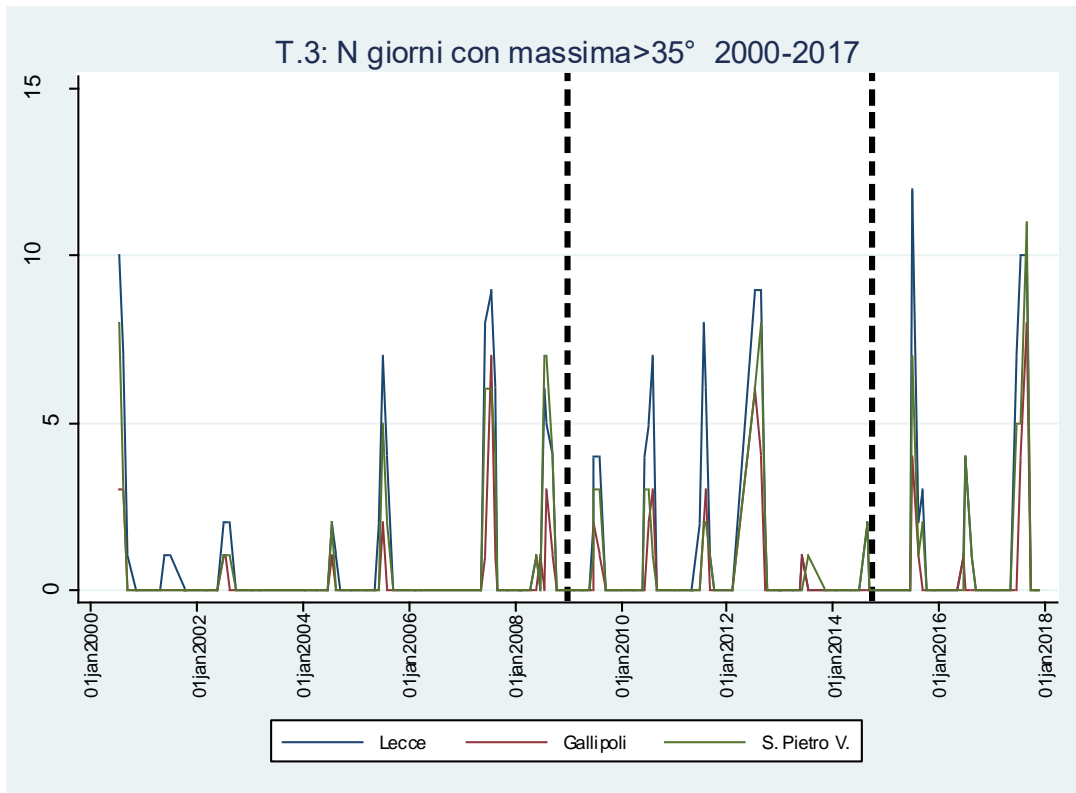


Figura 3.12 Numero di giorni nell'arco del mese in cui le massime hanno superato i 35 °C

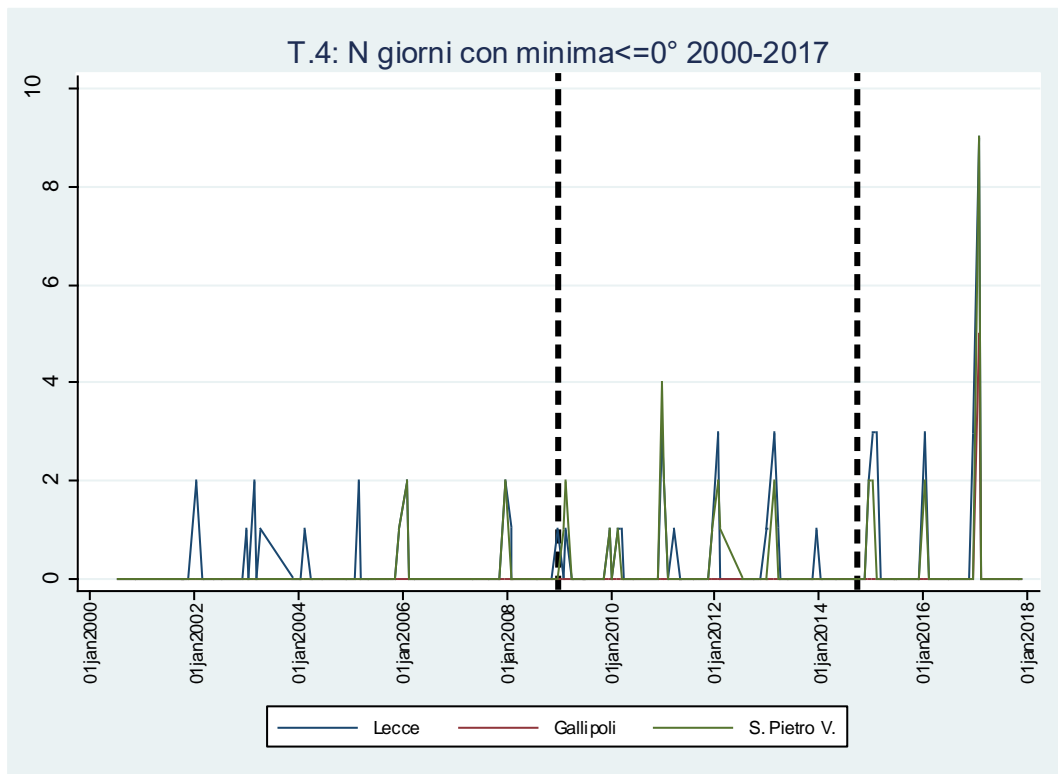


Figura 3.13 Numero di giorni nell'arco del mese in cui le minime sono scese al di sotto degli 0 °C

Le Figure 3.14 e 3.15 riportano rispettivamente l'andamento delle precipitazioni nel mese più caldo dell'anno (quello con la temperatura media mensile più elevata) e l'andamento della temperatura media nel trimestre più freddo per i tre areali dal 2000 al 2017.

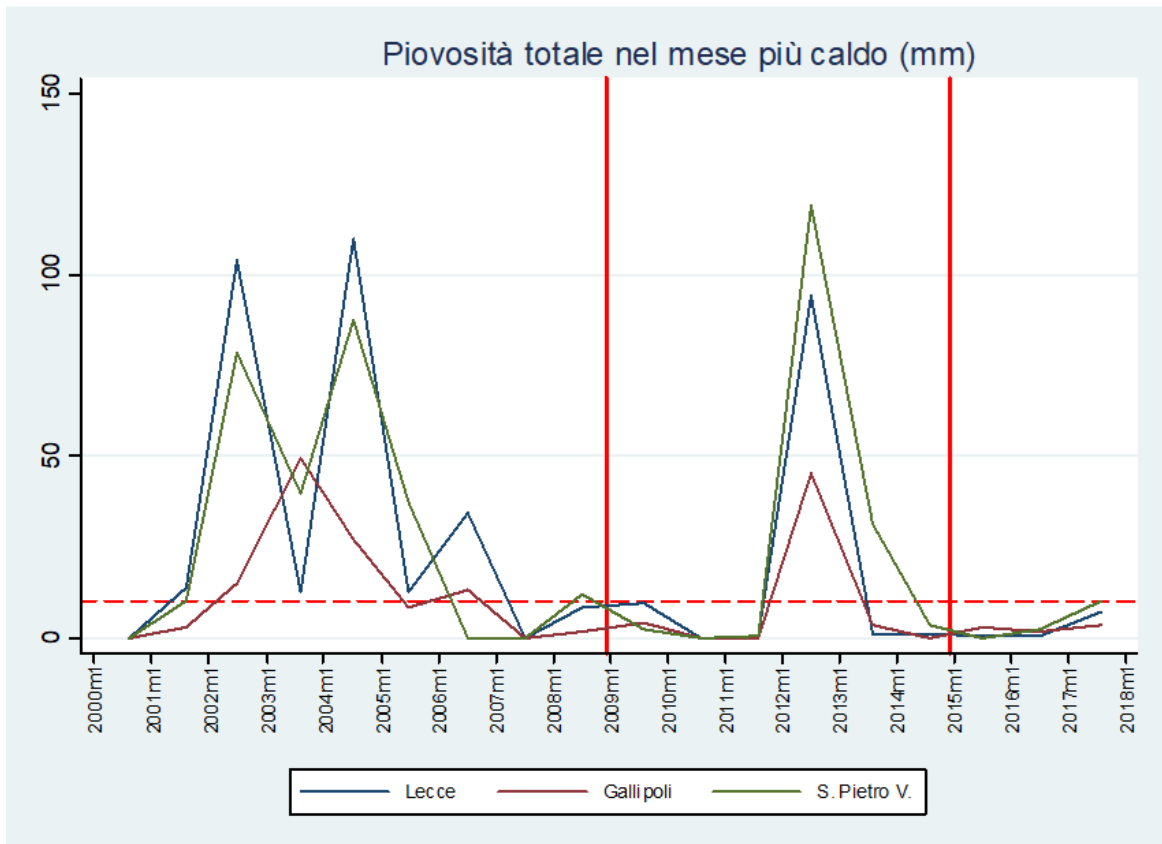


Figura 3.14 Andamento delle precipitazioni nel mese più caldo dell'anno (quello con la temperatura media mensile più elevata) per i tre areali dal 2000 al 2017.

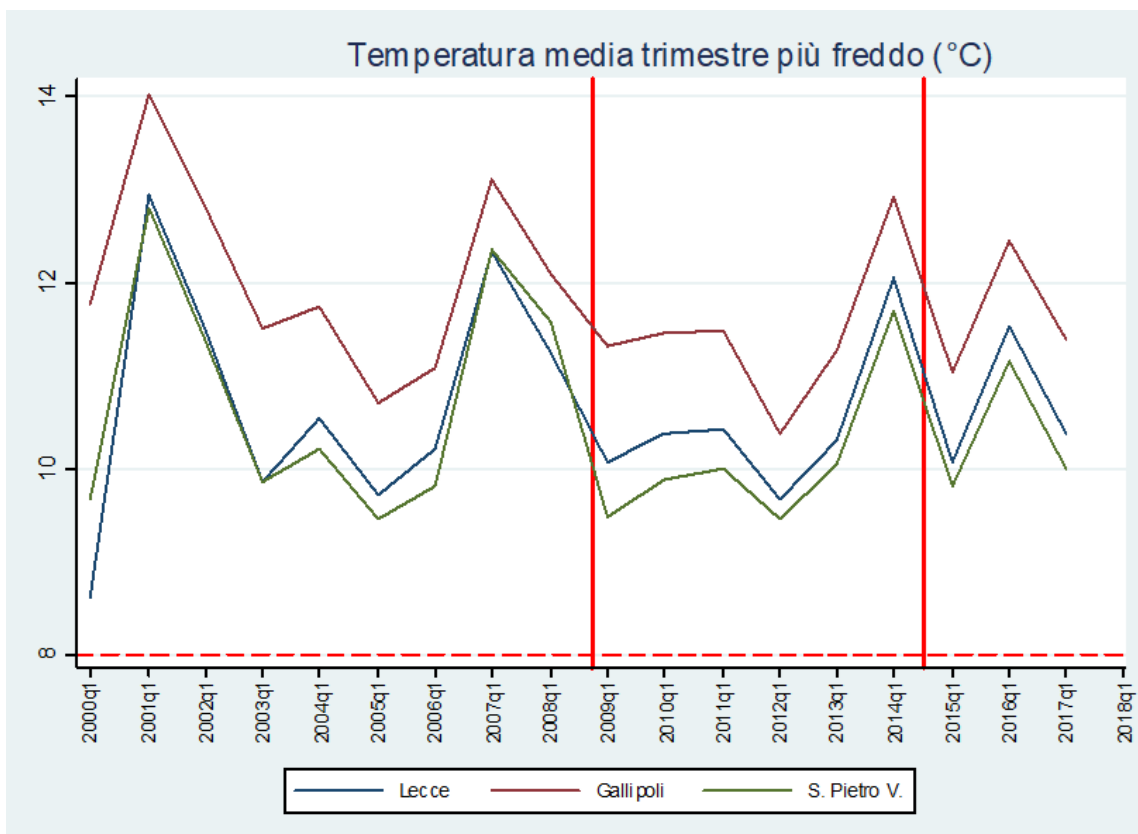


Figura 3.15 Andamento della temperatura media nel trimestre più freddo per i tre areali dal 2000 al 2017.

### 3.3.3 Gestione agronomica degli oliveti

#### Oliveto di Alezio (SS)

Nell'oliveto di Alezio (SS), fino al 2014 la fertilizzazione è stata incentrata su una concimazione annuale con concime organo-minerale NPK (15/5/5) con Ferro (Fe) e Zinco (Zn) in una quantità di 6 q/ha somministrata solo agli alberi più grandi (ca. 10 kg/albero). Fino al 2015 è stata praticata l'irrigazione a goccia con acqua proveniente da un pozzo aziendale. La gestione delle infestanti vedeva l'utilizzo dell'erbicida glyphosate per 2-3 interventi l'anno. La lavorazione del terreno, finalizzata principalmente alla preparazione per la raccolta, consisteva in 2-3 fresature l'anno con successive rullature.

La potatura veniva effettuata ogni due anni, alternata all'eliminazione dei succhioni, anch'essa biennale. Per il contenimento delle principali avversità biotiche, sono stati usati prodotti cuprici per il Cicloconio e la Rogna dell'olivo e dimetoato contro *Bactrocera oleae*.

La raccolta delle olive è sempre stata eseguita da terra su olive cascolate naturalmente con macchine spazzolatrici-raccattrici.

A partire dal 2014, in seguito al disseccamento della chioma di gran parte degli alberi presenti, le operazioni colturali si sono limitate a: potatura drastica (nel 2014 e nel 2016), cui è seguita una vera e propria capitozzatura nel 2018 (Figure 3.16); dopo il 2015 è stato effettuato annualmente lo sfalcio delle erbe spontanee con successiva lavorazione per interrare la vegetazione (per le misure obbligatorie legate al contenimento degli insetti vettori di *X. fastidiosa* subsp. *pauca*).

In effetti, questo cambiamento nelle tecniche di gestione si è verificato nella maggior parte delle aziende olivicole salentine colpite dalla sindrome da disseccamento rapido degli olivi: negli anni successivi al 2014, infatti, dopo aver attuato diversi tentativi empirici per rimediare al declino degli

alberi, hanno quasi tutte progressivamente abbandonato o ridotto drasticamente gran parte delle operazioni colturali, in mancanza di una produzione significativa e di indicazioni da parte delle autorità fitosanitarie per il controllo diretto della fitopatia e per il risanamento delle piante attaccate.

#### *Oliveto di Torchiarolo (MS)*

Nell'oliveto di Torchiarolo (MS), la potatura veniva normalmente effettuata ogni 4 anni, con asportazione dei succhioni a metà del quadriennio; dal 2015 la potatura è diventata annuale e più severa, a causa del progressivo disseccamento degli alberi (Figura 3.17); la spollonatura è stata effettuata ogni anno nei mesi di marzo e a fine agosto. L'ultima potatura è stata effettuata nel 2017. La concimazione annuale era di tipo minerale, basata su urea (ca. 5 kg/albero) ad anni alterni con concime nitrico nel periodo febbraio-marzo; a questa si affiancavano tre concimazioni fogliari con oligoelementi: Mg, B, Cu, Fe, Mn, Zn (MICRON 32).

Per quanto riguarda le lavorazioni, ogni 2 anni venivano eseguite tre fresature (marzo, giugno, settembre) e successive rullature, con trattamento erbicida a base di glyphosate (1,5 l/ha) + oxyfluorfen (150 g/ha) nel mese di settembre; nell'anno alterno, si procedeva con sfalci delle erbe spontanee in primavera e a fine estate. Non è mai stata eseguita l'irrigazione.

Contro le malattie ricorrenti (Occhio di pavone, Rogna) sono stati fatti trattamenti con ossicloruro tetraramico a marzo, maggio e giugno fino al 2018; contro la Lebbra delle olive fino al 2017 è stato utilizzato pyraclostrobin. Due trattamenti a base di dimetoato ad agosto e settembre venivano distribuiti contro la Mosca delle olive. Le olive sono state sempre raccolte da terra con macchine spazzolatrici-raccattrici.

#### *Oliveto di San Ligorio (AS)*

La potatura nell'oliveto di San Ligorio (AS) negli anni è stata più leggera rispetto agli altri due appezzamenti (Figura 3.19) e veniva eseguita con cadenza biennale; all'occorrenza venivano eseguiti interventi cesori estremamente contenuti mirati all'eliminazione di rami che presentavano primi segni di disseccamento.

Per la concimazione al terreno, viene occasionalmente distribuito un concime organico (nel 2017 un ammendante compostato misto), alternato con concimi minerali (nel 2019 un concime binario N/P 25/15).

L'oliveto non è irriguo. Per la gestione del suolo si attua un inerbimento con essenze spontanee nel periodo invernale e primaverile, con successiva trinciatura e un'erpatura leggera; da oltre 20 anni non vengono utilizzati erbicidi di sintesi. La raccolta viene eseguita dall'albero con scuotitore o pettini meccanici ed uso di reti.

Per le comuni avversità biotiche, fino al 2016 è stato effettuato un trattamento rameico annuale contro Rogna dell'olivo e Occhio di pavone; ad esso si aggiunge tuttora un trattamento, all'occorrenza, con dimetoato per la Mosca olearia.

In questo oliveto dal 2017 in collaborazione con Copagri di Lecce sono stati utilizzati a livello sperimentale biostimolanti e induttori di resistenza per favorire le difese naturali delle piante.

In particolare, nel 2017 sono stati effettuati due trattamenti con: a) biostimolante (KENDALL TE) composto da biomolecole estratte da materie prime vegetali con microelementi Cu, Mn, Zn; b) concime organo-minerale NK complessato con vitamine, aminoacidi e proteine, betaine e fattori di crescita (MEGAFOL) che, applicato nei momenti di stress (gelate, asfissia radicale, grandinate, siccità), grazie all'azione sinergica di betaine ed aminoacidi consente di superare gli arresti di crescita vegetativa: è anche un veicolante di prodotti ad applicazione fogliare.

Nel 2018 sono stati effettuati tre trattamenti con un attivatore dei meccanismi naturali di difesa a base di rame a basso dosaggio (ACTIVO RAME) complessato con aminoacidi caratterizzati da elevate proprietà chelanti, che determinano un'azione sistemica con azione dello ione rameico anche nei vasi conduttori floematici e xilematici; il complesso aminoacidico (glicina, prolina e alanina) stimola la

biosintesi della clorofilla, l'emissione di nuove foglie e interviene sui meccanismi di resistenza della pianta in situazioni avverse.

Nel 2019 sono stati eseguiti tre trattamenti con: a) KENDALL TE; b) MEGAFOL; c) un concime a base di Mg, B, Mn, Mo e Zn (VITASÈVE) che sulle piante arboree migliora la circolazione della linfa ed il processo di lignificazione e rende efficiente l'attività del cambio, la porzione di fusto responsabile della produzione di vasi linfatici e del legno.



Figura 3.16 Alberi capitozzati nell'oliveto di Alezio (SS) (2017/18)



Figura 3.17 Alberi potati in maniera drastica nell'oliveto di Torchiarolo (MS) 2017/18.



Figura 3.18 Oliveto di San Ligorio (AS): alberi in produzione. (2018)



Figura 3.19 Oliveto di San Ligorio (AS): a) Albero dopo la potatura (a sinistra); b) residui della potatura di produzione (a destra) (2018).



Figura 3.20 Oliveto di San Ligorio (AS): agosto 2019



Figura 3.21 Oliveto di Alezio (SS): agosto 2019

## 3.4 Discussione

### 3.4.1 Analisi della sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo” negli appezzamenti

La differenza nella manifestazione dei sintomi del disseccamento tra gli appezzamenti di San Ligorio (AS) e di Alezio (SS) era già evidente dalle fotografie scattate nella primavera-estate del 2017 (Figure 3.2 e 3.3); la situazione si è poi andata divaricando con il passare del tempo, poiché il mantenimento di corrette pratiche di gestione nell’appezzamento di San Ligorio ha garantito la continuazione dei processi vegetativi e produttivi degli olivi (Figure 3.20 e 3.21).

Nell’appezzamento MS di Torchiarolo la situazione è nettamente peggiorata in un anno, come si può vedere anche dalle immagini degli stessi alberi messi a confronto nel tempo (Figure 3.4 e 3.5). La riduzione drastica della produzione, e talvolta la sua perdita integrale, ha determinato nella maggior parte delle aziende colpite, una graduale diminuzione delle cure al terreno e alle piante, che a sua volta ha accelerato il processo di disseccamento.

### 3.4.2 Il clima negli oliveti campione

Da un punto di vista climatico tra i tre siti sono state rilevate lievi differenze: Lecce ha mediamente temperature più fresche rispetto agli altri siti ed è più umida soprattutto rispetto a Gallipoli; inoltre, Lecce tende ad avere temperature relativamente più estreme (Figure 3.12 e 3.13). Gallipoli ha temperature più miti rispetto a Lecce e S. Pietro V. (Figure 3.11, 3.12 e 3.13)

Si può notare dalla Figura 3.14 che l’areale di Lecce ha ricevuto più pioggia rispetto agli altri siti in quattro delle nove estati (2001, 2002, 2004, 2006) appartenenti al primo periodo (2000-2008) precedentemente definito di “pre-contagio”. Si può, inoltre, notare come, ad eccezione del 2012, a partire dal 2007 la quantità totale di pioggia caduta nei mesi più caldi raramente supera i 10 mm e questo succede più o meno indistintamente per tutti e tre i siti dell’esperimento.

La Figura 3.15 mostra che durante i 18 anni coperti dai dati analizzati, gli inverni più miti sono stati registrati nel 2001, 2007 e 2014 con temperature medie trimestrali (gennaio-marzo) superiori agli 11 gradi centigradi. Dei tre areali, Gallipoli è quello con temperature invernali più calde (di 1,5 gradi in media) rispetto a Lecce e S. Pietro, i cui valori sono invece molto simili.

I tre areali sono ubicati in zone con inverni miti e con mesi caldi piuttosto secchi, questi ultimi soprattutto a ridosso del periodo definito di “contagio latente e conclamato”. Rispetto a Gallipoli e S. Pietro Vernotico, l’areale di Lecce ha ricevuto più pioggia nei mesi più caldi tra il 2000 e il 2006.

Studiando la distribuzione del batterio *Xylella fastidiosa* in Italia, Bosso *et al.* (2016a) trovano che la probabilità del batterio di colonizzare una certa area geografica è superiore all’80% quando si verificano alcune condizioni bioclimatiche tra cui: a) le precipitazioni durante il mese più caldo non eccedono i 10 mm, b) la temperatura media nel trimestre più freddo è superiore agli 8 gradi centigradi. Secondo i parametri messi in evidenza da Bosso *et al.* (2016) tutta la penisola salentina è quindi zona di diffusione del batterio.

In conclusione, tra i tre siti non sono state registrate differenze sostanziali: non vi sono elementi, pertanto, che possano suggerire un’influenza dei principali parametri climatici sulla diversa evoluzione della malattia negli appezzamenti indagati. Sarebbe tuttavia interessante confrontare i dati di quest’area climatica abbastanza omogenea con quelli di altre zone limitrofe ove il disseccamento rapido dell’olivo ha progredito con minor velocità, nonostante la vicinanza geografica.

È infatti acclarato che il clima influenza l’incidenza e la distribuzione temporale e spaziale delle malattie delle piante, condizionando tutte le fasi della vita del patogeno e dell’ospite; il cambiamento ambientale, soprattutto se combinato con l’introduzione di agenti patogeni e ospiti, può portare a effetti senza precedenti (Ahanger *et al.*, 2013).

Anche lo sviluppo e la diffusione di *X. fastidiosa* sono stati messi in connessione con le variabili bioclimatiche (Godefroid *et al.*, 2018; Bosso *et al.* 2016a). Inoltre, nel caso specifico dello sviluppo di sintomi da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (ST. 53) su alberi di olivo della varietà Cellina di Nardò, un importante studio ha dimostrato che le condizioni climatico-ambientali hanno un'influenza determinante sulla concentrazione del patogeno nei tessuti vegetali, nel suo movimento a livello sistemico e nel disseccamento della chioma (Saponari *et al.*, 2017).

### 3.4.3 Gestione agronomica degli oliveti

La gestione agronomica degli oliveti nel Salento, che sono gestiti per oltre l'80% da piccoli contadini, con una superficie media delle aziende al disotto dei 2 ha, si è modificata profondamente negli ultimi decenni; per comprenderne le motivazioni, è necessario ricostruire storicamente alcuni eventi di natura economica e sociale.

Le politiche della PAC con il disaccoppiamento e la riduzione dell'integrazione alla produzione, la continua diminuzione del prezzo dell'olio per la competizione con il mercato globale ed il contestuale incremento del costo della manodopera, sono le condizioni economiche che hanno orientato le scelte degli agricoltori verso un progressivo abbandono delle buone pratiche, che venivano applicate in passato con l'ausilio della manodopera familiare ed erano garantite da una redditività della coltura che si è gradualmente ma inesorabilmente assottigliata.

A questo si è aggiunta una profonda modificazione del tessuto sociale del Salento che, come gran parte del meridione d'Italia, ha visto ridursi la popolazione impegnata in agricoltura, con innalzamento dell'età media degli agricoltori.

Tutto ciò ha modificato le pratiche agricole di gestione degli oliveti, soprattutto in relazione alle tecniche e modalità di potatura, che ormai vengono eseguite a distanza di diversi anni, con tagli sempre più severi e che quasi mai vengono disinfettati e protetti, effettuati anche sulle branche di secondo ordine e spesso nel periodo caldo, con rischi di disidratazione e/o di accesso di patogeni fungini.

La gestione del suolo ha visto l'abbandono delle consociazioni piante erbacee/arboree, spesso praticate con l'inerbimento e il sovescio di leguminose o brassicacee, per lasciare il posto a lavorazioni ripetute, anche per preparare il terreno per la raccolta delle olive. Infatti, per ridurre i costi della manodopera con operazioni compatibili con le dimensioni economiche delle aziende, la raccolta – effettuata dopo la caduta delle drupe al suolo – viene realizzata con macchine che spazzolano il terreno ed hanno quindi bisogno che questo sia adeguatamente preparato con fresature, rullature e con l'intervento di diversi trattamenti chimici con diserbanti ogni anno.

Dal punto di vista fitoiatrico, sono state abbandonate quelle pratiche manuali che avevano l'obiettivo di curare le carie del legno e di prevenire il ristagno delle acque piovane sul tronco, attraverso interventi di dendrochirurgia e salvaguardia dell'equilibrio morfo-fisiologico dell'albero.

Questa nuova realtà, unita ai cambiamenti climatici in atto, ha prodotto fenomeni di squilibrio fisiologico delle piante e un aumento delle malattie parassitarie (soprattutto di natura fungina) che hanno indebolito le piante stesse; un peggioramento è avvenuto anche a carico dello stato di salute dei suoli, con diminuzione del tasso di sostanza organica, compattamento e peggioramento delle condizioni strutturali; ciò ha diminuito la capacità del suolo di immagazzinamento dell'acqua meteorica e ha comportato la riduzione della biodiversità vegetale, animale e microbica nell'ambiente edafico degli oliveti.

Le tecniche agronomiche normalmente applicate nella zona riguardano pertanto il mantenimento di una forma regolare della chioma attraverso potature eseguite in tempi irregolari, in genere ogni quattro-cinque anni, e l'irrorazione di prodotti chimici per il controllo dei principali parassiti e patogeni (*Bactrocera oleae*, *Spilotea oleaginea*, *Colletothricum gloeosporioides*). In generale, l'applicazione di fertilizzanti al suolo è piuttosto rara, mentre l'uso di erbicidi per controllare le erbe infestanti e preparare il terreno per la raccolta è diventata pratica ordinaria con più interventi l'anno.



**4 Proprietà chimico-biochimiche e composizione del microbioma batterico della rizosfera in aree olivicole affette da “disseccamento rapido dell’olivo”**

## 4.1 Importanza del microbioma rizosferico e dei parametri chimico-biochimici

Il declino degli alberi di olivo nel Salento è un fenomeno che si inserisce in un processo di dimensioni più vaste, che riguarda numerose colture arboree. Negli ultimi decenni, infatti, il declino delle piante coltivate ha interessato sempre più specie. Esso può essere definito come una degenerazione a lungo termine dei tessuti vegetali a seguito di una successione di molteplici eventi negativi (ad es. stress abiotici, cambiamenti climatici, comparsa di nuovi patogeni o fitofagi alieni, strategie agricole) (Anderson *et al.*, 2004).

Le interazioni tra piante e agenti patogeni vengono di solito semplificate come una “guerra di trincea” tra due parti, un rapporto binario, ignorando l'importanza di parti aggiuntive che possono influenzare in modo significativo il processo di infezione.

Le comunità microbiche associate alle piante sono complesse e dinamiche, le interazioni ospite-microbo e microbo-microbo a breve e lungo termine mediano sia le proprietà dell'ospite che quelle microbiche e sono essenziali per la salute dell'ospite (Mercado-Blanco *et al.*, 2018; Berendsen *et al.*, 2012; Berg *et al.*, 2016). Alcuni elementi microbici sono dannosi e causano malattie, altri promuovono la crescita delle piante e migliorano l'acquisizione di nutrienti e la tolleranza agli stress biotici e abiotici attraverso una moltitudine di meccanismi.

I microrganismi associati alle radici rappresentano la chiave fondamentale per l'evoluzione delle piante terrestri (Fitzpatrick *et al.*, 2018). Il rizomicrobioma delle piante arboree gioca un ruolo significativo in diverse funzioni fondamentali: la nutrizione delle piante, ad esempio la fissazione dell'azoto o la solubilizzazione del fosfato; il controllo biologico, competendo direttamente con i patogeni o inducendo la resistenza nelle piante; la crescita delle piante e la riduzione degli stress mediante la produzione o la degradazione di fitormoni (Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Berendsen *et al.*, 2012; Gaiero *et al.*, 2013).

Il ruolo del microbiota nel favorire uno stato di salute delle piante ospiti è da riferirsi al concetto di *facilitazione* dell'ecologia vegetale, essendo il microbiota considerato un elemento “facilitatore” che fornisce funzioni aggiuntive all'olobionte e si adatta a quelle condizioni ambientali ottimali per la sopravvivenza e per mantenere o rafforzare l'omeostasi della pianta (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2017). La comunità microbica del suolo può influenzare la sopravvivenza, la crescita e la tolleranza delle piante a stress biotici e abiotici e indurre resistenza sistemica contro parassiti e patogeni sia nelle foglie che nelle radici (Berendsen *et al.*, 2012; Syed Ab Rahman *et al.*, 2018; Pineda *et al.*, 2017).

La composizione e la struttura del microbiota associato ad una determinata coltura arborea subiscono alterazioni nel tempo e nello spazio dovute a fattori quali cambiamenti ambientali (improvvisi o a lungo termine), proprietà fisico-chimiche del suolo, materia organica ed essudati del suolo (Fierer, 2017), azioni antropiche, pratiche agronomiche (Hardoim *et al.*, 2015), fattori climatici, stadio di sviluppo della pianta, stress biotici ed a biotici.

È stato osservato che le comunità microbiche associate alle radici di diverse specie vegetali coltivate sullo stesso suolo differiscono frequentemente (Garbeva *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2006). D'altra parte, le stesse specie vegetali coltivate in terreni diversi possono originare comunità microbiche simili (Miethling *et al.*, 2000). Differenze nelle comunità microbiche della rizosfera sono state inoltre osservate in diversi genotipi della stessa specie vegetale (Glick, 2015; Micallef *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013).

La struttura della comunità batterica associata alla pianta è influenzata da fattori legati all'ospite, come l'età, lo stadio di sviluppo e il suo stato di salute, che a loro volta influenzano la segnalazione della pianta stessa (resistenza sistemica indotta) e la composizione degli essudati radicali (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Aleklett *et al.*, 2015).

Alcuni studi indicano che le piante rispondono all'attacco dei patogeni reclutando specifici microrganismi benefici del suolo e che questi conferiscono immunità contro una vasta gamma di malattie fogliari, attivando le difese delle piante, riducendo così la suscettibilità di una pianta all'attacco dei patogeni. (Berg & Smalla, 2009; Ladygina & Hedlund, 2010; Haichar *et al.*, 2008; Bulgarelli *et al.*, 2015)

Le proprietà del suolo sono modificate da una serie di processi che si verificano durante la crescita degli alberi, che a loro volta influenzano le comunità microbiche della rizosfera.

Fattori come i metodi di coltivazione, in particolare quella biologica rispetto a quella convenzionale, contribuiscono in modo diverso sui vari microbiomi (Edwards *et al.*, 2015).

È stato dimostrato che la diversità degli organismi (piante, animali e microbi) è influenzata positivamente nei sistemi a gestione biologica o a bassa coltivazione, rispetto ai sistemi a gestione integrata (Compant *et al.*, 2019). La diversità del suolo è stata studiata, in particolare nei vigneti, dove è stato trovato un legame tra i suoli gestiti con sovescio e la più alta diversità del microbiota del suolo, rispetto ad altre pratiche di gestione agricola (Longa *et al.*, 2017).

Montes-Borrego *et al.* (2013), in un'analisi comparativa dei sistemi di olivicoltura biologica e convenzionale nel sud della Spagna, hanno rilevato come le pratiche di gestione hanno influenzato le proprietà chimiche e biologiche del suolo, indicando che gli oliveti condotti con gestione biologica hanno mostrato una maggiore diversità microbica rispetto ai frutteti gestiti convenzionalmente.

Anche altri studi hanno dimostrato che le pratiche agricole influenzano la composizione delle comunità batteriche del suolo (Cheng *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2014) e l'applicazione di tecniche di gestione sostenibile può migliorare la qualità degli ecosistemi del suolo (Mäder *et al.*, 2002; Cavigelli *et al.*, 2013) e può tutelare la presenza e l'attività di importanti *taxa* batterici con funzioni fisiologiche e protettive per le piante (Fausto *et al.*, 2018).

Come si è visto, il microbioma della rizosfera può avere un effetto diretto nel controllare malattie delle piante coltivate e a sua volta può essere condizionato da attacchi di patogeni o fitofagi.

Nella battaglia per le risorse, i microbi benefici limitano il successo del patogeno attraverso la produzione di composti biostatici, il consumo di (micro) nutrienti o stimolando il sistema immunitario della pianta (Berendsen *et al.*, 2012).

Recentemente sono state condotte ricerche che hanno indagato il microbioma di alberi di olivo affetti dal disseccamento rapido.

Vergine *et al.* (2020) hanno confrontato il microbiota di alberi delle cultivar “Leccino” e “Cellina di Nardò” con l'obiettivo di valutare le differenze di composizione, diversità e struttura; sono stati indagati alberi di età simile delle due cultivar, con stato di malattia comparabile, ricadenti in zone con caratteristiche pedo-climatiche omogenee e allevati con le stesse pratiche agronomiche, ipotizzando che *taxa* microbici differenziali associati alla cv “Leccino” potessero contribuire alla sua resistenza/tolleranza a *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. I dati raccolti prefigurano potenziali applicazioni biotecnologiche.

Lo scopo dello studio di Zicca *et al.* (2020) era, invece, l'identificazione di batteri antagonisti potenzialmente impiegabili come agenti di controllo biologico contro *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ma nessuno ha mostrato attività antagonista. L'ipotesi avanzata a proposito del ruolo degli endofiti dell'olivo nel limitare la comparsa dei sintomi, è che vi possa essere un effetto dovuto a una complessa comunità di batteri endofitici

Giampetruzzi *et al.* (2020) hanno studiato la dinamica delle infezioni da *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* nel contesto del microbioma endofitico confrontando, anche in questo caso, una cultivar di olivo sensibile (“Kalamata”) e una “resistente” (“FS17”): il fattore cultivar ha avuto un effetto

trascurabile sulla composizione della comunità e non sono state trovate associazioni chiare di un singolo taxon o di consorzi microbici con la cultivar resistente.

Tutti gli studi fin qui pubblicati sul microbioma di olivi nel Salento, in zona colpita dal disseccamento rapido, hanno indagato gli endofiti presenti nelle piante di olivo. Sono stati confrontati i microbiomi di coppie di cultivar (resistente *vs.* sensibile) al fine di verificare l'esistenza di taxa differenziali; spesso sono state isolate popolazioni batteriche da alberi infetti o non infetti. L'obiettivo comune a tutti i lavori era comunque di individuare singoli ceppi batterici o loro consorzi, in grado di essere utilizzati come potenziali agenti di biocontrollo nei confronti di *X. fastidiosa* ssp. *pauca* ST53.

Questi studi, avendo come oggetto principale il microbioma del Leccino o di FS 17, cultivar presenti sporadicamente nel Salento, non possono fornire indicazioni d'intervento sul patrimonio varietale attualmente esistente, rappresentato principalmente dalle due cultivar tradizionali "Cellina di Nardò" e "Ogliarola Salentina" che da sole ricoprono oltre il 90% della SAU ad oliveto della provincia di Lecce.

In molti casi, si osservano alberi della stessa varietà, coltivati nella stessa zona infetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, che manifestano risposte fenotipiche diverse con livelli differenti di sintomatologia da "disseccamento rapido dell'olivo".

Per tentare di capire i motivi della risposta differente alla malattia da parte di alberi della stessa cultivar, si è ritenuto di confrontare la struttura del microbioma rizosferico di oliveti di età simile e con caratteristiche pedoclimatiche omogenee impiantati con la medesima varietà, la Cellina di Nardò. Per quanto di nostra conoscenza, non sono ancora stati pubblicati al momento studi sul microbioma rizosferico dell'olivo nel Salento in zona affetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Il presente studio, pertanto, potrebbe aprire un ambito di ricerca ancora poco esplorato in questo ambiente.

Nella situazione specifica del Salento si è valutato di indagare la struttura del microbioma della rizosfera per evidenziare eventuali disbiosi negli oliveti presenti sul territorio.

Per questi motivi, si è ritenuto fondamentale documentare in dettaglio tutti i batteri presenti nei campi agricoli nelle specifiche condizioni di crescita: le informazioni sulla struttura e le funzioni dei rizomicrobiomi in piante affette da "disseccamento rapido dell'olivo" ma con manifestazioni sintomatiche differenziate sono un ambito di ricerca molto promettente, che potrebbe permettere in futuro di approfondire le interazioni all'interno del microbioma o tra la pianta e i microbi.

Dal momento che le comunità microbiche del suolo sono condizionate, oltre che dal genotipo vegetale e dalle condizioni ambientali, anche dalle tecniche agronomiche adottate, una maggiore comprensione dei legami tra il microbiota del suolo e gli alberi è certamente utile per lo sviluppo di strategie di gestione delle colture arboree più efficaci e sostenibili (Mercado-Blanco *et al.*, 2018).

Per integrare le informazioni relative alla composizione delle comunità batteriche della rizosfera, al fine di avere una valutazione più dettagliata sulla salute del suolo in un'ottica di monitoraggio ambientale (Schloter *et al.*, 2003), sono stati indagati alcuni parametri chimico-biochimici strettamente correlati alla componente microbiologica del suolo.

I concetti di *qualità* e di *salute* del suolo potrebbero sembrare sinonimi ed intercambiabili, ma mentre la "qualità" è correlata alle *funzioni* del suolo, la "salute" presenta il suolo come una *risorsa vivente* finita e dinamica (Doran & Zeiss, 2000).

La salute del suolo è definita come "la capacità continua del suolo di funzionare come un sistema vivente vitale, nell'ambito dell'ecosistema o dell'uso del suolo, per sostenere la produttività biologica, mantenere la qualità ambientale dell'aria e dell'acqua e promuovere la salute di piante, animali ed esseri umani" (Doran *et al.*, 1996). La definizione di salute del suolo menziona, quindi, direttamente la salute delle piante ed è in funzione di questo obiettivo specifico che abbiamo inteso utilizzare i

parametri indagati per una valutazione comparativa tra i suoli messi a confronto. Un suolo sano è un terreno in cui i focolai di malattie sono limitati (Janvier *et al.*, 2007).

La ricerca di eventuali relazioni tra la salute del suolo (intesa come capacità di soppressione delle malattie) e le caratteristiche del suolo stesso in situazioni naturali (piuttosto che in situazioni contrastanti create artificialmente in plot sperimentali o in micro / mesocosmi), è considerato da Janvier *et al.* (2007) l'approccio più appropriato nella ricerca di indicatori affidabili.

Le attività dei microrganismi del suolo forniscono utili informazioni sulle mutevoli condizioni del sistema (Hargreaves *et al.*, 2003); sono considerati driver sensibili e quindi indicatori della salute del suolo (Yakovchenko *et al.*, 1996; Bloem *et al.*, 2006). Le misurazioni delle attività microbiche sono incluse nei programmi di monitoraggio internazionali sulla qualità del suolo (Powlson, 1994; Dilly, 2006). Tuttavia, il loro uso come potenziali indicatori sensibili dei cambiamenti della qualità del suolo, soprattutto su scala spaziale, è ancora poco sviluppato (Wick *et al.*, 1998; Mummey *et al.*, 2002; Bonmati *et al.*, 1991).

Diversi studi mettono in relazione alcuni parametri chimico-biochimici con una minor incidenza di alcune malattie delle piante

L'aumento della biomassa microbica è stato associato a una diminuzione dell'incidenza della malattia del marciume radicale del *Pythium* su iris (Van Os & Van Ginkel, 2001), *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) e *R. solani* sul grano (Pankhurst *et al.*, 2002) e *F. oxysporum* sugli asparagi (Hamel *et al.*, 2005), sebbene non siano state effettuate correlazioni statistiche (Leon *et al.*, 2006) hanno trovato una significativa correlazione negativa tra biomassa microbica e gravità della malattia di *Aphanomyces. euteiches* su fagiolo. È generalmente ammesso che la soppressione della malattia sia correlata a un aumento globale della biomassa microbica del suolo: una grande biomassa creerebbe un ambiente competitivo dannoso per gli agenti patogeni. La valorizzazione della biomassa microbica è anche uno degli obiettivi di alcune pratiche culturali, principalmente l'utilizzo di ammendanti organici (Janvier *et al.*, 2007).

In molti studi, tassi di respirazione del suolo più elevati sono stati associati a una minore incidenza o gravità di diverse malattie (Van Os & Van Ginkel, 2001; Pankhurst *et al.*, 2002; Kotsou *et al.*, 2004). Un contenuto più elevato di C organico è stato associato a una minore incidenza di diverse malattie su diverse colture (Pankhurst *et al.*, 2002; Workneh *et al.*, 1993)

I parametri indagati nel presente studio sono stati: la biomassa microbica, la respirazione basale e cumulativa del suolo, il carbonio organico totale (TOC), l'azoto totale e il rapporto C/N.

Inoltre, per conoscere le caratteristiche chimiche di base del suolo degli oliveti campione, sono stati effettuati prelievi per l'analisi di caratterizzazione, cioè l'insieme di determinazioni che contribuiscono a definire le proprietà fisico-chimiche di un suolo; sono stati indagati in particolare i parametri: tessitura, pH, CSC, sostanza organica, conducibilità e dotazione in elementi nutritivi.

## 4.2 Materiali e metodi

### 4.2.1 Prelievo dei campioni

Sono stati analizzati campioni di suolo prelevati dai due appezzamenti di S. Ligorio (AS) ed Alezio (SS), al fine di mettere a confronto le due situazioni maggiormente diversificate per quanto riguarda la presenza di sintomi riconducibili al “disseccamento rapido dell’olivo” sugli alberi di olivo.

Per il prelievo del suolo per le analisi microbiologiche, in ogni appezzamento sono stati individuati 3 alberi campione, come repliche biologiche indipendenti ( $n = 3$ ), rappresentativi delle condizioni di ciascun campo.

La tecnica utilizzata per il campionamento rispetta quanto descritto da (Sequi *et al.*, 2002), di cui al Decreto MiPAAF 8 luglio 2002, "Approvazione ed ufficializzazione dei Metodi di analisi microbiologica del suolo".

In corrispondenza di ogni albero selezionato, sono stati effettuati quattro prelievi di suolo rizosferico, ciascuno dei quali costituiva un sub campione; i prelievi sono stati effettuati sotto la proiezione della chioma (a circa 1 m dal fusto), eliminando il cotico erboso superficiale e prelevando ad una profondità 0-25 cm, verificando la presenza del capillizio radicale. La profondità di prelievo è stata limitata dalla presenza del substrato roccioso abbastanza superficiale presente in un appezzamento.

I campioni sono stati riposti in sacchetti di plastica, etichettati e chiusi con laccio. Il punto in cui è stato prelevato ciascun sub campione è stato localizzato tramite fotografie e punti di riferimento.

Ogni campione è stato poi suddiviso in aliquote per le diverse analisi da effettuare: analisi del microbioma e parametri dell’attività chimico-biochimica.

I prelievi dei campioni di suolo per le analisi di caratterizzazione delle proprietà fisico-chimiche di base del suolo degli oliveti campione sono stati effettuati sulla base dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo", di cui al Decreto Ministeriale del 13/09/1999: se ne riportano in sintesi le principali fasi.

Con idonei strumenti è stato effettuato un campionamento non sistematico “a W” prelevando numerosi campioni elementari (subcampioni), evitando i bordi del campo, alla profondità di 35-40 cm (ove possibile, tranne ove erano presenti rocce superficiali), dopo aver eliminato i primi centimetri di cotico erboso. I diversi campioni elementari sono stati riuniti, mescolati, accuratamente omogeneizzati e poi trasferiti in un contenitore asciutto e pulito, che è stato chiuso ed etichettato per la chiara identificazione del campione.

### 4.2.2 Composizione delle comunità batteriche nel suolo

La metagenomica è un approccio basato sull'utilizzo di tecniche genomiche moderne per lo studio di comunità microbiche direttamente nel loro ambiente naturale, evitando così il problema del prelevamento e coltivazione in laboratorio. Si basa sul sequenziamento del genoma di microrganismi, che per la maggior parte sono di difficile coltivazione a causa delle loro particolari esigenze.

Rientrano negli studi di tipo metagenomico anche gli approcci NGS basati sul sequenziamento di regioni variabili di RNA ribosomiale 16S (rRNA 16S), per studi tassonomici volti ad identificare i generi di batteri presenti in una comunità microbica e la loro abbondanza relativa.

I campioni per l'analisi *metabarcoding* sono stati raggruppati nelle seguenti due categorie includendo tre repliche biologiche: AS (oliveto San Ligorio) e SS (oliveto Alezio).

L'estrazione del DNA è stata eseguita con kit DNeasy®POWERSOIL®Prokit (50) (Qiagen) e la sua quantificazione è stata eseguita con lo spettrofotometro Qubit® dopo opportuna taratura.

Per l'analisi NGS i campioni opportunamente quantificati con saggi fluorimetrici attraverso il Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific), sono stati immessi nella miscela in proporzione alle relative concentrazioni (ng/μl) in modo che ciascuno di essi fosse ugualmente rappresentato.

Utilizzando la PCR (“Polymerase Chain Reaction”) sono state eseguite amplificazioni della regione V3 e V4 del gene RNA ribosomiale 16S usando una coppia di sequenze di primer, di seguito riportate e adatte al monitoraggio microbiologico di suolo e acque (Klindworth *et al.*, 2013):

16S-341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'

16S-805R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

La preparazione della libreria 16S e il sequenziamento sono stati realizzati da NEXT Genomics S.r.l., Prato, Italy. che ha utilizzato la piattaforma MiSeq Illumina. che ha generato oltre 100.000 letture grezze.

Ogni sequenza generata dal MiSeq System in formato *.fastq* ha subito un allineamento tra i rispettivi forward e reverse utilizzando l’algoritmo PANDASEQ, mediante la pipeline QIIME.

Le letture sono state quindi verificate e filtrate per le sequenze chimeriche utilizzando VSEARCH v.1.11 (Rognes *et al.*, 2016).

Le sequenze così selezionate sono state poi clusterizzate in Operational Taxonomic Units (OTUs) con una similarità di almeno il 98% e per le assegnazioni di tassonomia con il metodo *SILVA* (Altschul *et al.*, 1990) come implementato in QIIME v. 1.9.1. (Caporaso *et al.*, 2010). Un ulteriore passaggio di filtraggio di sequenze chimeriche e/o singleton ha preceduto la normalizzazione delle sequenze per il campione che aveva meno sequenze al fine di ottenere le abbondanze relative in cui ogni gruppo tassonomico era presente nei campioni in studio.

Queste informazioni tassonomiche sono state utilizzate per descrivere la comunità batterica a livello di genere, famiglia, ordine, classe e phyla.

I risultati della diversità sono stati quindi confrontati utilizzando ANOVA e PCA. Infine, sono stati rilevati taxa differenzialmente abbondanti tra i due campi utilizzando l'analisi dell'effetto discriminante lineare (LEfSe) (Segata *et al.*, 2011) che ha fissato una soglia del valore p per il test fattoriale di Kruskal-Wallis e per il test Wilcoxon a coppie di 0,05 e il cut-off dell'effetto logaritmico (LDA)> 2.

#### 4.2.3 Indicatori chimico-biochimici

Le analisi fisico-chimiche di base per la caratterizzazione del suolo hanno riguardato i principali parametri usualmente indagati: tessitura, contenuto di macro- e micronutrienti, valori di pH, CSC, conducibilità, CaCO<sub>3</sub> totale e attivo, sostanza organica.

I parametri chimico-biochimici analizzati sono: carbonio organico totale (TOC), biomassa microbica (Cmic), respirazione basale (Cbas) e cumulativa (Ccum), rapporto C/N.

Il carbonio organico totale (TOC) è stato determinato per combustione: il campione viene riscaldato in una corrente di ossigeno fino a circa 600°C, e tutto il carbonio presente viene ossidato a CO<sub>2</sub>. La quantità di CO<sub>2</sub> rilasciata è misurata mediante spettroscopia ad assorbimento infrarosso e convertita in TOC, previa calibrazione (Springer & Kljkee, 1954).

La biomassa microbica (Cmic), che esprime la quantità di carbonio microbico presente nel suolo in mg C kg<sup>-1</sup> suolo, è stata determinata secondo il metodo della fumigazione-estrazione con cloroformio (Vance *et al.*, 1987) su campioni di suolo secco ricondizionati per 10 giorni alla capacità di campo e incubati al buio a 30°C. Sui campioni fumigati e non fumigati si procede alla determinazione del carbonio organico totale della biomassa mediante ossidazione con bicromato di potassio in ambiente acido. La biomassa microbica è data dalla differenza tra la quantità di C nei campioni fumigati e non fumigati.

La respirazione basale (Cbas, mg C- CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suolo d<sup>-1</sup>) e la respirazione cumulativa (Ccum, mg C- CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suolo) rappresentano rispettivamente l’emissione oraria di CO<sub>2</sub> in assenza di substrato organico all’ultimo giorno di incubazione e quella totale emessa durante tutto l’arco di incubazione (Isermeyer, 1952). I campioni di suolo secco sono riportati alla capacità di campo e incubati al buio

a 30°C in contenitori di vetro a chiusura ermetica, insieme a un becker contenente una soluzione di idrossido di sodio. Durante l'incubazione si determina la CO<sub>2</sub> emessa mediante titolazione con acido cloridrico ad intervalli di tempo prefissati (1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21 e 28 giorni), da cui si ricava la curva di respirazione potenziale (Riffaldi *et al.*, 1996).

L'azoto totale (N tot) comprende tutte le forme azotate presenti nel suolo, sia organiche che minerali, che sono state determinate sia con il metodo Kjeldahl (1883), basato su un processo di ossidazione per via umida, sia tramite combustione per via secca con analizzatore LECO FP528 (Francaviglia *et al.*, 2015).

Il rapporto C/N è un indice della disponibilità di azoto delle colture in funzione della quantità di carbonio presente nella sostanza organica del suolo. Il valore ritenuto ottimale per un equilibrio tra i processi di umificazione ed ossidazione è compreso tra 9 e 12: valori inferiori a 9 indicano una maggiore disponibilità per le colture e viceversa (Francaviglia *et al.*, 2015).

#### 4.2.4 **Analisi statistica**

È stata impiegata l'analisi Twoway ANOVA (analisi di varianza) con comparazioni multiple corrette con il metodo Sidak; valori di p-value  $p > 0,05$  sono stati considerati significativi. Sono stati effettuati test statistici per determinare la presenza di variazioni significative fra le tre repliche di ogni campionamento e non è stata riscontrata alcuna differenza fra di esse.

L'analisi multivariata (analisi dei componenti principali - PCA) è stata eseguita utilizzando il software statistico PAST (versione 3.25) per Microsoft Windows 10. L'analisi delle componenti principali è una tecnica per la semplificazione dei dati, il cui scopo è quello di ridurre il numero di variabili che descrivono un insieme di dati a un numero minore di variabili latenti, limitando il più possibile la perdita di informazioni.

Sui dati relativi all'indagine sulle comunità batteriche della rizosfera sono stati rilevati taxa differenzialmente abbondanti tra i due campi utilizzando l'analisi dell'effetto discriminante lineare (LEfSe) (Segata *et al.*, 2011) che ha fissato una soglia del valore p per il test fattoriale di Kruskal-Wallis e per il test Wilcoxon a coppie di 0,05 e il cut-off dell'effetto logaritmico (LDA)  $> 2$ .

L'analisi della composizione delle comunità batteriche nel suolo, degli indicatori chimico-biochimici e l'analisi statistica sono state realizzate con l'apporto decisivo della prof.ssa Elena Di Mattia.

## 4.3 Risultati

### 4.3.1 Composizione delle comunità batteriche nel suolo

I campioni di terreno dell'oliveto asintomatico di San Ligorio (AS) presentano un numero di OTUs di  $5892 \pm 515$  (media  $\pm$  ES) e l'oliveto di Alezio, impattato dalla sintomatologia del disseccamento rapido, mostra in modo analogo  $5896 \pm 851$  (media  $\pm$  ES) OTUs assegnate. Il numero di OTUs totali è stato comparabile tra i due siti e nello specifico risulta di 17694 in AS e 17629 in SS.

Considerando tutti i livelli tassonomici esplorati si evince la presenza di un core microbiomico comune con gruppi batterici presentanti una diversa abbondanza relativa.

Nove phyla batterici sono condivisi tra i campioni di suolo dei due oliveti: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* e *Nitrospirae*. Tra questi, i phyla più abbondanti sono gli *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Acidobacteria*. Tali gruppi sono però distribuiti in maniera diversa tra i due appezzamenti campione, delineando differenze nelle strutture delle comunità batteriche dei rispettivi suoli.

Gli *Actinobacteria*, il *phylum* maggiormente presente in entrambi gli oliveti, in AS corrispondono al 42% del dominio *Bacteria* e in SS la loro presenza scende al 36%.

A seguire si ritrovano i *Proteobacteria* che rappresentano il 25% e il 29% rispettivamente in AS e in SS. Gli *Acidobacteria* sono il 12% in AS e il 15% in SS; da ultimo si riscontra che i *Firmicutes* sono molto più presenti in AS dove costituiscono l'8% del totale delle OTUs, mentre in SS sono solo l'1% (Figura 4.1).

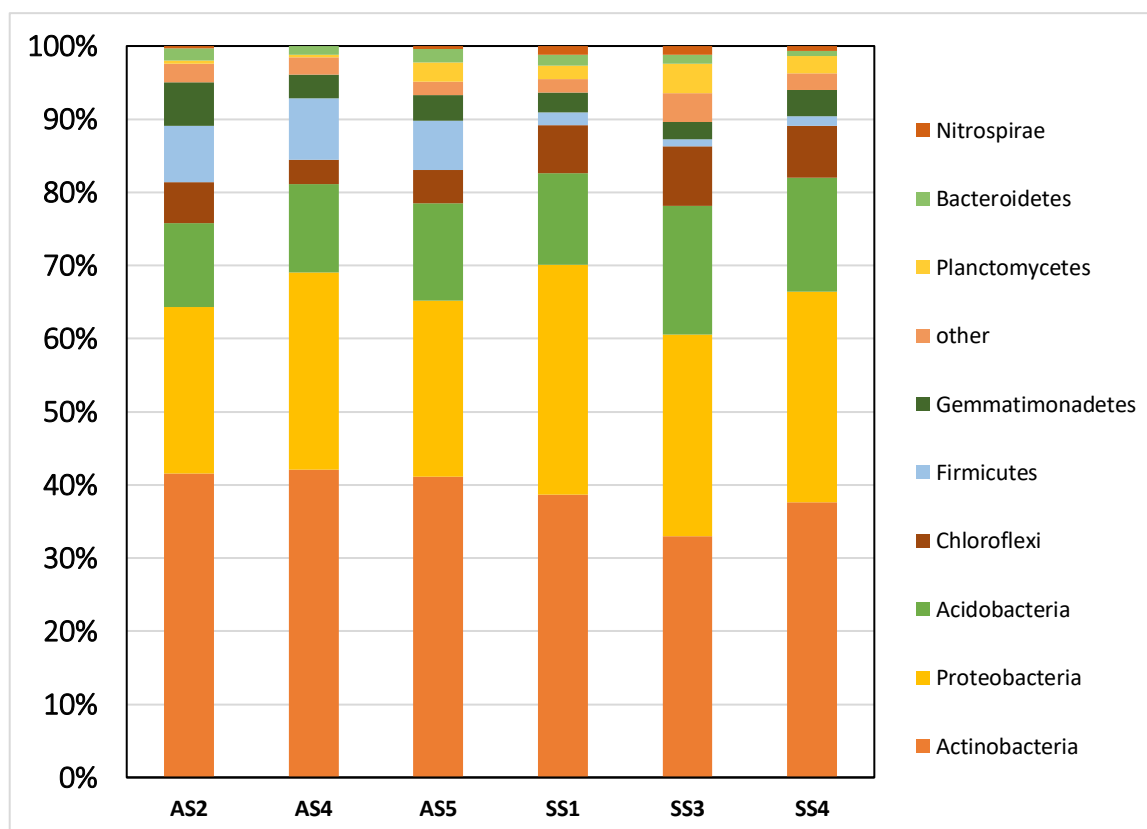


Figura 4.1 Abbondanza relativa OTUs (%) nel dominio *Bacteria* riportante le principali assegnazioni a livello di *Phylum*, rivelata dal sequenziamento Illumina MiSeq dell'amplicone del gene 16S rRNA a livello di *phylum*. Sulle ordinate sono riportate le abbondanze relative in percentuale e sulle ascisse i nomi dei campioni replicati del gruppo AS (oliveto di San Ligorio) e del gruppo SS (oliveto di Alezio).

L'analisi PCA (Principal Component Analysis) condotta sui campioni prelevati in campo ha differenziato le comunità microbiche a livello di phyla in due cluster corrispondenti ai due agrosistemi, sottolineando un ruolo selettivo dell'ambiente sulla composizione delle comunità microbiche, indicando che i diversi contesti hanno influenzato le comunità batteriche della rizosfera (Figura 4.2).

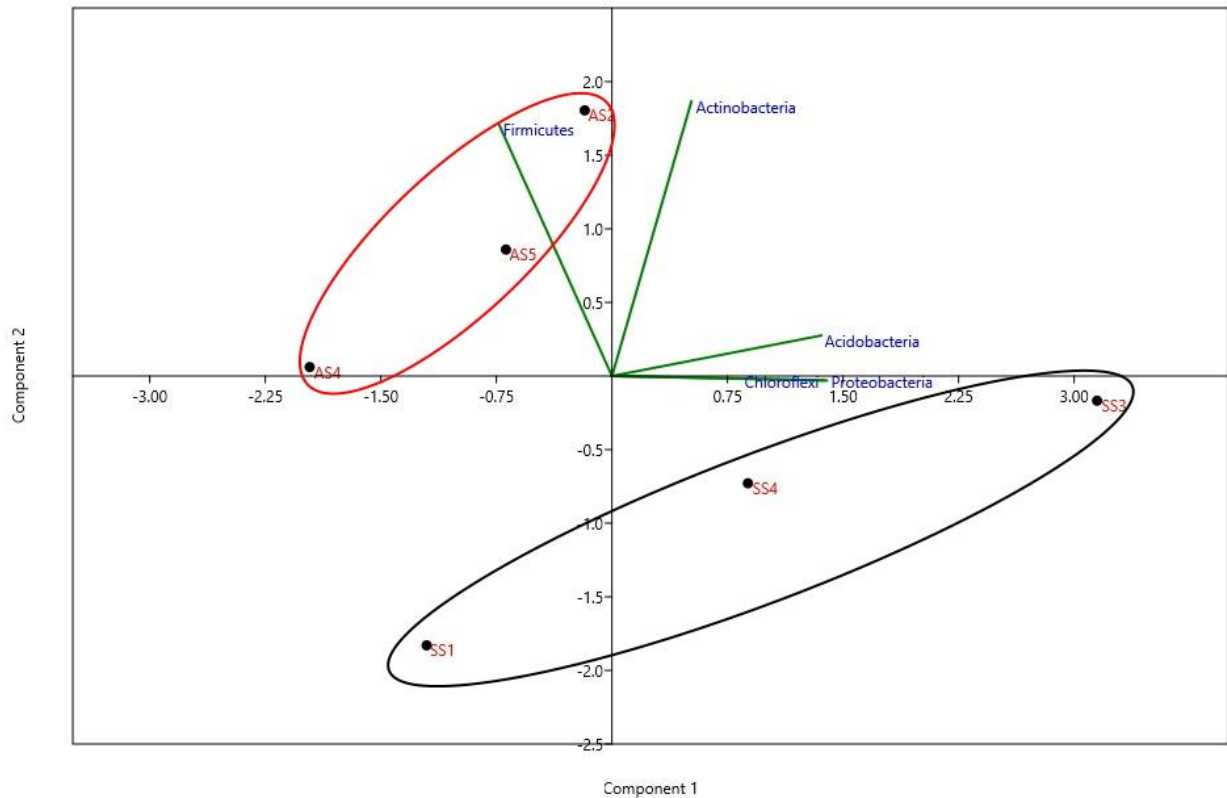


Figura 4.2 PCA realizzata con i risultati NGS che mostrano la distribuzione di phyla batterici tra campioni rizosferici degli oliveti AS (asintomatico, San Ligorio) e SS (impattato, Alezio).

È stata eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) e sono risultate altamente significative ( $p < 0.05$ ) le differenze tra il sito sintomatico e quello asintomatico per quanto concerne le seguenti famiglie: *Gaiellaceae*, *Bacillaceae*, *Rubrobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Beijerinckiaceae*.

La *heatmap*, elaborata con Metaboanalyst, rappresenta le differenze nelle abbondanze relative a livello di famiglia: la “mappa di calore” è una rappresentazione grafica dei dati, ove i singoli valori contenuti in una matrice sono rappresentati da colori (Figura 4.3).

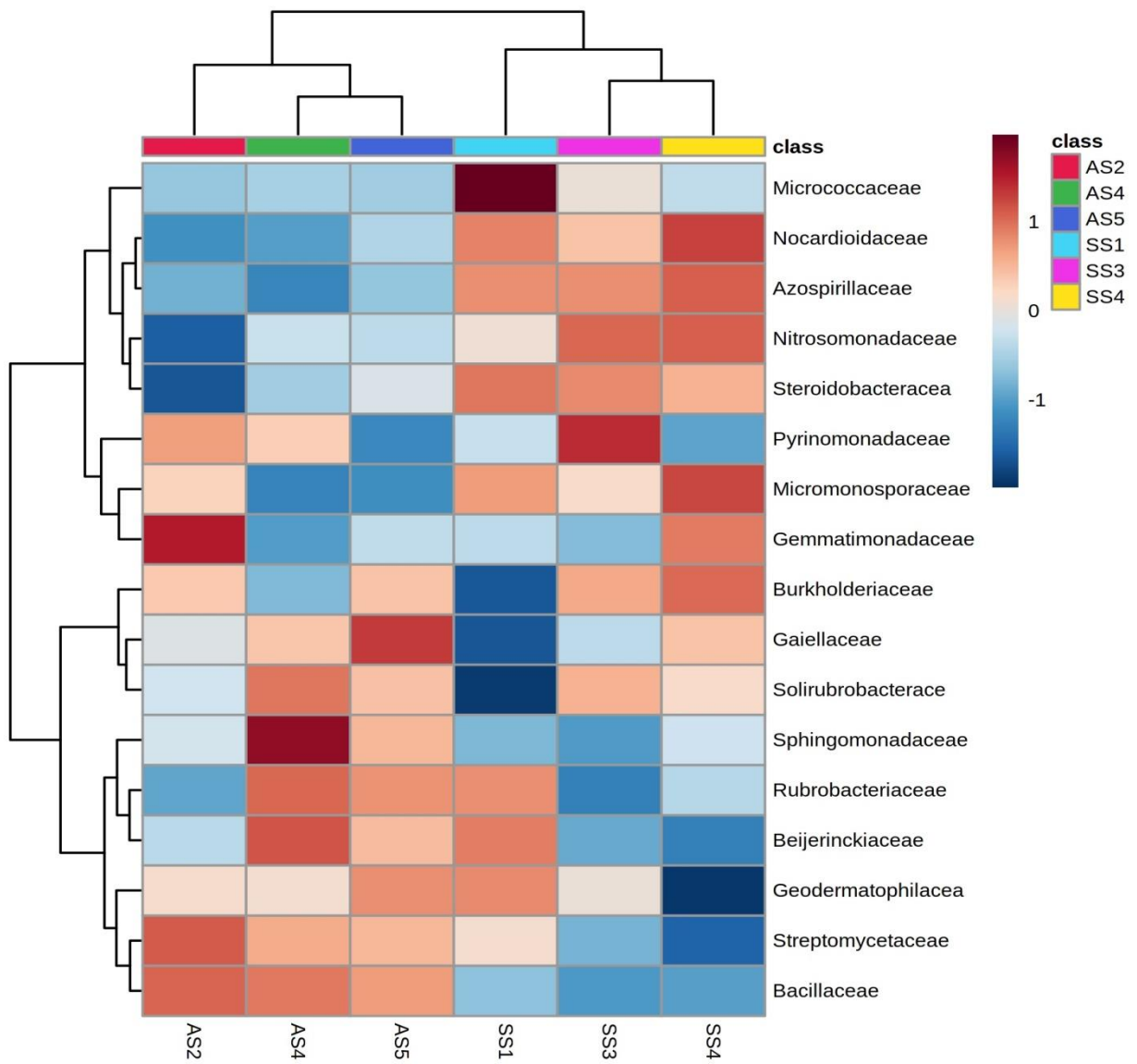


Figura 4.3. Mappa di calore (*heatmap*) raggruppata gerarchicamente della distribuzione batterica per campioni di terreno a livello di famiglia. I rettangoli rosso/marrone mostrano la prevalenza dei gruppi batterici, i rettangoli blu la minor presenza. I campioni AS sono dell'oliveto di San Ligorio, SS sono i campioni dell'oliveto di Alezio.

Per l'analisi dei diversi livelli tassonomici, da phylum a genere, è stata eseguita l'analisi dell'effetto discriminante lineare (LEfSe - *Linear discriminant analysis effect size*) (Segata *et al.*, 2011) (Figura 4.4).

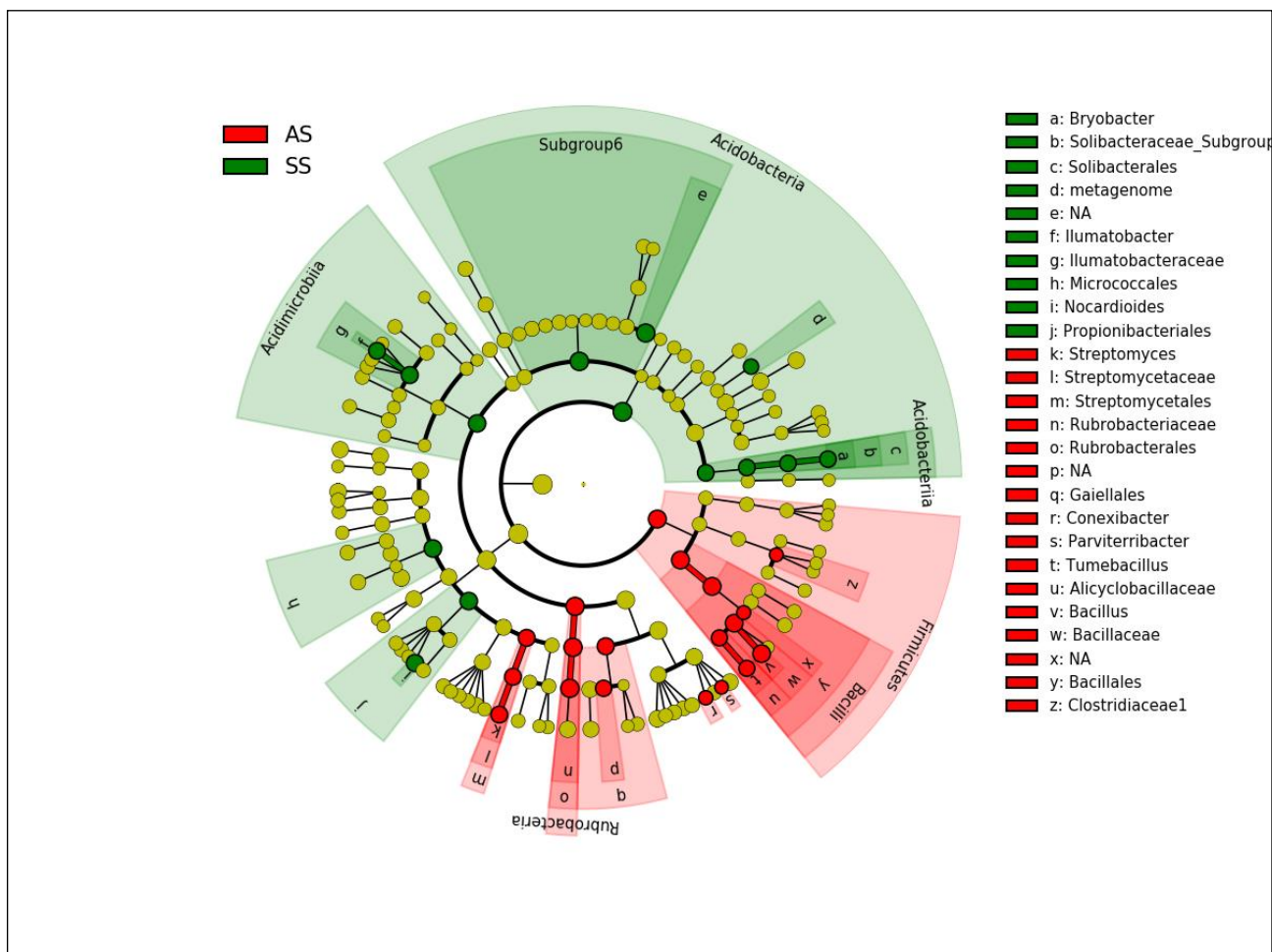


Figura 4.4 Cladogramma dell'analisi LEfSe con i principali biomarker (famiglie e generi) che differenziano i siti sintomatici per "disseccamento rapido dell'olivo" (SS) da quelli asintomatici (AS).

L'analisi metagenomica ha confermato l'ipotesi che i terreni AS e SS presentino comunità batteriche differenziate.

Nel sito asintomatico dominano le famiglie *Alicyclobacillaceae* e *Bacillaceae* e spicca il genere *Bacillus* (v) con varie specie non assegnate o non classificate, che tuttavia concorrono a mettere in evidenza la rilevanza ecologica di questo genere nel sito asintomatico. Nel sito asintomatico si osserva la rilevanza ecologica dei generi *Parviterribacter* (s) e *Conexibacter* (r) della famiglia *Solirubrobacteraceae*. Addizionalmente *Rubrobacter* spp., che annovera numerose affiliazioni non assegnate o non classificate, si conferma come genere ecologicamente rilevante nel contesto ambientale asintomatico. L'indagine LEfSe per il Phylum *Proteobacteria* non ha fornito indicazioni significative e rilevanti. Nel sito sintomatico (SS) è confermata la significatività della dominanza del phylum *Acidobacteria*.

#### 4.3.2 Indicatori chimico-biochimici

Il TOC, confermando il dato relativo alla sostanza organica delle analisi fisico-chimiche, si dimostra maggiore nell'oliveto di San Ligorio, il quale presenta anche una più elevata carica microbica ed una più intensa respirazione cumulativa (Tabella 4.1). La misura della respirazione microbica ha

evidenziato una diversa cinetica di mineralizzazione della sostanza organica tra i due appezzamenti analizzati; ciò trova conferma nel rapporto C/N, che risulta essere più basso nell'appezzamento AS.

Tabella 4.1 Valori dei parametri chimico-biochimici dei suoli campionati a San Ligorio (AS) ed Alezio (SS) (Puglia, provincia di Lecce), provenienti da oliveti con diversa sintomatologia da “disseccamento rapido dell'olivo”. U.M.: Carbonio Organico Totale (TOC) espresso in %; Biomassa Microbica (Cmic) in mg C kg<sup>-1</sup> suolo; Respirazione Basale (Cbas) in mg C- CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suolo d<sup>-1</sup>; Respirazione Cumulativa (Ccum) in mg C- CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suolo.

albero	oliveto	TOC		C-mic		Cbas		Ccum		C/N	
			media oliveto		media oliveto		media oliveto		media oliveto		media oliveto
AS1	AS	1.05	0.98 ± 0.09	382.38	300.8 ± 23.3	11.2	14.6 ± 4.0	329,7	342.8 ± 59.7	8,33	8.13 ± 0.17
AS3		0.88		264.98		13.4		290,7		8,07	
AS5		1.02		255.04		19.1		408,0		8,00	
SS1	SS	0.79	0.81 ± 0.01	259.12	282.7 ± 1.9	15.5	14.8 ± 7.2	215,9	262.1 ± 149	9,10	8.94 ± 0.23
SS4		0.81		318.14		21.5		428,6		8,68	
SS5		0.82		270.76		7.3		141,7		9,05	

I dati dei parametri chimico-biochimici del suolo, sottoposti ad analisi multivariata PCA (Principal Component Analysis), hanno mostrato due cluster, che suggeriscono come le due aree siano caratterizzate da una diversa attività microbica: l'appezzamento che include le piante asintomatiche (AS) è nettamente separato dall'appezzamento con le piante sintomatiche (SS) (Figura 4.5).

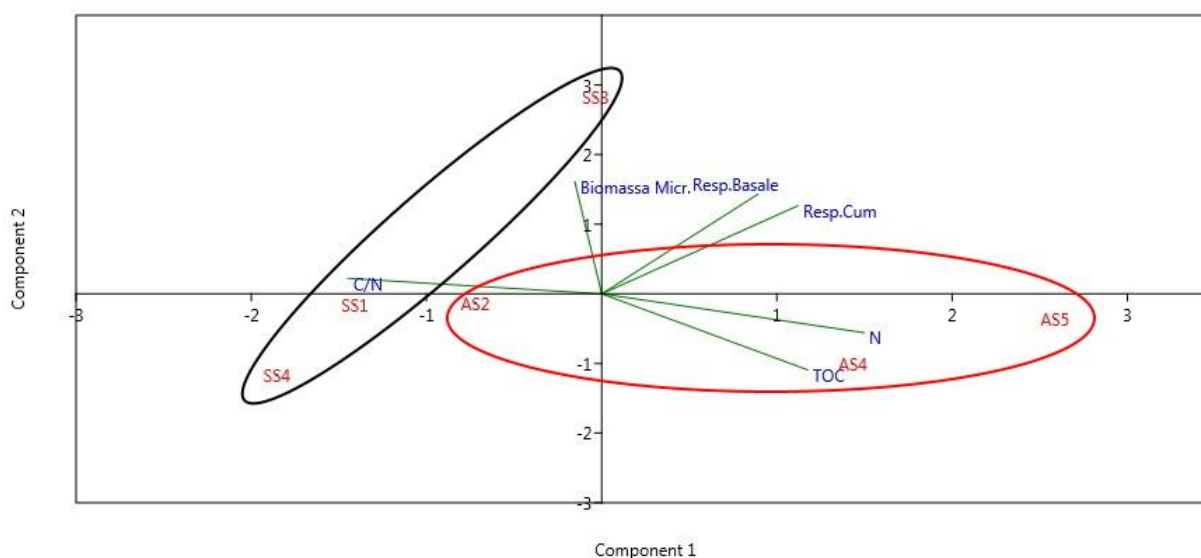


Figura 4.5 PCA realizzata con i parametri chimico-biochimici del suolo rizosferico: N totale (N), carbonio organico totale (TOC), Respirazione basale (Resp.Basale), Respirazione cumulativa (Resp.Cum), Biomassa microbica (Biomassa Micr.) e rapporto carbonio/azoto (C/N) dei campioni rizosferici degli oliveti AS (asintomatico, San Ligorio) e SS (sintomatico, Alezio).

Le prime due componenti utilizzate per costruire lo “scatter plot” sono in grado di spiegare l'84% della varianza totale. La componente 1 (PC1, 49% della varianza) contribuisce prioritariamente a

separare l'appezzamento AS da SS. Si può osservare che le variabili che contribuiscono positivamente alla separazione tra l'oliveto di San Ligorio (AS) e quello di Alezio (SS) sono il contenuto in carbonio organico (TOC) e in azoto totale (N); interessante è anche l'osservazione che a guidare negativamente la separazione sia il rapporto carbonio/azoto (C/N) (Figura 4.6).

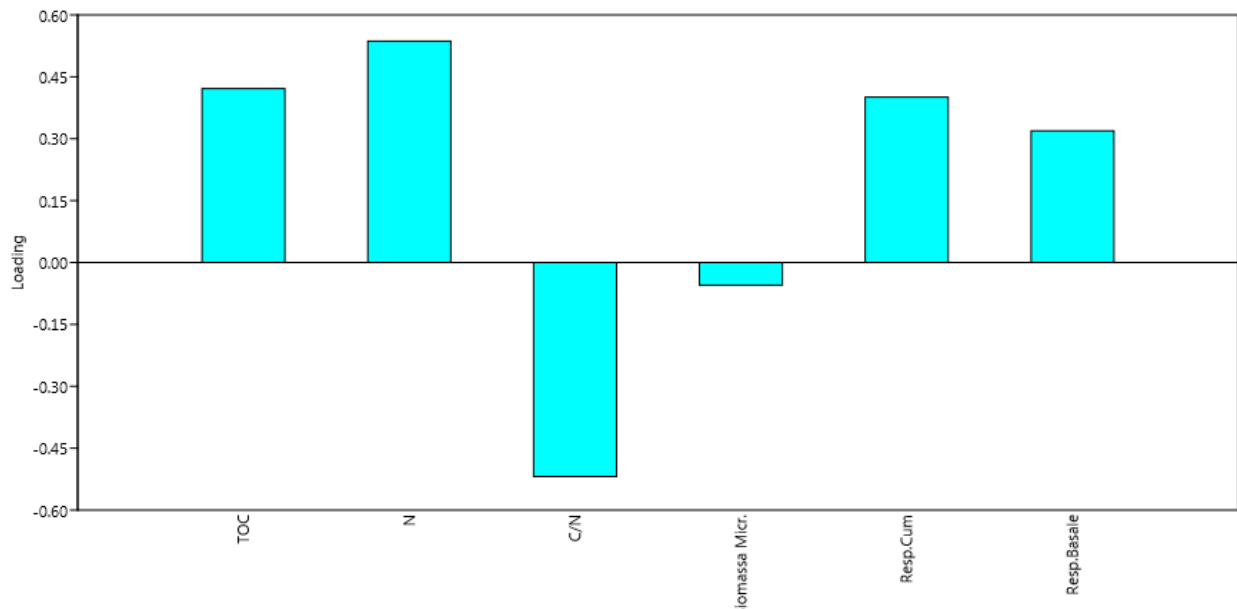


Figura 4.6 Analisi delle Componenti Principali per campioni di suolo rizosferico raccolti da diversi siti nel Salento (Puglia meridionale). Loading plot PC 1: il gruppo AS di San Ligorio (LE) differisce dal gruppo SS di Alezio (LE) per il contenuto di TOC e N e per il rapporto C/N.

### 4.3.3 Caratterizzazione chimico-fisica di base

I dati delle analisi relative alle caratteristiche fisico-chimiche dei suoli esaminati sono riportati nelle Tabelle 4.1 e 4.2 e nella Figura 4.7.

Tabella 4.1 Tessitura dei suoli campionati a San Ligorio (AS) ed Alezio (SS) (Puglia, provincia di Lecce) provenienti da oliveti con diversa sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo”.

	<b>S. LIGORIO (AS)</b>	<b>ALEZIO (SS)</b>
Sabbia (2,0 – 0,05 mm)	66 %	69 %
Limo (0,05 – 0,002 mm)	16 %	14 %
Argilla (< 0,002)	18 %	17 %
<b>CLASSIFICAZIONE</b>	<b>SA</b>	<b>SA</b>

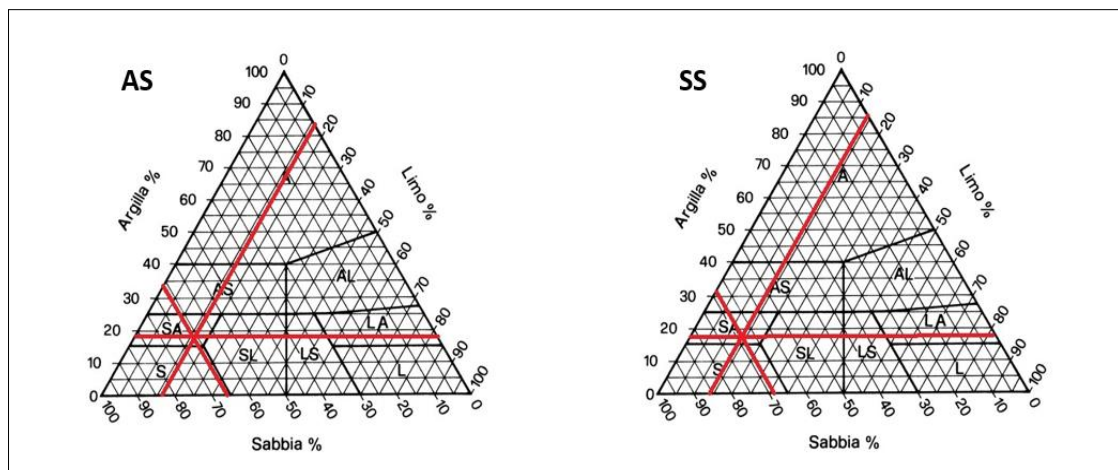


Figura 4.7 Triangolo della tessitura riferito ai suoli campionati a San Ligorio (AS) ed Alezio (SS) (Puglia, provincia di Lecce) provenienti da oliveti con diversa sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo”.

Tabella 4.2 Contenuto di macro- e micronutrienti, valori di pH, CSC, conducibilità, CaCO<sub>3</sub> totale e attivo, sostanza organica per i suoli campionati a San Ligorio (AS) ed Alezio (SS) (Puglia, provincia di Lecce), provenienti da oliveti con diversa sintomatologia da “disseccamento rapido dell’olivo”. [Valutazione: AA.VV., 2006. *Appendice: specifiche delle proprietà e qualità dei suoli*. In: Costantini, E.A.C. (Ed.), *Metodi di valutazione dei suoli e delle terre*, Cantagalli, Siena, pp. 912.]

	U.M.	S. LIGORIO (AS)	Valutazione	ALEZIO (SS)	Valutazione
Calcare totale	%	4.1	Debolmente calcareo	3.3	Debolmente calcareo
Calcare Attivo	%	1.6	Basso	1.3	Basso
pH	Unità di pH	7.8	Debolmente alcalino	7.6	Debolmente alcalino
Magnesio scamb.	meq/100g	2	Molto alto	2	Molto alto
Potassio scamb.	meq/100g	0.47	Alto	0.72	Molto alto
Sodio scamb.	meq/100g	0.80	Normale	0.77	Normale
Calcio scamb.	meq/100g	10.43	Molto alto	9.97	Alto
Capacità scambio cationico	meq/100g	13.70	Moderatamente bassa	13.45	Moderatamente bassa
Conducibilità	mS/cm	0.303	Trascurabile	0.330	Trascurabile
Sostanza organica	%	2.18	Medio	1.34	Scarso
Azoto totale	%	0.13	Mediamente dotato	0.077	Povero
Fosforo assimilabile	mg/Kg P	74	Ricco (*)	128	Ricco (*)
Fe assimilabile	mg/Kg Fe	8.8	Medio	23	Alto
Mn assimilabile	mg/Kg Mn	25.2	Alto	21.6	Alto
Cu assimilabile	mg/Kg Cu	1.4	Basso	12	Alto
Zn assimilabile	mg/Kg Zn	0.4	Molto basso	1	Basso

(\*) Vitagliano C., Sebastiani L., 2003. Impianto. In *Olea - Trattato di Olivicoltura*. 1<sup>a</sup> ed.; Fiorino P. (a cura di). Edagricole, Bologna (Italy), pp. 195-209

L'analisi fisico-chimica del suolo evidenzia che entrambi i campi presentano una tessitura sabbioso-argillosa, un pH sub-alcalino e dotazioni comparabili per quanto riguarda la maggior parte dei parametri.

La dotazione di Sostanza organica è maggiore in AS del 63% rispetto al valore misurato in SS; anche il contenuto di Azoto totale è maggiore in AS (+69% rispetto a SS).

Differenze tra i suoli si registrano per il contenuto in Ferro assimilabile e Rame assimilabile, dei quali è maggiormente dotato il suolo dell’appezzamento di Alezio (SS).

## 4.4 Discussione

### 4.4.1 Caratterizzazione delle comunità batteriche della rizosfera

Il dato principale che emerge dall'analisi metagenomica delle comunità batteriche della rizosfera dei due oliveti situati nella zona infetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* nella provincia di Lecce, è che il profilo dei due microbiomi mostra alcune differenze significative.

I phyla più abbondanti, sia nell'oliveto di San Ligorio sia in quello di Alezio, sono *Actinobacteria* e *Proteobacteria*; questo dato è coerente con quanto riportato da Fausto *et al.* (2018) in uno studio condotto anche sulla rizosfera di olivo in Basilicata: anche in quell'oliveto *Actinobacteria* e *Proteobacteria* presentavano le maggiori abbondanze relative; inoltre, sui 10 phyla riscontrati nel comparto terreno dagli autori, 9 sono in comune con quelli registrati nella presente ricerca. Addizionalmente, 4 di tali phyla, e precisamente *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, sono stati rinvenuti anche da Giampetruzzi *et al.* (2020) nel microbioma xilematico di alberi di olivo infetti da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*.

Le concordanze qui evidenziate confermano in primo luogo che le piante modellano attivamente il microbioma associato, selezionandolo dal suolo non rizosferico (*bulk soil*) attraverso la rizodeposizione (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Hartmann *et al.*, 2009). È stato infatti osservato che le stesse specie vegetali coltivate in terreni diversi possono originare comunità microbiche simili (Miethling *et al.*, 2000). Inoltre, questi dati avvalorano l'ipotesi che lo stile di vita microbico può passare da epifitico a endofitico (Uroz *et al.*, 2019) e le comunità batteriche del suolo possono raggiungere le parti aeree delle piante attraverso la linfa dello xilema (Deyett *et al.*, 2017; Fausto *et al.*, 2018).

Gli *Actinobacteria*, il phylum più abbondante nella rizosfera dei campi analizzati, presentano varie proprietà fisiologiche e metaboliche interessanti, come la produzione di enzimi extracellulari e una varietà di metaboliti secondari (ad esempio agenti antimicrobici) (Lee *et al.*, 2014; Olano *et al.*, 2014; Jog *et al.*, 2016). Essi sono maggiormente presenti nell'oliveto asintomatico, rispetto a quello impattato dalla malattia.

I *Firmicutes*, che comprendono noti antagonisti e agenti di biocontrollo (Emmert & Handelsman, 1999), nella rizosfera degli olivi privi di sintomi sono 8 volte superiori rispetto agli olivi con sintomi da "disseccamento rapido dell'olivo". Tra essi spicca il genere *Bacillus*, particolarmente rilevante nel sito asintomatico e comprendente specie ampiamente distribuite nell'ambiente, ma il cui habitat prioritario è il terreno.

Molti *Bacillus* sono potenti agenti di biocontrollo contro i patogeni dell'olivo, perché spesso colonizzano le stesse nicchie ecologiche e quindi competono direttamente con i patogeni (Aranda *et al.*, 2011). Ceppi specifici di *Bacillus* provocano riduzioni significative nell'incidenza o nella gravità di malattie su una varietà di piante ospiti attraverso l'attivazione di ISR, che è in grado di proteggere da patogeni fungini e batterici, virus sistemici, nematodi. Nella maggior parte dei casi, i ceppi di *Bacillus spp.* che provocano ISR stimolano anche la promozione della crescita delle piante (Kloepper *et al.*, 2004).

In uno studio su olivi del Salento, Zicca *et al.* (2020) hanno registrato in ceppi appartenenti a specie diverse del genere *Bacillus* notevoli attività antagoniste contro *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ST53.

Müller *et al.* (2015) hanno inoltre descritto il genere Gram-positivo *Bacillus* come parte del nucleo del microbiota dell'endosfera dell'olivo.

Ipotizziamo pertanto che i *Bacillus* presenti nel suolo potrebbero avere un ruolo attivo nel contenimento di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* o di altri agenti patogeni capaci di provocare una situazione di stress nelle piante.

I nostri risultati supportano il potenziale ruolo protettivo del rizomicrobioma che si esprime anche all'interno delle piante: sarebbe interessante spingere l'analisi più in profondità per determinare al livello di specie la presenza di *Bacillus* negli oliveti asintomatici.

Nel contesto ambientale asintomatico, *Rubrobacter* spp., che annovera numerose affiliazioni non assegnate o non classificate, si evidenzia come genere ecologicamente rilevante.

Specie del genere *Rubrobacter* (phylum *Actinobacteria*) sono state originariamente isolate da sorgenti termali calde (Chen *et al.*, 2004), da flussi geotermici riscaldati (Albuquerque *et al.*, 2014) o da effluenti termicamente inquinati (Carreto *et al.*, 1996). Sono stati altresì rilevati in una caldara di un vulcano delle Hawaii (Norman *et al.*, 2017), nel deserto iperarido di Atacama (Connon *et al.*, 2007), in suoli aridi australiani (Holmes *et al.*, 2000) e in suoli aridi antartici (Aislabie *et al.*, 2006). Tuttavia, il genere non è limitato agli ambienti ad alta temperatura; la maggior parte delle specie è molto tollerante all'essiccazione e sono presenti anche specie alofile. *Rubrobacter*, anche nel nostro caso quindi, può ragionevolmente assumere il ruolo di indicatore di suoli aridi e secchi. Una probabile spiegazione della loro maggior presenza nell'oliveto di San Ligorio (asintomatico – AS), potrebbe essere che questo non è mai stato irrigato ed il suolo presenta uno spessore piuttosto ridotto, persino evidenziando in più punti rocce affioranti.

Dall'analisi della varianza (ANOVA), la famiglia delle *Gaiellaceae* risulta significativamente più presente nel sito asintomatico. Appartiene all'ordine *Gaiellales* (phylum *Actinobacteria*) e comprende un solo genere, *Gaiella*. Sono organismi isolati per la prima volta da un profondo pozzo d'acqua minerale (Nobre *et al.*, 2011); sono strettamente aerobici e chemioorganotrofi rigorosi. Successivamente sono anche stati rinvenuti in campioni di suolo prelevati in diverse zone del mondo. Uno studio condotto nel deserto del Thar (India) con un clima caldo e arido, pochissime precipitazioni e temperature estreme, ha evidenziato che, a livello di genere, *Gaiella* ha rappresentato la più alta prevalenza (Sivakala *et al.*, 2018). Questi dati mettono in relazione stretta *Gaiella* con un ambiente estremo quale quello desertico.

Un'indagine che ha determinato la composizione di comunità batteriche in campioni di terreno provenienti da 110 siti naturali o utilizzati dall'uomo, ha dimostrato una forte correlazione negativa tra i membri della famiglia *Gaiellaceae* e il rapporto C:N del terreno (Hermans *et al.*, 2017). In pratica, quando il rapporto C:N è basso le *Gaiellaceae* hanno un'elevata abbondanza relativa, la quale diminuisce quando il rapporto aumenta a vantaggio del carbonio. Questo risultato suggerisce una funzione specifica che potrebbe essere esercitata nel suolo da questi batteri: le *Gaiellaceae* sono, infatti, degli ottimi indicatori di suoli con elevata attività di mineralizzazione della sostanza organica.

È interessante sottolineare che dall'analisi metagenomica eseguita nel presente studio, nei due suoli indagati non sono state rilevate specie del genere *Pseudomonas*, che invece vengono considerati batteri normalmente presenti negli oliveti (Cabanás *et al.*, 2018).

Dall'analisi del microbioma rizosferico degli oliveti di San Ligorio ed Alezio emerge un assetto ascrivibile ad una situazione di suoli degradati; alcuni taxa molto presenti sono stati ritrovati in suoli di ambienti estremi in diverse zone del mondo e sono stati ritenuti indicatori di tali ambienti, caratterizzati perlopiù da clima arido e molto siccitoso. Tale quadro risulta in linea con l'ambiente pedoclimatico semiarido del Salento.

La caratterizzazione del profilo ecologico molecolare delle comunità batteriche di ambienti estremi e stressanti, su scala locale, è fondamentale per interpretare modelli ecologici più ampi. Soprattutto i deserti estremi caldi e freddi caratterizzati da un'elevata eterogeneità spaziale possiedono comunità endemiche di microbi che si ritiene svolgano ruoli chiave nei processi chiave della funzionalità ecosistemica (Sivakala *et al.*, 2018).

Le relazioni tra specifiche caratteristiche del terreno e singoli taxa batterici del suolo, non solo evidenziano le caratteristiche ecologiche di questi organismi, ma dimostrano anche la capacità dei principali gruppi tassonomici di riflettere l'impatto di specifiche attività antropogeniche, anche dal

confronto di campioni prelevati diffusamente in vaste aree geografiche e in diversi tipi di suolo. Nel complesso, gli studi consultati (Hermans *et al.*, 2017; Sivakala *et al.*, 2018) forniscono una forte evidenza del fatto che è possibile utilizzare le abbondanze relative dei taxa come indicatori biologici delle condizioni del suolo.

Nel nostro caso studio, la maggior abbondanza relativa di batteri del genere *Bacillus* nell'oliveto asintomatico potrebbe suggerire una loro potenziale interazione diretta con i patogeni della pianta: tale ipotesi è da verificare con ulteriori indagini. Nondimeno, il fatto che la composizione del microbioma rizosferico dei due siti sia significativamente diversa a più livelli di taxa, riveste importanza perché fornisce indicazioni circa un possibile diverso stato di salute del suolo. Questo, a sua volta, può influenzare la capacità di difesa delle piante e la loro resilienza rispetto agli stress di origine biotica e abiotica.

Interessante sarebbe anche approfondire i meccanismi con cui alcuni batteri benefici riescono a svolgere un ruolo di controllo nei confronti di *X. fastidiosa*.

Il patogeno, essendo inoculato direttamente nella nicchia desiderata dai suoi insetti vettori, inizialmente non suscita una risposta immunitaria, perché non viene rilevato dall'ospite come patogeno ma piuttosto come uno stress abiotico correlato alla siccità e alla disidratazione (Rapicavoli *et al.*, 2018). I ceppi di specie appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paraburkholderia*, individuati da diversi studi come antagonisti a *X. fastidiosa*, potrebbero attuare una competizione diretta oppure interagire con il sistema immunitario della pianta determinando un effetto di innesco della malattia che tempera lo sviluppo del patogeno. Sarebbe utile capire se la loro interazione con il patogeno e con la pianta sia influenzata da altri taxa batterici contestualmente presenti e se l'azione di soppressione possa essere associata a una specifica struttura della comunità microbica in cui gli antagonisti sono inseriti.

Le interazioni tra microbi, pianta e suolo sono estremamente complesse e la maggior parte dei batteri potrebbe non influenzare direttamente la pianta né l'agente patogeno: la soppressione di malattie, infatti, non sembra si possa attribuire esclusivamente a un singolo taxa, in quanto la sua efficacia sarebbe largamente influenzata dal resto della comunità microbica. Si può sostenere che tutti i microrganismi attivi si influenzino a vicenda in un modo o nell'altro, anche se indirettamente. Né il numero, né la presenza esclusiva di taluni taxa microbici sembrano determinare la soppressione di una malattia, che invece sarebbe correlata con l'abbondanza relativa di diversi taxa (Berendsen *et al.*, 2012). Rivestirebbe quindi maggior importanza la struttura del microbiota, piuttosto che la presenza di specifici taxa.

Secondo alcuni autori, anche piccoli cambiamenti nella struttura della comunità microbica edafica potrebbero avere un grande impatto sulla stabilità dell'ecosistema del suolo (He *et al.*, 2007; Wittebolle *et al.*, 2009).

I metodi di analisi del microbioma indipendenti dalla coltivazione, in particolare gli studi metagenomici con approccio NGS basati sul sequenziamento di regioni variabili di RNA ribosomiale 16S (rRNA 16S), consentono di identificare i taxa dei batteri presenti in una comunità microbica e la loro abbondanza relativa. Pertanto, al fine di ottenere dati che si riferiscono alla struttura della comunità nel suo complesso, è stata utilizzata questa tipologia di analisi.

La nostra ipotesi è, quindi, che la composizione della comunità batterica del suolo possa essere un utile indicatore dello stato sanitario degli olivi coltivati e possa essere messa in relazione con lo sviluppo dei sintomi da disseccamento rapido nella zona infetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. È possibile che una biodiversità più conservata possa combinarsi con un quadro di resistenza sistemica indotta.

#### 4.4.2 **Analisi delle attività microbiche**

Le analisi di ecologia microbica ambientale sono state integrate con l'analisi di alcuni parametri chimico-biochimici strettamente correlati alla componente microbiologica del suolo.

Anche questi parametri, come nel caso dell'analisi del microbioma batterico della rizosfera, ci restituiscono, dal punto di vista di alcune attività biochimiche svolte dal microbiota edafico, due situazioni differenziate negli oliveti esaminati.

Nell'appezzamento asintomatico sono maggiori i valori del carbonio organico totale, della carica microbica e della respirazione cumulativa; è più elevato anche l'azoto totale, mentre è più basso il rapporto carbonio/azoto.

Questi valori denotano una maggiore attività microbiologica nell'appezzamento asintomatico; in questo oliveto abbiamo un maggior tasso di sostanza organica, presumibilmente dovuto all'inerbimento che viene praticato con essenze spontanee nel periodo primaverile e al minor numero di lavorazioni del terreno nel corso dell'annata. Il basso rapporto C/N indica una mineralizzazione più rapida della sostanza organica presente, con rilascio di nutrienti disponibili per le piante. Questo dato si correla con la presenza prevalente nell'appezzamento AS di batteri del genere *Gaiella*, indicatori, per l'appunto, di terreni con basso rapporto C/N.

Nel complesso, quindi, i risultati delle analisi sulle attività biochimiche corroborano quanto emerso in sede di analisi metagenomica, indicando nel terreno di San Ligorio, con alberi privi di sintomi da disseccamento rapido, una maggior capacità di sostenere la crescita degli alberi, pur in un contesto territoriale generale di suoli semplificati ed impoveriti.

Per quanto a nostra conoscenza, questo studio è il primo a condurre un'analisi di ecologia microbica ambientale comparativa che pone a confronto il suolo di due oliveti situati in zona infetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* coltivati con la medesima cultivar. Le differenze riscontrate sono significative, sia a livello di abbondanza relativa di taxa nelle comunità batteriche della rizosfera, sia in alcune attività biochimiche da queste svolte.

Contemporaneamente, al fine di esplorare le possibili cause delle differenze tra gli appezzamenti, sono state acquisite ulteriori informazioni sul contesto ambientale degli oliveti.

La composizione e la struttura del microbiota associato ad una determinata coltura arborea subiscono, infatti, alterazioni dovute a fattori quali cambiamenti ambientali, proprietà fisico-chimiche del suolo, materia organica ed essudati del suolo (Fierer, 2017), azioni antropiche, pratiche agronomiche (Hardoim *et al.*, 2015), fattori climatici, stadio di sviluppo della pianta, stress biotici ed abiotici.

#### 4.4.3 **Analisi delle caratteristiche pedo-climatiche e gestionali**

Poiché il genotipo vegetale analizzato nei due appezzamenti è lo stesso (cv. Cellina di Nardò) e lo stadio di sviluppo degli alberi simile, sono state eseguite analisi di caratterizzazione del suolo, finalizzate a conoscere le caratteristiche fisico-chimiche di base del terreno degli oliveti campione. Tali analisi hanno mostrato caratteristiche simili tra i diversi campi per quanto riguarda la tessitura, il pH e la conducibilità elettrica. Entrambi i suoli sono di origine calcarea, di tessitura sabbioso-argillosa, con pH subalcalino, come la maggior parte dei suoli della zona (calcareniti plio-pleistoceniche).

Il tenore di sostanza organica in entrambi i terreni è estremamente basso in riferimento ai valori definiti nell'ambito dei documenti europei finalizzati alla protezione del suolo (Commissione delle Comunità Europee, 2002), ma l'oliveto asintomatico (2,18%) ne contiene il 63% in più rispetto a quello di Alezio (1,34%); zone con valori inferiori all'1,7% sono considerate nella fase immediatamente precedente la desertificazione (Commissione delle Comunità Europee, 2002). Negli ultimi anni la concimazione del terreno nella grande maggioranza delle aziende olivicole del Salento si è basata, laddove sia stata effettuata, sull'apporto di concimi minerali, mentre quasi del tutto assente è stata la fertilizzazione con sostanza organica. Probabilmente, in un contesto territoriale di generale

depauperamento della matrice organica del suolo, alcune pratiche agricole nell'oliveto asintomatico, tra cui l'inerbimento spontaneo con sfalcio delle erbe e il mancato utilizzo di erbicidi chimici, possono aver determinato quel gradiente di dotazione organica che ha potuto supportare meglio l'attività microbiologica e l'assorbimento di nutrienti rispetto all'oliveto impattato dalla sintomatologia da "disseccamento rapido dell'olivo".

Diversi studi hanno rilevato che l'abbondanza di sostanza organica nel suolo e/o l'aggiunta di ammendanti organici ha soppresso i sintomi di diverse malattie batteriche e fungine in piante coltivate; in molti casi gli autori hanno attribuito la maggiore resistenza alla malattia principalmente all'attivazione sistemica delle difese delle piante, paragonabile alla resistenza sistemica acquisita (SAR Systemic Acquired Resistance) (Gupta *et al.*, 2017).

In questo quadro, con un'attività microbica più elevata, sembra coerente anche il contenuto di azoto totale, che fa registrare differenze fra gli appezzamenti, per cui AS (0,13%) ha il 69% in più rispetto a SS (0,077%).

La maggior concentrazione di Fe, Zn e Cu nel terreno dell'oliveto di Alezio (SS) può essere spiegato con l'utilizzo di concimi integrati con Fe e Zn e con i trattamenti regolari con composti cuprici effettuati negli anni per controllare batteri e funghi patogeni; tale ultimo dato è comune a molti suoli pugliesi (Provenzano *et al.*, 2009). Questa presenza nel suolo non può però essere messa direttamente in relazione con il contenuto dei microelementi nella pianta, poiché il ruolo della materia organica del suolo è cruciale per sostenere l'assorbimento di metalli coinvolti nella difesa delle piante dai patogeni, alcuni dei quali vengono prelevati dal suolo proprio come complessi organici (Chatzistathis *et al.*, 2017). Inoltre, gli olivi sembra siano in grado di regolare strettamente l'assorbimento e i livelli dei micronutrienti, modulandone la concentrazione nella pianta (D'attoma *et al.*, 2019).

Sono stati inoltre rilevati i parametri climatici forniti dalle stazioni di rilevamento della Regione Puglia situate in località limitrofe ai comuni in cui ricadono i due oliveti. L'analisi ha riguardato 18 anni, tra il 2000 e il 2017, ed erano relativi a: pioggia giornaliera caduta (media mensile e totale mensile), giorni di piovosità, umidità relativa mensile, temperature medie mensili e numero di giorni nel mese con massime/minime al di sopra/sotto di determinate soglie.

In base a questi parametri, non si evidenziano differenze climatiche sostanziali tra le zone indagate.

Sono state quindi raccolte informazioni riguardanti le principali tecniche di gestione adottate negli oliveti oggetto di studio. Sono emerse differenze nella conduzione dei due oliveti in relazione soprattutto alle tecniche e ai tempi della potatura, alla concimazione organica e alla gestione del suolo (es. utilizzo di erbicidi *vs.* inerbimento, rullatura e compattamento), alla fertilizzazione fogliare e alla modalità di raccolta delle olive.

Queste differenze nelle tecniche agronomiche potrebbero aver influito sul tenore della sostanza organica e dell'azoto nel suolo e potrebbero essere collegati alla diversa struttura delle comunità batteriche della rizosfera.

I dati raccolti e le relazioni qui delineate tra gli elementi microbiologici, pedologici e colturali sono interessanti e possono indicare un campo di ricerca nuovo in questo contesto territoriale in riferimento al patosistema *X. fastidiosa*-olivo; l'approfondimento dell'analisi di ecologia microbica potrebbe contribuire alla comprensione del ruolo giocato dai fattori agroecologici nella diffusione e nello sviluppo dei sintomi del disseccamento rapido degli olivi nel Salento.

*PARTE SPERIMENTALE 3*

**5 Lo ionoma delle foglie gioca un ruolo nella risposta degli olivi (*Olea europaea*) al “disseccamento rapido”?**

## 5.1 Importanza dello ionoma fogliare

Lo stato nutrizionale delle piante ha un ruolo di primaria importanza per l'attivazione di meccanismi che consentono la mitigazione degli effetti di diversi stress abiotici e biotici.

Macro- e micronutrienti svolgono un ruolo in innumerevoli funzioni cellulari, fungendo da componenti di importanti molecole (es. magnesio nella clorofilla) o da cofattori proteici in molti processi (Waldron *et al.*, 2009). Pertanto, l'omeostasi dei diversi minerali è importante per garantire un tasso adeguato di crescita e sviluppo delle piante e può essere un fattore rilevante nel controllo e nella progressione delle malattie (Agrios, 2005; Hänsch and Mendel, 2009). Nelle interazioni ospite-patogeno, la competizione per acquisire questi elementi è un fenomeno noto come "immunità nutrizionale" (Hood & Skaar, 2012).

Alcuni esperimenti hanno evidenziato che lo stato nutrizionale della pianta gioca un ruolo importante nell'infezione da *X. fastidiosa in vitro* e durante l'infezione *in planta*. L'analisi di piante di vite coltivate in campo e di tabacco coltivate in serra, durante l'infezione da *X. fastidiosa* ha rivelato differenze significative nello ionoma tra piante infette e non infette, nonché tra foglie sintomatiche e asintomatiche, ed ha suggerito che possa esistere una complessa interazione tra i diversi elementi (Andersen and French, 1987; Silva-Stenico *et al.*, 2009).

Studi più recenti hanno ulteriormente sottolineato l'importanza della composizione elementare dei tessuti vegetali e dei cambiamenti a carico di questo parametro nelle piante-ospiti in relazione alla virulenza *X. fastidiosa* e allo sviluppo dei sintomi della malattia (Cobine *et al.*, 2013; De La Fuente *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 2014; Navarrete and De La Fuente, 2014; Navarrete and De La Fuente, 2015), indicando che il contenuto e la disponibilità degli elementi nelle foglie dell'ospite potrebbero essere collegati all'infezione dell'olivo da parte di *X. fastidiosa*.

In particolare, uno studio recente condotto su olivi affetti da “disseccamento rapido dell'olivo” nel Salento, un'area in cui *X. fastidiosa* subsp. *pauca* è particolarmente diffusa, ha analizzato il contenuto di micronutrienti nei suoli e il loro accumulo nei tessuti fogliari delle piante di olivo (Scortichini *et al.*, 2019). Questo lavoro rappresenta la prima ricerca specifica finalizzata a valutare se la variazione nella concentrazione di nutrienti nelle foglie o nel suolo possa avere un ruolo nello sviluppo della malattia. I risultati di questo studio hanno mostrato che i tessuti fogliari di piante di olivo infette da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e mostranti sintomi di “disseccamento rapido dell'olivo” della varietà Ogliarola salentina presentavano la diminuzione del contenuto di diversi oligoelementi, in particolare di rame (Cu), un fenomeno raro e mai registrato in Italia in precedenza. Inoltre, nello studio è stato dimostrato che i suoli erano caratterizzati da adeguate quantità di Cu, pertanto il ridotto accumulo del metallo a livello fogliare non dipende da una carenza dell'elemento nel suolo, ma piuttosto da un ridotto assorbimento e/o accumulo da parte della pianta infetta. Tali dati sono in accordo con altri precedentemente ottenuti in foglie di *Vaccinium corymbosum* infette da *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (Oliver *et al.*, 2015).

Anche D'attoma *et al.* (2019) hanno ipotizzato che le differenze nello ionoma fogliare siano informative della capacità di ostacolare lo sviluppo dei sintomi. Tale ipotesi è stata avvalorata dai risultati della ricerca, che hanno registrato livelli di Mn più elevati in alberi di olivo mostranti tratti di resistenza a *X. fastidiosa* subsp. *pauca*; questo elemento regola numerosi percorsi che potrebbero modulare i sintomi della malattia. La caratterizzazione dello ionoma fogliare ha mostrato cambiamenti con la progressione dei sintomi.

L'analisi del suolo rispetto allo ionoma fogliare ha confermato, inoltre, che gli olivi siano in grado di regolare strettamente i livelli di diversi micronutrienti, modulandone la concentrazione nella pianta.

Queste evidenze ci permettono di ipotizzare che squilibri nutrizionali o variazioni nell'accumulo di nutrienti nei tessuti della pianta possano costituire un fattore predisponente per lo sviluppo di sintomi da “disseccamento rapido dell'olivo”.

Il primo obiettivo di questa parte della tesi è stato pertanto quello di verificare l'eventuale esistenza di una relazione tra lo stato nutrizionale delle piante e la gravità dei sintomi da "disseccamento rapido" su alberi di olivo appartenenti alla medesima cultivar. Tale obiettivo è stato raggiunto attraverso l'analisi dello ionoma, definito come il profilo completo dei nutrienti minerali e degli oligoelementi presenti in un organismo, il cui studio permette la comprensione delle connessioni fisiologiche e genetiche tra un elemento e il suo assorbimento, trasporto e accumulo all'interno di un organismo (Lahner *et al.*, 2003). La composizione dello ionoma è stata determinata quantificando, mediante ICP-OES, la concentrazione di macro- e micronutrienti nei tessuti fogliari di piante di olivo caratterizzate da diversi livelli di sintomatologia.

## 5.2 I composti dello zolfo: ruolo nella difesa dalle malattie

Tra gli elementi essenziali, lo zolfo (S) svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione di una efficace risposta di difesa agli stress biotici e abiotici (Hell & Kruse, 2007). Le piante possiedono infatti complessi sistemi di difesa per evitare, o per lo meno limitare, il danno ossidativo indotto da diversi tipi di stress e tali sistemi possono essere enzimatici e non-enzimatici (Sharma e Dietz, 2009). Nell'ambito di questi ultimi, è noto che l'acido ascorbico e il glutatione (GSH) sono i composti principalmente coinvolti nei meccanismi di difesa contro gli stress ossidativi. In particolare, il glutatione rappresenta circa il 90% della frazione tiolica solubile in acqua ed è quindi da considerare la forma più abbondante di zolfo ridotto presente nella pianta (Leustek *et al.*, 2000); è un tripeptide ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) e nella pianta riveste un ruolo importante come antiossidante nel meccanismo di detossificazione dei radicali tossici dell'ossigeno e del perossido d'idrogeno, come dimostrato dal rapido aumento della sua concentrazione nelle piante sottoposte a stress ossidativo (Anjum *et al.*, 2015). Il GSH è importante non solo per limitare l'accumulo di ROS in seguito all'attacco di patogeni o ferite da fitofagi, ma sembra essere collegato alle vie di segnalazione che portano all'attivazione dei meccanismi di difesa delle piante (Ball *et al.*, 2004).

E' noto che l'infezione da patogeni può innescare la produzione e l'accumulo di GSH e anche la modulazione delle variazioni transitorie nel suo stato redox (Noctor *et al.*, 2012). Inoltre, è stato dimostrato che il metabolismo elevato del GSH può contrastare l'infezione nelle piante da parte del virus del mosaico del tabacco (Höller *et al.*, 2010; Király *et al.*, 2012), di *Pseudomonas syringae* (Großkinsky *et al.*, 2012) e *Botrytis cinerea* (Simon *et al.*, 2013). Infine, è stato riportato che elevati livelli di GSH e cisteina sopprimono e ritardano i sintomi di virus del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV) in *Cucurbita pepo* (Zechmann, Zellnig and Müller, 2005; Zechmann *et al.*, 2007; Zechmann and Müller, 2008). Questi studi confermano la necessità di un adeguato livello di GSH per garantire la resistenza della pianta alle malattie, non solo per la sua attività antiossidante, ma anche per permettere la sintesi di molecole correlate alla difesa del patogeno come la camalexina, una indolo-fitoalessina contenente un atomo di S per molecola con anello tiazolico parzialmente derivato dalla cisteina (Noctor *et al.*, 2012).

Essendo il GSH un tiolo non proteico, appare quindi ragionevole ipotizzare che l'esposizione delle piante ad uno stress possa determinare un aumento del fabbisogno di composti tiolici, e che l'aumento di tale fabbisogno si traduca anche in un incremento della domanda metabolica di zolfo ridotto e della velocità di assimilazione del solfato.

Il secondo obiettivo di questa parte della tesi è stato quindi quello di valutare se l'entità dei sintomi innescati dall'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* nelle piante di olivo fosse associato ad un aumento della difesa antiossidante, alleviando così lo stress ossidativo sulle molecole funzionali delle cellule.

È stato quindi correlato il diverso grado dei sintomi di "disseccamento rapido dell'olivo" alla velocità di assimilazione del solfato, attraverso la misurazione dell'attività dell'*O*-acetilserina (tiol) liasi (OASTL), l'ultimo enzima della via assimilativa del solfato e direttamente coinvolto nella sintesi della cisteina, e al livello di accumulo dei tioli non proteici.

## 5.3 Materiali e metodi

Il materiale vegetale utilizzato per queste analisi proviene dai due appezzamenti campione che erano stati individuati per le analisi del suolo (nelle località di Alezio e di San Ligorio) e da un terzo in agro di Torchiarolo, che presentava una situazione fitopatologica intermedia rispetto agli altri due. Anche questo oliveto era costituito da alberi della varietà Cellina di Nardò di circa 50 anni di età.

### 5.3.1 Campionamento delle foglie

Per ciascuna azienda, nell'estate 2018 sono stati prelevati campioni di foglie da cinque olivi rappresentativi dello stato di salute dell'oliveto.

Sono state raccolte 40 foglie per pianta (10 foglie per ogni punto cardinale), in posizione esterna della chioma ad un'altezza media, utilizzando attrezzature sterili, secondo quanto riportato da Sanzani *et al.* (2012). In particolare, da rami di uno-due anni con sviluppo vegetativo medio, né esuberante né deficitario, sono state prelevate foglie dell'anno completamente espanse, complete di picciolo e senza danni meccanici (per grandine, gelo, vento) né attacchi parassitari.

Le foglie destinate all'analisi degli elementi minerali sono state accuratamente lavate con acqua distillata e poi trattate come descritto nel paragrafo 5.3.2.

Le foglie utilizzate per la determinazione dei composti tiolici e dell'enzima OASTL sono state immediatamente congelate in ghiaccio secco e poi conservate ad una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$  in attesa delle analisi.

La preparazione dei campioni da analizzare è stata eseguita nel laboratorio del Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente dell'Università di Foggia e, successivamente, gli estratti sono stati processati ed analizzati nel laboratorio di Fisiologia e Biochimica delle Piante Coltivate dell'Università della Tuscia – Dipartimento DAFNE, in collaborazione con il gruppo di ricerca della prof.ssa Astolfi.

### 5.3.2 Analisi ICP-OES

Per determinare le concentrazioni di elementi minerali, i tessuti fogliari sono stati essiccati in stufa a  $80^{\circ}\text{C}$  fino al raggiungimento del peso costante e successivamente sono stati posti in un forno a muffola a  $600^{\circ}\text{C}$  per 24 ore per ottenere le ceneri.

Le ceneri sono state quindi digerite con un digestore a microonde e l'analisi elementare è stata effettuata con il metodo UNI EN 13657:2004 + UNI EN ISO 11885:2009 mediante ICP-OES. L'ICP-OES, spettrometria ad emissione atomica accoppiata induttivamente al plasma (*Inductively Coupled Plasma*) con rivelatore ottico è una tecnica utilizzata per la determinazione di elementi inorganici presenti in matrici diverse, ed è attualmente una delle metodologie analitiche più frequentemente utilizzate nella determinazione dei metalli pesanti a concentrazioni dell'ordine dei  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Questa tecnica analitica è molto diffusa anche per la determinazione di macroelementi come Ca, Mg, Na, K e Si a concentrazioni dell'ordine dei  $\text{mg L}^{-1}$ .

Per la determinazione del contenuto di S è stato applicato il metodo EPA 5050:1999 con bomba di Mahler e analisi in cromatografia ionica (laboratorio Next Genomics).

### 5.3.3 Estrazione e determinazione dei tioli non proteici

I tioli sono composti organici caratterizzati dalla presenza di un gruppo  $-\text{SH}$ , come ad esempio la cisteina e il GSH. La determinazione del contenuto di composti tiolici non proteici è basata sulla classica reazione con DTNB in ambiente sub-alcino ( $\text{pH} = 7-8$ ) previa deproteinizzazione degli estratti. Il tessuto fogliare era omogeneizzato con mortaio e pestello in una soluzione estraente utilizzata in rapporto 3:1 (ml:g pf) con il tessuto e composta da TCA 80 mM, EDTA 1 mM, acido ascorbico 0.15% (w/v) e PVPP 10% (w/v). L'omogenato ottenuto veniva filtrato su garza e centrifugato a 12000 rpm per 30 min. Il surnatante veniva recuperato e incubato in presenza di

tampone MES 50 mM (pH 5.8) per 10 min a 30 °C. Successivamente, venivano aggiunti DTNB 0.24 mM in tampone NaPi 20 mM (pH 7) e tampone TRIS 400 mM (pH 8). Il DTNB reagisce con i gruppi -SH presenti nell'estratto determinando la formazione di tiobenzato dianione, che presenta un picco di assorbimento a 415 nm. Quindi veniva misurata l'assorbanza di ogni campione alla lunghezza d'onda di 415 nm mediante uno spettrofotometro (Perkin-Elmer Lambda 3).

#### 5.3.4 Estrazione degli enzimi

L'estrazione degli enzimi era effettuata su campioni di tessuto fogliare, utilizzando un tampone di estrazione a pH 7.4, in rapporto 3:1 (ml:g pf) con il tessuto, e avente la seguente composizione: 50 mM HEPES-KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, glicerolo 10% (v/v), 0,1% (v / v) Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM PMSF e 1% (w / v) PVPP. I campioni erano polverizzati in un mortaio in presenza di N<sub>2</sub> liquido e quindi omogeneizzati con il tampone di estrazione. L'omogenato ottenuto veniva filtrato attraverso 4 strati di garza e centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti a 2 °C, il surnatante recuperato era centrifugato a 4000 rpm per 15 minuti a 2 °C. Il surnatante recuperato veniva rapidamente congelato in N<sub>2</sub> liquido e conservato a - 80 °C, fino al momento dell'utilizzo.

#### 5.3.5 Determinazione quantitativa delle proteine

Il contenuto di proteine degli estratti è stato determinato con il metodo Bradford (1976), che si basa sull'impiego di una sonda colorimetrica, il cromoforo Comassie Brilliant Blue G-250, di colore rosso ( $A_{\max} = 465$  nm) che ha una carica negativa con la quale si lega alle cariche positive delle proteine, variando la sua colorazione in blu ( $A_{\max} = 595$  nm).

Aliquote di estratto preparato come descritto nel paragrafo precedente erano diluite in acqua (H<sub>2</sub>O) deionizzata in un volume finale di 1 ml, a cui veniva addizionato 1 ml di Comassie Protein Assay Reagent, e venivano agitati. Di seguito era letta l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm.

La concentrazione delle proteine all'interno dei campioni analizzati è stata valutata confrontando il valore ottenuto dalle singole letture con i valori ottenuti utilizzando concentrazioni di proteina note, impiegando l'albumina di siero bovino (BSA) come standard.

#### 5.3.6 Determinazione dell'attività della O-acetilserina(tiol)lasi (OASTL)

L'enzima OASTL (E.C. 4.2.99.8) catalizza la reazione di sintesi della cisteina a partire dall'O-acetil-L-serina. L'attività dell'enzima viene determinata secondo il metodo colorimetrico descritto in Celletti *et al.* (2016).

Il saggio è stato effettuato su un volume finale di 100 µl, dove a 10 µl di estratto venivano aggiunti 60 µl di tampone di reazione costituito da Tris-HCl 167 mM (pH = 8) e DTT 16,7 mM, 10 µl di piridossifosfato 4 mM e OAS 250 mM. La reazione iniziava con l'aggiunta di Na<sub>2</sub>S 50 mM e veniva condotta a 30 °C per 10 minuti, al termine dei quali era bloccata aggiungendo il reagente di Gaitonde, costituito da 0,25 g di nidridina, 4 ml di HCl 12 N e 16 ml di acido acetico. I campioni successivamente venivano riscaldati a 100 °C per 10 minuti e riportati a temperatura ambiente. Ogni campione era diluito in 1 ml di etanolo, prima di effettuare le letture dell'assorbanza a 560 nm. I dati ottenuti venivano paragonati ad una retta di taratura ottenuta usando concentrazioni note di cisteina.

#### 5.3.7 Analisi statistica

Per le analisi biochimiche (contenuto di tioli e attività dell'OASTL), i dati riportati rappresentano la media di 5 esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

L'analisi multivariata (analisi dei componenti principali - PCA) è stata eseguita utilizzando il software statistico PAST (versione 3.25) per Microsoft Windows 10.

## 5.4 Risultati

### 5.4.1 Composizione elementare delle foglie (macro- e microelementi)

Le foglie raccolte dalle tre aziende campione mostravano una diversa capacità di accumulo dei nutrienti. In particolare, le foglie delle aziende agricole situate ad Alezio (SS) e Torchiarolo (MS) hanno mostrato un contenuto inferiore di rame, zinco, manganese e zolfo rispetto a quelle dell'azienda agricola di San Ligorio (oliveto senza sintomi, AS) (Tabella 5.1).

Particolarmente significative erano le differenze nei livelli di rame e manganese tra le foglie dell'oliveto SS, in cui gli alberi mostravano sintomi di disseccamento in stadio avanzato e diffusi su quasi tutti i rami e le branche, rispetto a quello AS.

Inoltre, i tessuti fogliari prelevati dagli appezzamenti MS e SS presentavano una concentrazione di rame inferiore a 4 ppm, quindi estremamente bassa anche in termini assoluti e al di sotto della soglia per la normale crescita degli olivi (Tittarelli *et al.*, 2002; Cantero, 1997). Lo stesso discorso vale anche per la concentrazione di zinco nei tessuti fogliari prelevati dall'oliveto MS: era inferiore a 10 ppm, soglia al di sotto della quale viene definita una carenza (Sanzani *et al.*, 2012) (fig. 5.1).

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi PCA (*Principal Component Analysis*) per evidenziare le differenze rilevate nel contenuto di macro- e micronutrienti.

La figura 5.2, relativa ai tessuti fogliari, mostra la separazione dei tre diversi appezzamenti in tre cluster: nel quadrante in alto a sinistra si osserva il gruppo di campioni relativo all'appezzamento MS, nel quadrante in basso a sinistra il gruppo relativo all'appezzamento SS, nei due quadranti a destra il gruppo relativo all'appezzamento AS. Le prime due componenti utilizzate per costruire lo "scatter plot" erano in grado di spiegare il 72% della varianza totale. La componente 1 (PC1, 47% della varianza) separava l'appezzamento AS dagli altri due (MS e SS), mentre la componente 2 (PC2, 25% della varianza) separava l'appezzamento MS da quello SS.

È interessante osservare che il gruppo AS differiva dal gruppo MS e SS sulla base della PC1 ed in particolare le variabili che contribuivano positivamente a questa separazione erano il contenuto di Zn, Mn e Cu (fig. 5.3), ma ancora più interessante è l'osservazione che a guidare negativamente la separazione tra il gruppo MS e SS sulla PC2 sia il contenuto di S, mentre l'influenza positiva più elevata era data dal Ca (fig. 5.4).

Tabella 5.1 Concentrazione di macro- e micronutrienti (espresso in mg/kg di peso secco) in foglie di olivo campionate a San Ligorio (AS), Torchiarolo (MS) e Alezio (SS). I dati riportati rappresentano la media di 5 esperimenti indipendenti condotti in triplicato ( $\pm$  la deviazione standard).

<b>Campo</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>Mg</b>	<b>Ca</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>
AS	1045.89 $\pm$ 592.94	746.13 $\pm$ 51.42	1.04 $\pm$ 0.05	14.68 $\pm$ 0.48	39.36 $\pm$ 1.70	145.22 $\pm$ 8.99	159.27 $\pm$ 1.66	17.07 $\pm$ 2.11
MS	696.95 $\pm$ 88.81	551.65 $\pm$ 66.46	0.93 $\pm$ 0.26	13.82 $\pm$ 1.96	22.87 $\pm$ 3.79	140.55 $\pm$ 18.03	3.42 $\pm$ 0.54	6.96 $\pm$ 0.76
SS	937.99 $\pm$ 113.69	613.36 $\pm$ 78.61	0.94 $\pm$ 0.04	12.83 $\pm$ 1.49	20.68 $\pm$ 4.75	113.43 $\pm$ 23.11	3.47 $\pm$ 0.25	11.11 $\pm$ 2.33

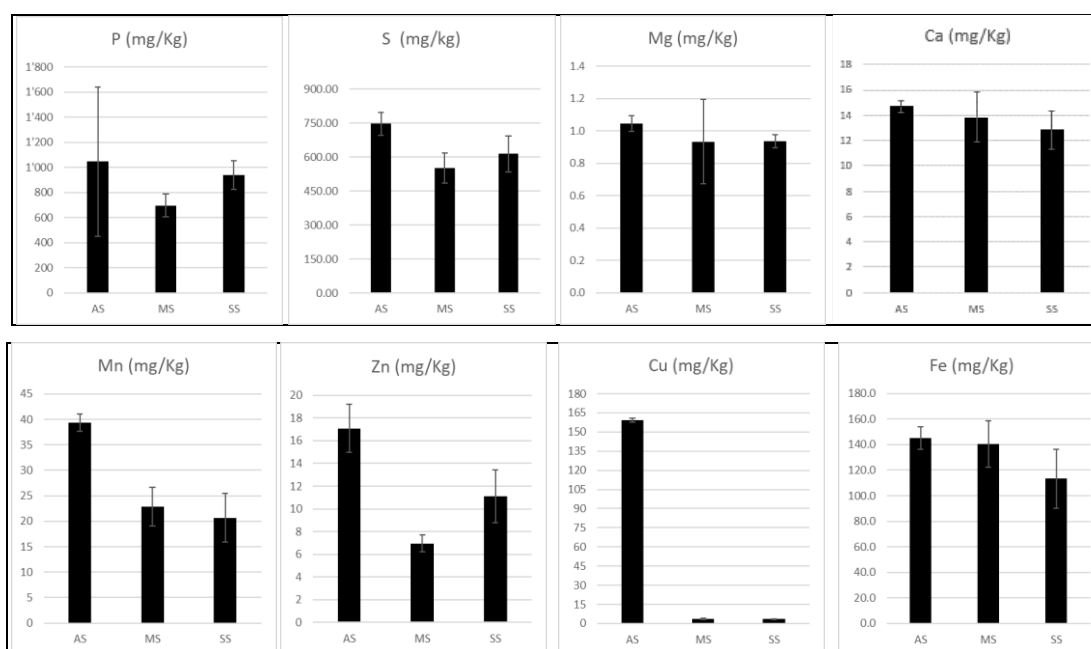


Figura 5.1 Concentrazione di macro e micronutrienti (mg/kg di peso secco) in foglie di olivo campionate a San Ligorio (AS), Torchiarolo (MS) e Alezio (SS). I dati riportati rappresentano la media di 5 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard.

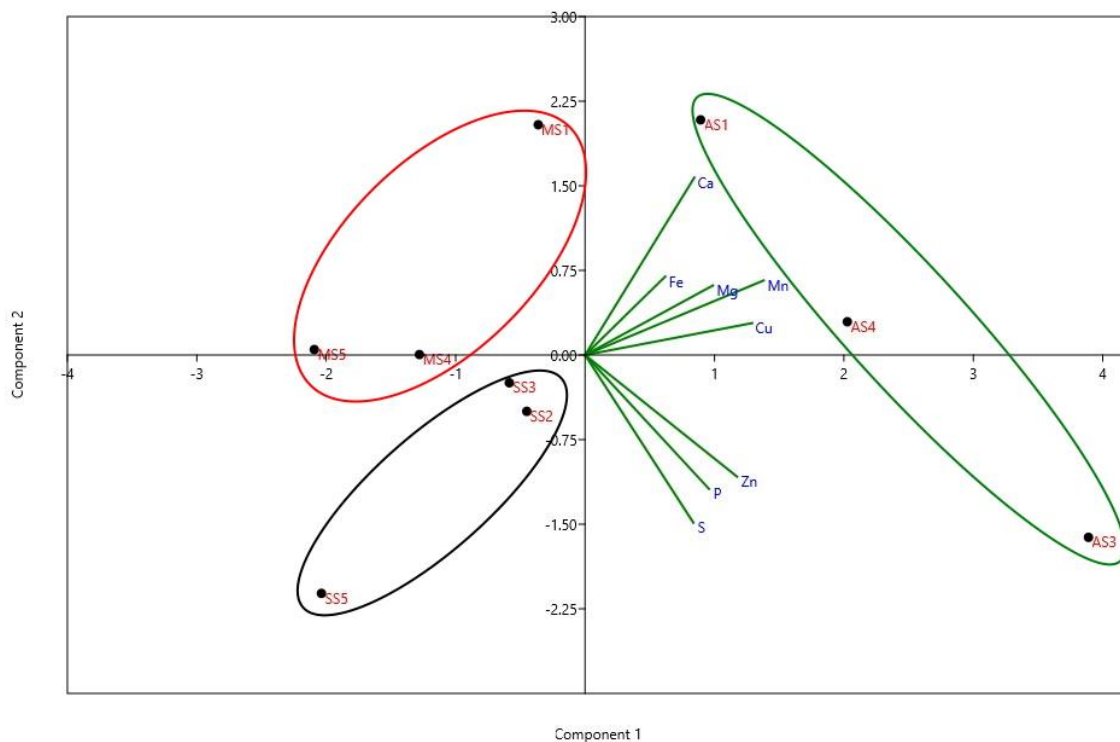


Figura 5.2 Analisi delle Componenti Principali per campioni di foglie raccolti da diversi siti nel Salento (Puglia meridionale). I due componenti principali hanno spiegato circa il 72% della varianza totale. AS = oliveto San Ligorio (asintomatico); MS = oliveto Torchiarolo (mediamente sintomatico); SS = oliveto Alezio (severamente sintomatico).

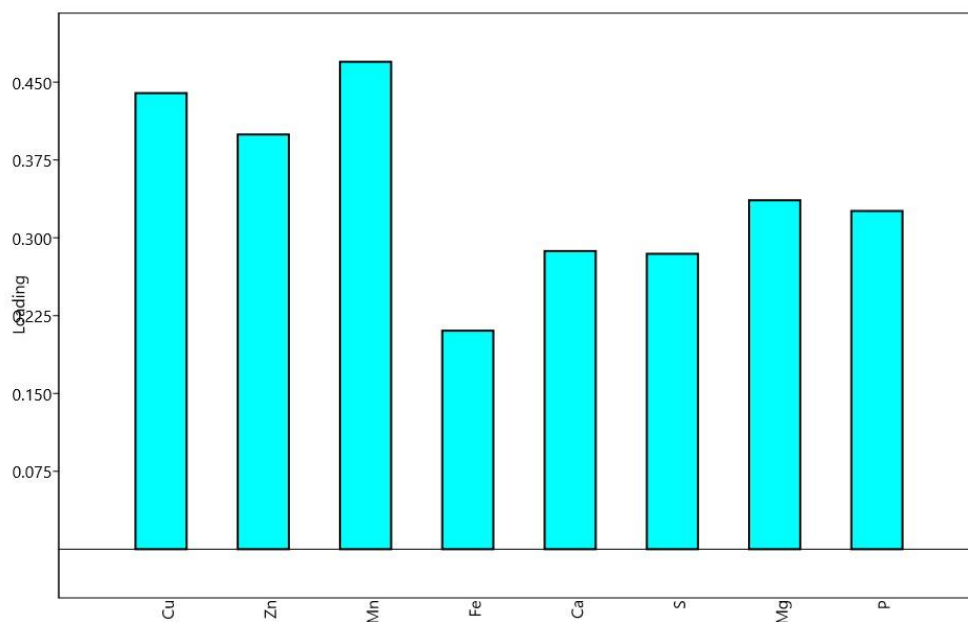


Fig. 5.3 Analisi delle Componenti Principali per campioni di foglie raccolti da diversi siti nel Salento (Puglia meridionale). Loading plot PC 1: il gruppo AS differisce dai gruppi MS e SS per il contenuto di Cu, Zn, e Mn.

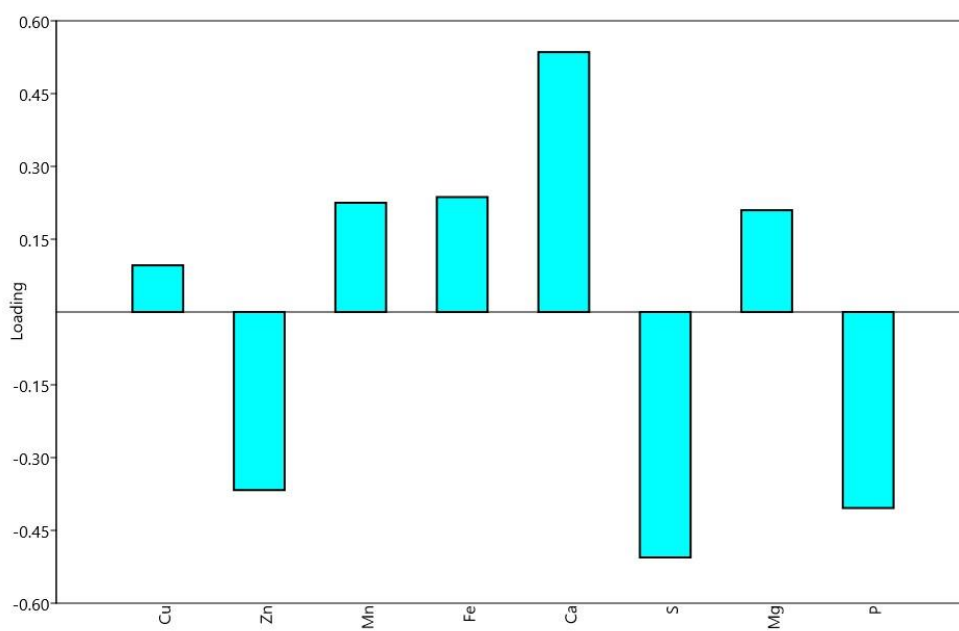


Fig. 5.4 Analisi delle Componenti Principali per campioni di foglie raccolti da diversi siti nel Salento (Puglia meridionale). Loading plot PC 2: la separazione tra il gruppo MS e il gruppo SS è guidata negativamente in particolare dal contenuto di S e l'influenza positiva più elevata è stata data da Ca.

#### 5.4.2 Contenuto di tioli nelle foglie

I tioli sono composti contenenti zolfo caratterizzati dalla presenza di un gruppo –SH, come ad esempio la cisteina e il GSH. Analizzando i dati ottenuti, si evince che le foglie delle piante prelevate dagli appezzamenti MS e SS, in cui gli olivi mostravano sintomi di “disseccamento rapido dell’olivo”, mostravano livelli più elevati (oltre il 70%) di composti tiolici, rispetto a quelle prelevate dall’appezzamento AS, l’oliveto senza sintomi (Figura 5.5).

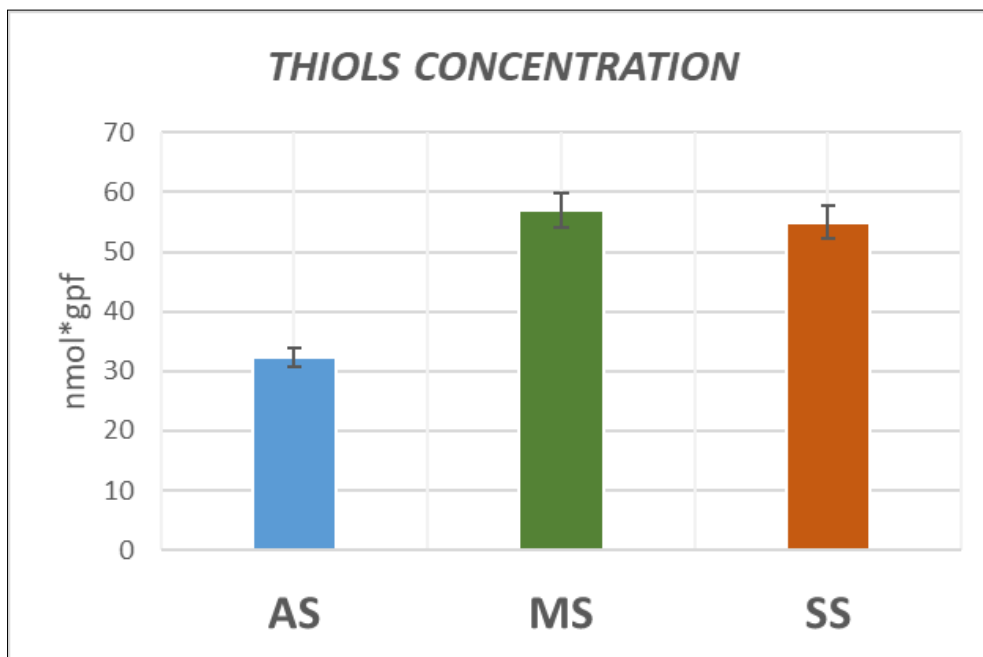


Figura 5.5 Contenuto di composti tiolici in foglie di olivo campionate a San Ligorio (AS), Torchiarolo (MS) e Alezio (SS) (n mol\*gpf). I dati riportati rappresentano la media di 5 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard.

#### 5.4.3 Attività dell’enzima OASTL nei tessuti fogliari

L’OASTL rappresenta l’ultimo enzima del processo di riduzione assimilativa del solfato e catalizza la reazione che porta alla formazione di cisteina.

Osservando i risultati riportati nella Figura 5.6 si evince che l’attività dell’enzima aumentava progressivamente passando dall’oliveto AS a quello SS. In particolare, i campioni prelevati dall’azienda SS presentavano una maggiore attività enzimatica nelle foglie, oltre il 40% rispetto a quelli di AS.

Inoltre, analizzando la concentrazione dei tioli a livello fogliare in relazione all’attività dell’OASTL si può osservare una correlazione lineare (Figura 5.7), secondo l’equazione:

$$y = 1577.6x - 1.7384 \quad (R^2 = 0.4546)$$

indicando che l’aumento dell’accumulo di tioli nelle foglie delle piante di olivo era associata all’incremento dell’attività dell’OASTL in modo lineare.

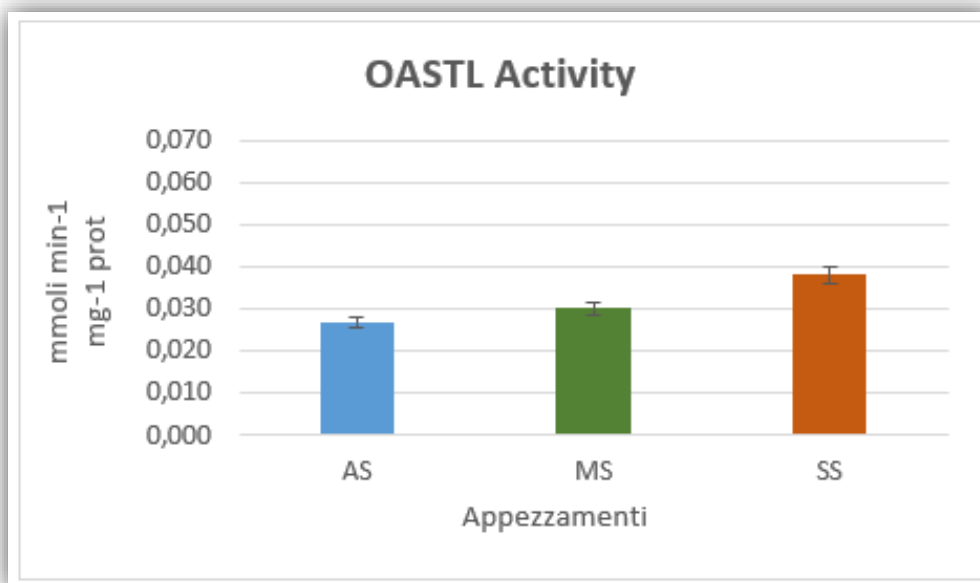


Figura 5.6 Attività dell'enzima OASTL in foglie di olivo campionate a San Ligorio (AS), Torchiarolo (MS) e Alezio (SS) (mmoli min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot). I dati riportati rappresentano la media di 5 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard.

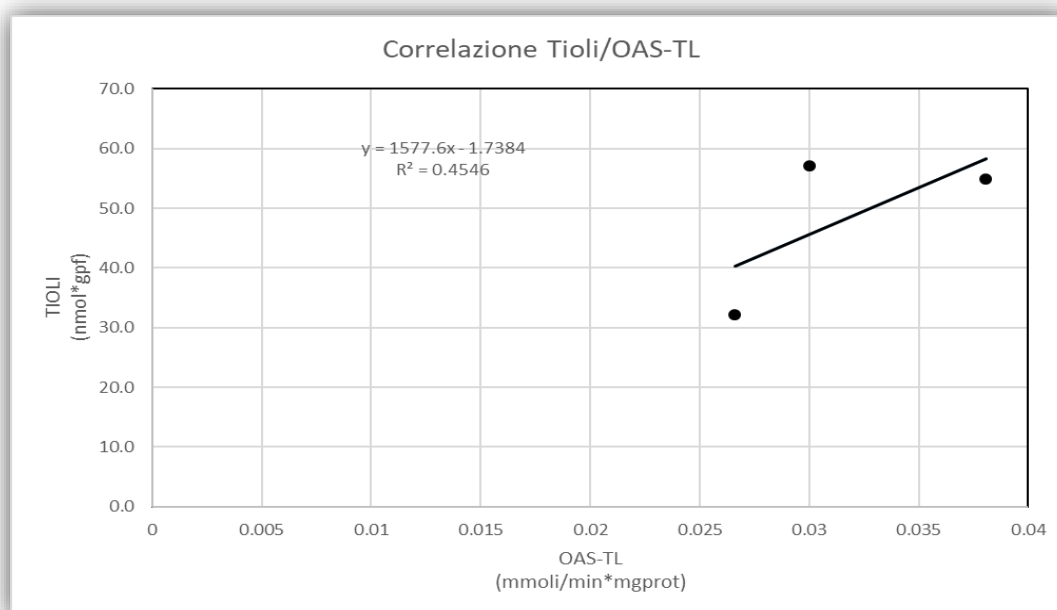


Figura 5.7 Correlazione Tioli / OASTL

## 5.5 Discussione

### 5.5.1 Analisi dello ionoma fogliare

Le piante sono oggetto di continui tentativi di attacco da parte di fattori di stress biotici come funghi, batteri, virus e fitofagi; tuttavia, la malattia è l'eccezione piuttosto che la regola, a causa della resistenza *host* e *non host*: per prosperare, l'attacco deve superare le diverse strategie di difesa che le piante schierano contro l'invasore (Thordal-Christensen, 2003). Perché la malattia si manifesti, è necessaria l'interazione di un ospite sensibile e un patogeno virulento. Ma un terzo fattore indispensabile per completare il cosiddetto triangolo patologico è un ambiente favorevole (Poschenrieder *et al.*, 2006). Clima, proprietà del suolo, competizione e attività umana sono tra i fattori ambientali più rilevanti che determinano l'intensità della malattia.

Cambiamenti nel clima e nelle disponibilità idriche possono determinare quelle condizioni di stress idrico che favoriscono lo sviluppo di *X. fastidiosa* (Choi *et al.*, 2013; McElrone, Seraldi and Forseth, 2003).

Inoltre, diversi studi indicano l'importanza della nutrizione minerale e in particolare del contenuto in micronutrienti per lo sviluppo della malattia, in quanto espressione del dialogo incrociato continuo durante la coevoluzione di piante, agenti patogeni e fitofagi, in competizione in un ambiente in cui l'acquisizione efficiente di nutrienti e l'omeostasi ionica sono essenziali per la sopravvivenza.

Tutti gli studi fin qui pubblicati sul tema, concordano con il fatto che i) i nutrienti sono fattori importanti non solo per la crescita e lo sviluppo delle piante, ma anche per la resistenza e il controllo delle malattie (Datnoff *et al.*, 2007) e ii) la differenza nella composizione minerale dei tessuti della pianta è presumibilmente dovuta, oltre che alle caratteristiche genetiche, anche alle pratiche agricole adottate dagli agricoltori (Gupta *et al.*, 2017).

Nel Salento il declino degli alberi di olivo è diffuso principalmente in tre province, anche se all'interno di queste aree la diffusione e la gravità dei sintomi progrediscono in modo eterogeneo. Nonostante gli sforzi da parte della comunità scientifica, la soluzione del problema appare ancora molto lontana, con drammatiche ripercussioni a livello economico, ambientale e sociale. Inoltre, nel contesto territoriale e storico in cui si sta sviluppando il disseccamento rapido degli olivi, nel quale sono ormai diventati evidenti i problemi creati dall'uso eccessivo e poco razionale di molti prodotti fitosanitari protratto per decenni, diventa particolarmente importante approfondire le relazioni tra stato di salute delle piante, nutrizione minerale, proprietà del suolo e gestione agronomica dell'oliveto.

La complessità del patosistema rende difficile la comprensione dettagliata dell'interazione ospite-vettore-patogeno e dei meccanismi di resistenza al patogeno stesso (D'attoma *et al.*, 2019). Il quadro è poi ulteriormente complicato dal fatto che sono stati riscontrati numerosi alberi positivi a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* che però non presentano i sintomi caratteristici determinati dal batterio (Scortichini & Cesari, 2019).

Recentemente sono state proposte alcune ipotesi che tentano di spiegare il fenomeno individuando nello stato nutrizionale degli alberi un fattore predisponente o meno nei confronti della malattia causata dall'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (D'attoma *et al.*, 2019; Scortichini *et al.*, 2019).

In questo lavoro di tesi è stato analizzato per la prima volta lo ionoma fogliare di alberi di olivo della stessa varietà coltivati in campi ricadenti nella "Zona Infetta" del Salento ad alta pressione di infezione di *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, ma che rispondono in modo diverso alla fitopatia del disseccamento rapido. Le tecniche di gestione agricola specifiche dei singoli campi indagati erano tra loro differenti (in particolare la potatura, la gestione del suolo, l'utilizzo di agrofarmaci e la fertilizzazione) e potrebbero aver influenzato le proprietà del suolo e di conseguenza lo stato fisiologico degli alberi e la composizione dello ionoma fogliare.

Si è ritenuto importante confrontare dati specifici dell'olivo e della stessa cultivar, perché ogni specie ed ogni varietà ha un suo peculiare profilo ionomico.

I risultati ottenuti hanno mostrato che gli alberi con estesi danni da “disseccamento rapido dell'olivo”, provenienti dai campi di osservazione MS e SS, presentavano una composizione elementare significativamente diversa rispetto a quelli provenienti dall'oliveto privo di sintomi (AS) utilizzato come controllo. In particolare, dall'analisi ionomica dei tessuti fogliari, sono emerse differenze significative relativamente agli elementi S, Mn, Cu e Zn non solo tra il campo asintomatico (AS) e i due campi sintomatici (MS e SS), ma anche tra i due campi sintomatici per quel che riguarda i livelli di P e Zn.

È interessante sottolineare che i tessuti fogliari prelevati dagli appezzamenti sintomatici MS e SS presentavano quantità molto basse di Cu, sotto i livelli minimi rilevati normalmente nell'olivo. La soglia che indica un basso contenuto di Cu nelle foglie di olivo varia a seconda di diversi autori: secondo Tittarelli *et al.* (2002) per gli oliveti italiani è compresa tra 20 e 36 ppm, mentre Cantero (1997) riporta valori da 6 a 10 ppm; nei campi MS e SS sono state riscontrate concentrazioni inferiori anche alla soglia minima. L'esaurimento del Cu nelle foglie è un fenomeno che si riscontra raramente nelle foglie di olivo e non sembra essere mai stato segnalato in precedenza in Italia (Sanzani *et al.*, 2012). Pertanto, la scarsa disponibilità di rame all'interno delle foglie di olivo è insolita e potrebbe essere correlata all'infezione.

Il rame è presente nei prodotti fitosanitari maggiormente impiegati per la difesa delle colture da avversità crittogamiche e batteriche. Il suo utilizzo, a dosi elevate per unità di superficie, in particolare su alcune specie, lo ha però portato sul “banco degli imputati” in qualità di metallo pesante che si accumula nel terreno, in cui può raggiungere concentrazioni di circa 70 ppm.

Il rame, a basse concentrazioni è un micronutriente essenziale per le piante, mentre, ad alte concentrazioni esercita un potenziale effetto tossico. Quando presente in concentrazioni elevate, infatti, le stesse proprietà redox che lo rendono essenziale, portano alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguenze dannose per le cellule (Hänsch & Mendel, 2009). Pertanto, questo elemento richiede un attento controllo omeostatico all'interno della pianta.

Il rame favorisce la sintesi della clorofilla e dei complessi proteici che agiscono durante la fotosintesi ed è inoltre un componente di molti enzimi, quali citocromo-ossidasi, coinvolti nella respirazione, e polifenolossidasi e diammina ossidasi, coinvolti nella sintesi della lignina, che conferisce resistenza e rigidità della parete cellulare: la lignificazione alterata delle pareti cellulari è un tipico cambiamento anatomico indotto dalla carenza di Cu nelle piante superiori; una diminuzione della lignificazione si verifica anche con una lieve carenza di Cu. La carenza di rame altera anche la struttura lipidica nelle membrane cellulari, che è essenziale per la resistenza allo stress biotico (Broadley *et al.*, 2011).

È stato dimostrato che diversi batteri e funghi fitopatogeni sottraggono il rame dall'ospite per aumentare la propria sopravvivenza e virulenza (Parisot *et al.*, 2002; Rolke *et al.*, 2004). Ad esempio, il batterio *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* rimuove il rame dallo xilema della pianta ospite e la ridotta concentrazione di questo elemento porta ad un aumento della sopravvivenza e della virulenza del patogeno (Yuan *et al.*, 2010), mentre *Erwinia amylovora*, agente del colpo di fuoco batterico, lega il rame attraverso gli esopolisaccaridi, diminuendone così la tossicità all'interno della pianta (Ordax *et al.*, 2010). Inoltre, alcuni studi hanno rilevato l'esistenza di una connessione tra la concentrazione di questo elemento nelle foglie di ibridi di *Vaccinium corymbosum* e la virulenza di *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (Oliver *et al.*, 2015).

La concentrazione di Cu nelle foglie di olivo può svolgere un ruolo importante proprio nell'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*: infatti, questo agente patogeno accumula rame durante il processo di formazione del biofilm, però, quando le concentrazioni di Cu sono superiori a 200  $\mu$ M, l'agente patogeno perde la capacità di formare biofilm a causa della tossicità rilevante esercitata dall'elemento (Cobine *et al.*, 2013).

In base a queste evidenze sembra quindi ragionevole supporre che la scarsa disponibilità di Cu all'interno delle foglie di olivo potrebbe favorire l'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*.

Anche il contenuto di Zinco (Zn) era particolarmente basso nelle foglie dei campi MS e SS, con una riduzione pari rispettivamente al 59% e al 35% rispetto a quelle prelevate da AS. Lo Zn, come il Cu, svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità delle biomembrane (Broadley *et al.*, 2011) e la sua carenza potrebbe portare ad un aumento del rilascio dalla membrana di composti a basso peso molecolare, che possono diventare un substrato di alimentazione adatto per i patogeni (Graham and Webb, 1991). In molte esperienze è stato verificato che lo zinco svolge un ruolo importante nella tolleranza alle malattie, riducendone gli effetti (*Oidium heveae* su *Hevea brasiliensis*, *Fusarium solani* su grano, *Rhizoctonia solani* su riso, ecc.) (Bolle-Jones and Hilton, 1956; Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2010; Prasad, Singh and Singh, 2010).

La concentrazione di Zn nelle foglie svolge un ruolo importante anche sull'aggressività di *X. fastidiosa*: la detossificazione da Zn infatti è necessaria al batterio per iniziare la colonizzazione del tessuto ospite e dosi di Zn superiori a 0,25 mM inibiscono la formazione di biofilm (Scortichini *et al.*, 2019).

Le foglie prelevate dagli alberi dei campi MS e SS avevano un contenuto di Manganese (Mn) che era rispettivamente il 58% e il 53% di quello rilevato nelle foglie degli alberi dell'appezzamento AS. Il manganese è un micronutriente essenziale per il metabolismo e lo sviluppo delle piante: circa 35 diversi enzimi lo utilizzano, tra cui fenilalanina-ammoniaca liasi (PAL), un enzima chiave nel metabolismo dei composti polifenolici come flavonoidi, fenilpropanoidi e lignina (Burnell, 1988). Una concentrazione elevata di Mn potrebbe consentire una maggiore produzione di lignina e flavonoidi per aiutare a proteggere l'ospite.

Il manganese è utile nel controllo di una serie di malattie patogene (Huber and Graham, 1999), anche dovute a funghi: le piante con una corretta alimentazione a base di Mn riducono la sintesi di aminopeptidasi, un enzima che mette a disposizione gli aminoacidi essenziali necessari per la crescita fungina e un enzima fungino, la pectina metilesterasi, che rompe le pareti delle cellule ospiti (Graham and Webb, 1991).

In un recente lavoro condotto considerando due oliveti della zona infetta in provincia di Lecce, è stata messa in evidenza l'importanza della composizione minerale nell'insorgenza di sintomi da "disseccamento rapido dell'olivo" (D'attoma *et al.*, 2019). In particolare, è stato ipotizzato che un elevato livello di Mn potrebbe controbilanciare in modo efficace il deficit innescato dall'infezione batterica (D'attoma *et al.*, 2019).

In conclusione, l'analisi dello ionoma ha mostrato sensibili differenze tra alberi sintomatici ed asintomatici. L'analisi statistica multivariata (PCA) ha confermato che i campioni raccolti nell'oliveto di San Ligorio rappresentavano un cluster omogeneo e, dispersi nella parte destra del grafico, avevano un maggior contenuto di Mn, Zn, S e soprattutto Cu. Al contrario, i campioni prelevati da entrambi i siti sintomatici, dove il disseccamento è molto evidente, presentavano quantità minori della maggior parte degli elementi misurati, ponendo una relazione significativa tra progressione dei sintomi della malattia e deficit nutrizionale.

Già negli anni '20 era stato evidenziato che la capacità delle piante di reagire ai patogeni è legata anche al loro stato nutrizionale: l'efficacia di un'alimentazione mirata nella protezione delle piante da parassiti e malattie determina la cosiddetta "resistenza indotta dai nutrienti" (Kawashima, 1927). Tuttavia, sebbene il significato dei singoli nutrienti per il mantenimento o la promozione della salute delle piante abbia suscitato un certo interesse negli anni '60 e '70, la ricerca nel campo dei meccanismi di resistenza indotti dai nutrienti stessi è stata scarsa a causa della sua complessità e della disponibilità di pesticidi efficaci contro gli organismi target (Bloem *et al.*, 2005).

Nel controllo delle malattie delle piante, uno dei metodi attualmente più avanzati, inizialmente proposto da Stern *et al.* (1959), è quello noto come Integrated Pest Management (IPM) ed è costituito da varie attività integrate finalizzate a ridurre l'impiego dei prodotti fitosanitari, che vengono

utilizzati solo se il monitoraggio indica che sono necessari. Adottare la strategia IPM significa, invece di perseguire semplicemente l'eliminazione del parassita, dare il giusto peso ai fattori ambientali ed ecologici che lo influenzano, con l'obiettivo di creare condizioni sfavorevoli al suo sviluppo. Il modo più efficace e duraturo per gestire i parassiti è utilizzare, con un approccio multidisciplinare, una combinazione di metodi che funzionano meglio insieme che separatamente (University of California Agriculture and Natural Resources, 2019).

In un'agricoltura sostenibile, per controllare i parassiti e le malattie, gli agricoltori hanno diverse opzioni che possono essere combinate in un approccio integrato di gestione; il tasso di sviluppo delle malattie può essere ridotto, tra l'altro, grazie ad una conoscenza adeguata della nutrizione minerale equilibrata. Un'adeguata disponibilità di micronutrienti è inoltre necessaria per la sintesi di metaboliti secondari con attività antibiotica ed è anche un fattore decisivo per lo sviluppo di microrganismi coinvolti nella protezione delle piante contro i patogeni (mutualismo protettivo) e dei batteri che promuovono la crescita delle piante (Poschenrieder *et al.* 2006).

Nel caso di *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, nonostante il gran numero di studi e ricerche, al momento mancano conoscenze dettagliate sull'interazione ospite-patogeno e sui meccanismi di resistenza al patogeno (D'attoma *et al.*, 2019), mentre è noto che le interazioni tra piante e agenti patogeni possono essere spostate per favorire le piante attraverso piccoli cambiamenti nell'ambiente, principalmente a carico della nutrizione delle piante (Ellingboe, 2001).

Fino ad oggi non è stata indicata alcuna terapia per risanare gli alberi colpiti da “disseccamento rapido dell'olivo” e contemporaneamente vari ricercatori e l'EFSA hanno affermato l'impraticabilità dell'eradicazione del patogeno (EFSA, 2015a): diventa pertanto ancora più urgente allargare la ricerca verso settori poco esplorati ma molto promettenti, che ci permettano di capire di più sulla malattia e sulle condizioni ambientali predisponenti la severità dei sintomi, al fine di dare indicazioni fin da subito agli agricoltori su possibili strategie di convivenza.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi sembrano indicare che il ripristino del contenuto di rame e zinco nei tessuti fogliari degli olivi, unito a una migliore fertilità del suolo, se eseguito per alcuni anni, potrebbe consentire la coesistenza con *X. fastidiosa* subsp. *pauca* negli oliveti dove le infezioni non hanno ancora notevolmente ridotto la vegetazione dell'albero. Il ripristino e l'eventuale mantenimento della fertilità del suolo contribuiscono, infatti, all'assorbimento di micronutrienti per gli olivi (Chatzistathis *et al.*, 2017).

### 5.5.2 Ruolo dello zolfo nello sviluppo della malattia

Le condizioni di stress sia biotici che abiotici determinano la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali il radicale superossido ( $O_2^-$ ) e il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), che richiede alle piante l'attivazione di un meccanismo rapido ed efficiente per gestire la loro omeostasi (Mittler, 2017). Tuttavia, le ROS svolgono un duplice ruolo a seconda della loro concentrazione nelle cellule vegetali: a bassi livelli, possono agire come agenti di segnalazione intracellulare, inducendo una risposta positiva nel sistema antiossidante, mentre ad alti livelli, tutte le forme di ROS diventano tossiche e in grado di interagire con tutti i tipi di molecole organiche, come acidi nucleici e lipidi (Sharma *et al.*, 2012; Foyer, 2018). Pertanto, lo stress ossidativo deriva da una sproporzione tra la produzione e l'eliminazione di ROS, essendo un fenomeno biochimico e fisiologico complesso (Mittler, 2017; Soares *et al.*, 2019).

Quindi, da un lato, il burst ossidativo può agire come un meccanismo battericida efficace nelle piante (Dröge, 2002), mentre dall'altra, un'eccessiva generazione di ROS può innescare una serie danni indotti dall'ossidazione a carico di importanti biomolecole, quali le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici, minacciando la vitalità cellulare (Sharma *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2018).

È infatti noto che la generazione di ROS in risposta all'attacco di patogeni microbici (raffica ossidativa) potrebbe anche essere funzionale per innescare un meccanismo volto alla fortificazione

della parete cellulare. L'accumulo locale di ROS è quindi una situazione speciale per la pianta, che da un lato sfrutta gli effetti antimicrobici diretti di ROS, dall'altro utilizza la sua funzione di segnale nella comunicazione cellula-cellula. L'aumento dei livelli di ROS attiva l'espressione genica di difesa come parte delle risposte protettive agli stimoli sia biotici che abiotici (Karpinski *et al.*, 1999; Grant and Loake, 2000; Foyer *et al.*, 2002; Foyer *et al.*, 2003; Op Den Camp *et al.*, 2003), ma d'altro canto la pianta deve garantire che il danno ossidativo resti confinato al sito di infezione: un sistema di "detossificazione" è pertanto di estrema importanza.

Al fine di mantenere l'omeostasi redox cellulare, le piante possiedono un potente e sfaccettato sistema antiossidante composto da meccanismi enzimatici e non enzimatici, che sono coinvolti nel rilevamento, disintossicazione, eliminazione e/o neutralizzazione della produzione eccessiva di ROS (Soares *et al.*, 2019).

Nell'ambito dei meccanismi non enzimatici, è noto che alcuni composti solforati, quali i tioli non proteici ed in particolare il glutatione (GSH), sono cruciali per la sopravvivenza delle piante durante lo stress biotico e abiotico in quanto coinvolti nei meccanismi di difesa contro gli stress ossidativi.

A questo proposito, vale la pena ricordare che questi metaboliti possono essere indotti dalla fertilizzazione con S, evidenza che ha permesso di sviluppare il concetto di *resistenza indotta dallo zolfo* (SIR *Sulfur-Induced Resistance*) delle colture contro parassiti e malattie (Schnug *et al.*, 1995). Il tripeptide glutatione (GSH) è un tiolo non proteico in grado di reagire chimicamente con  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$  e  $H_2O_2$ , funzionando come un efficiente scavenger di radicali (Sharma *et al.*, 2012). Il GSH funge anche da tampone cellulare, contribuendo al mantenimento dello stato ridotto di diversi componenti cellulari sia in condizioni normali che di stress (Foyer & Noctor, 2005). Inoltre, il GSH è necessario per la rigenerazione di un altro importante composto antiossidante, l'acido ascorbico o vitamina C, essendo il substrato per la deidroascorbato reduttasi (DHAR; EC 1.8.5.1).

Appare quindi ragionevole ipotizzare che l'esposizione delle piante all'infezione e allo sviluppo di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* possa determinare un aumento del fabbisogno di composti tiolici.

Infatti, i risultati che abbiamo ottenuto mostravano una maggior presenza di composti tiolici nei campioni provenienti dagli alberi degli appezzamenti sintomatici (MS e SS) rispetto a quelli dell'oliveto asintomatico. La minor quantità di tioli nei campioni AS potrebbe essere determinata da una minore concentrazione o attività di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* dovute a cause ancora da approfondire, ma che potrebbero essere direttamente o indirettamente in relazione con il miglior stato nutrizionale delle piante, in particolare con la maggior presenza di elementi quali Cu, Zn e Mn.

Gli incrementi nei livelli di composti tiolici richiedono, presumibilmente, un aumento della capacità della pianta di assimilare lo ione solfato e, per verificare questa ipotesi, abbiamo analizzato le variazioni nel metabolismo dello S a livello fogliare attraverso la determinazione dell'attività di un enzima coinvolto nell'assimilazione riduttiva dello zolfo, l'OASTL. Questo enzima catalizza l'ultima reazione di tale processo metabolico che porta alla sintesi della cisteina a partire dall'O-acetilserina e dal solfuro inorganico. Dalle analisi effettuate è stato possibile osservare che l'attività dell'OASTL, così come precedentemente osservato per l'accumulo dei composti tiolici, era più alta nelle piante degli appezzamenti MS ed SS.

Tali risultati indicano che l'esposizione delle piante all'infezione da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* determinava un incremento della velocità di assimilazione del solfato allo scopo di incrementare la sintesi di composti tiolici, necessari per reagire alla produzione di ROS e tale incremento era proporzionale all'entità del danno.

D'altra parte, le piante provenienti dall'oliveto asintomatico AS non mostravano questo tipo di risposta probabilmente a causa del fatto che il contenuto di zolfo totale (S) nei loro tessuti fogliari era significativamente maggiore rispetto a quello rilevato nelle foglie prelevate dagli altri due appezzamenti e quindi erano in grado di limitare i danni derivanti dalla condizione di stress ossidativo indotta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* senza ulteriori incrementi nella velocità di assimilazione del solfato.

Nel complesso i risultati supportano l'ipotesi che il metabolismo dello zolfo e l'accumulo di tioli aiutano a resistere allo stress ossidativo indotto da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ma i meccanismi di regolazione devono ancora essere caratterizzati in dettaglio.

## 6 Conclusioni

A tutt'oggi, il disseccamento rapido dell'olivo costituisce un quadro sintomatologico grave e complesso, per il quale non sono state ancora individuate strategie efficaci di controllo o di riduzione del danno arrecato agli oliveti. La considerazione da cui si è partiti è che la diversità del microbioma del suolo, le condizioni climatico-ambientali e lo stato nutrizionale delle piante, che incidono talvolta in modo molto significativo sull'espressione della malattia, costituiscono un aspetto rilevante su cui indagare, anche in considerazione del quadro sintomatologico collegato alla presenza di *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* su olivo.

Nello studio qui presentato sono stati posti a confronto oliveti con diverso grado di sintomatologia da "disseccamento rapido dell'olivo", attraverso un'indagine multidisciplinare che ha tenuto conto di analizzare l'ecologia del suolo rizosferico e lo stato nutrizionale delle piante.

Tra gli impianti oggetto di studio abbiamo ritenuto di verificare la sussistenza di differenze in riferimento agli indicatori individuati e valutare eventuali relazioni tra i parametri indagati e lo sviluppo della malattia.

Osserviamo che in due oliveti analizzati, i risultati sulla struttura della comunità batterica della rizosfera e su alcune attività microbiche mostrano differenze che potrebbero essere messe in relazione con la diversa incidenza della malattia.

Nel confronto fra tre aziende tutte ricadenti in zona infetta da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, differenze significative sono state registrate nella capacità di accumulo dei nutrienti: in particolare, le foglie provenienti dalle aziende agricole con maggiori sintomi da "disseccamento rapido dell'olivo" hanno mostrato un contenuto minore di rame, zinco, manganese e zolfo rispetto a quelle dell'oliveto asintomatico.

Inoltre, nelle foglie degli alberi sintomatici è stata riscontrata una maggiore attività dell'enzima OASTL, così come un maggior accumulo di composti tiolici: si è ipotizzato che questo possa dipendere dall'esposizione delle piante ad una maggiore attività del patogeno, che ha determinato un incremento della velocità di assimilazione del solfato e una produzione di metaboliti di difesa proporzionali all'entità del danno.

Analizzando precedenti esperienze riportate in letteratura, è emersa l'importanza del microbiota associato alle piante nella difesa dai patogeni, non solo a seguito di azioni dirette (antibiosi, competizione) ma anche indirette (induzione di resistenza). Per lo stato di salute complessivo degli olivi assume importanza anche una nutrizione equilibrata, in particolare per quanto riguarda gli oligoelementi minerali che, in adeguate concentrazioni all'interno delle foglie, sembrano favorire comportamenti resilienti nei confronti di *X. fastidiosa* subsp. *pauca*.

Gli elementi caratteristici e peculiari delle aree dove si è diffuso il disseccamento rapido dell'olivo rivelano un ambiente piuttosto fragile, dove uno o più fattori climatici e pedologici avversi potrebbero avere svolto un ruolo nell'aumentare la virulenza di *X. f.* subsp. *pauca*. Inoltre, alcune pratiche agronomiche che hanno impoverito la fertilità del suolo nel lungo periodo, è plausibile che abbiano ulteriormente peggiorato la situazione di fondo.

Relativamente a tale situazione, va aggiunto l'ulteriore stress determinato dai cambiamenti climatici in atto, che in un ambiente fragile come il Salento hanno un impatto particolarmente negativo: precipitazioni estremamente intense in autunno-inverno, siccità e gelo rendono più problematici che in passato gli attacchi di altri microrganismi fitopatogeni che, insieme a *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, hanno indebolito ulteriormente gli alberi.

Ad integrazione del quadro di contesto in cui si è sviluppata la ricerca, è necessario evidenziare che in gran parte dell'agroecosistema olivicolo salentino sono state abbandonate alcune pratiche colturali del passato che erano finalizzate alla cura delle piante; la gestione agronomica attuata in moltissime aziende sembra aver contribuito a creare condizioni favorevoli ai danni di parassiti e patogeni. Negli

ultimi decenni la maggior parte degli oliveti ha ricevuto solo cure di base, principalmente per mantenere la forma della chioma e raccogliere ciò che l'albero produceva, con poca attenzione al ripristino o al miglioramento della fertilità del suolo.

Confrontando gli oliveti della nostra indagine, sono state registrate una similarità di condizioni climatiche, pedologiche e di varietà di *Olea europaea* coltivata, mentre differenze sono state riscontrate nelle pratiche agricole adottate. In particolare, le diverse scelte colturali hanno riguardato la potatura, la concimazione fogliare, la gestione del suolo e delle infestanti, le tecniche di raccolta.

In analogia a quanto sperimentato in altri Paesi e come testimoniato dall'EFSA (2015), anche l'esperienza pugliese ha confermato che l'eradicazione di *X. fastidiosa* non possa avere successo in zone nelle quali l'organismo nocivo sia ampiamente insediato; è necessario, pertanto, individuare le possibili strategie di convivenza con il batterio, in una realtà come quella dell'olivicoltura salentina.

Al momento, se l'eliminazione del patogeno dalle singole piante appare impraticabile, va perseguito il tentativo di favorire un'adeguata biodiversità nel microbioma associato all'olivo, che sostenga l'equilibrio microbico, faciliti l'attivazione delle difese della pianta e, grazie alle interazioni che possono quindi operare in una comunità microbica sempre più complessa, riesca a spostare la relazione simbiotica di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* dal parassitismo al commensalismo.

Si rileva che per molti anni, a causa delle difficoltà legate alla biologia del patogeno, è stato ribadito il concetto che non fosse possibile alcun intervento. In effetti, a distanza di molto tempo, non è mai stata data alcuna indicazione per contrastare attivamente il declino degli alberi. Questo "assioma" ha indotto molti contadini ad abbandonare la coltivazione degli oliveti.

Altri patosistemi legati a batteri fitopatogeni sono stati affrontati in passato con strategie finalizzate alla riduzione del danno per salvare le colture ed il reddito degli agricoltori; contemporaneamente la ricerca faceva progressi per trovare rimedi più duraturi.

Ma in relazione a *X. f.* subsp. *pauca*, i primi studi sugli endofiti sono stati pubblicati nel 2020 e si è ancora a un approccio iniziale; per poter avere a disposizione strumenti biotecnologici, i tempi non sono compatibili con l'urgenza del problema, oltretutto con l'incognita delle reali possibilità di utilizzo anche da parte dei piccoli agricoltori, che rappresentano oltre il 90% delle aziende olivicole del Salento.

Oltretutto, la principale strada intrapresa, quella della sostituzione delle varietà autoctone con altre più tolleranti/resistenti e la conseguente radicale trasformazione degli oliveti tradizionali in impianti intensivi, sembra condurre al ridimensionamento drastico dell'olivicoltura pugliese, e con essa di quella italiana. In particolare, si rischia di cancellare del tutto da quel territorio l'agricoltura contadina, che è imperniata sulla coltura dell'olivo.

Ricordiamo che il declino degli olivi nel Salento è un problema estremamente serio, perché non attiene solo al settore agricolo, avendo importanti ricadute a livello economico più ampio, ma anche negli ambiti paesaggistico, ambientale, culturale.

È urgente, per tentare di salvare i milioni di alberi pluridecennali, secolari e millenari attualmente presenti e in vario grado danneggiati dal "disseccamento rapido dell'olivo", individuare azioni immediate che abbiano come obiettivo nel medio periodo di favorire la diversità e l'equilibrio microbico per tentare di ripristinare l'agroecosistema salentino fortemente compromesso.

È necessario fornire indicazioni sull'applicazione di pratiche colturali razionali e recuperare le aree attualmente abbandonate. Incrementare la sostanza organica del suolo; eseguire lavorazioni superficiali evitando quelle che disturbano il microbiota e accelerano invece la mineralizzazione spinta della materia organica (es. fresature); aumentare la biodiversità vegetale negli oliveti, anche attraverso la pratica della consociazione con essenze erbacee (inerbimento controllato e periodico sfalcio; sovescio); somministrare complessi microbici benefici; evitare l'utilizzo di erbicidi di sintesi:

sono pratiche che sostanziano un approccio agroecologico sostenibile nella gestione del suolo e nell'aumento della sua fertilità.

Bisognerebbe superare l'usanza della raccolta delle olive da terra, perché ad essa sono collegate una serie di operazioni colturali finalizzate alla preparazione del terreno, che hanno risvolti negativi sulle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del suolo.

Nell'immediato, appare importante garantire un appropriato apporto di microelementi tramite concimazioni fogliari per aumentare il contenuto nelle foglie in particolare di Cu, Zn, e Mn, che hanno dimostrato di ridurre la concentrazione di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e l'espressione dei sintomi di "disseccamento rapido dell'olivo".

La potatura di produzione deve essere eseguita regolarmente con tagli contenuti per mantenere quanto più possibile l'equilibrio tra le funzioni vegetative e riproduttive; evitare gli interventi cesori drastici, cosa che invece sta avvenendo negli ultimi anni in molti oliveti salentini, che provocano squilibrio fisiologico e indebolimento delle piante, esponendole ad ulteriori attacchi biotici.

Il presente studio non è esaustivo, non intende dare risposte definitive, bensì contribuire alla ricerca nella direzione di individuare soluzioni efficaci, durature e sostenibili da tutti i punti di vista (economico, ambientale, paesaggistico, socio-culturale) a questa problematica complessa.

Uno scopo di questo lavoro era di ampliare la ricerca sul legame tra la disponibilità di micronutrienti per le piante e l'insorgenza dei sintomi del declino; ad esso si affiancava l'esigenza di aprire un fronte di ricerca ancora piuttosto inesplorato sull'ecologia microbica della rizosfera, comparando oliveti con diverse situazioni sintomatologiche, nei quali si potessero confrontare anche le diverse gestioni colturali avendo come obiettivo la salvaguardia del microbiota del suolo.

I dati ottenuti sono originali, ed è auspicabile che possano esserne prodotti di nuovi mediante ampi studi multidisciplinari integrati per valutare le differenze tra gli olivi delle cultivar autoctone che permangono in buone condizioni e quelli che si ammalano; un approfondimento dal punto di vista dell'ecologia microbica, dello stato nutrizionale e dell'impatto delle diverse tecniche agronomiche potrebbe condurre a soluzioni efficaci, durature e sostenibili nel lungo periodo.

# APPENDICE 1

## L'ospite: l'olivo

### Descrizione della coltura

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una specie arborea da frutto sempreverde, diploide ( $2n = 2x = 46$ ), longevo e ad accrescimento lento (Angiolillo *et al.*, 1999; Reale *et al.*, 2006).

Originario della regione che va dal Caucaso (Iran) alla Mesopotamia e alla Palestina, nei trascorsi 5-6 millenni è stato diffuso in tutti i territori prospicienti il bacino del Mediterraneo. Nonostante una successiva diffusione anche in altri areali, attualmente il 95% della superficie olivetata mondiale è ubicata nei Paesi del Mediterraneo e in quelli immediatamente limitrofi. La restante parte è distribuita in aree tra il 30° e il 45° parallelo di latitudine nord e, in misura limitata, nella stessa fascia della latitudine sud.

È una specie dai caratteri xerofitici e viene coltivata in molte aree con ridotte precipitazioni e lunghi periodi di siccità estiva. Oltre l'85% degli oliveti sono coltivati in asciutta e meno del 15% fruiscono di irrigazione (per lo più di soccorso) (Lombardo, 2003).

Secondo stime di larga massima del COI (Consiglio Oleicolo Internazionale), circa il 30% degli oliveti nel mondo sono "moderni", cioè relativamente giovani, intensivi, condotti abbastanza razionalmente e forniscono circa il 50% della produzione totale; la percentuale maggiore di oliveti sono "tradizionali" (circa il 50%) e forniscono il 40% della produzione; il restante 20% sono da considerarsi "oliveti marginali", che forniscono il 10% della produzione globale e la cui sopravvivenza è motivata, più che dalle potenzialità economiche, dalla multifunzionalità: salvaguardia idrogeologica, valorizzazione paesaggistica, integrazione del reddito (Luchetti, 2002).

Nella classificazione botanica, l'olivo coltivato (*Olea europaea* L.) appartiene alla famiglia delle *Oleaceae*, al genere *Olea*, specie *europaea* e sottospecie *sativa*. Tra le oltre 600 specie appartenenti alla famiglia delle *Oleaceae*, l'olivo è l'unica che produce frutti commestibili.

Sebbene sulla classificazione botanica dell'olivo persistano pareri controversi, per la specie *O. europaea* la letteratura più comunemente accettata fa riferimento a due sottospecie: la prima, *O. europaea* subsp. *sativa* Loudon (= *communis*), di classificazione definitiva, e l'altra *O. europaea* subsp. *oleaster* Offm. *et* Link (= *sylvestris*), di classificazione più incerta (Barone & Di Marco, 2003).

La sottospecie *sativa*, cui appartengono gli olivi coltivati, riunisce i risultati di ibridazioni spontanee, di selezioni che esaltano l'attitudine produttiva della pianta, l'adattamento ad ambienti pedoclimatici diversi ed altri caratteri, nonché olivi che nel tempo sono stati conservati per via agamica.

Il termine *oleaster* è indicativo d'arbusti o alberi spontanei nella macchia mediterranea e specifici della fascia vegetazionale termofila indicata come *Oleo-Ceratonion* (Pignatti, 1982); presenta rami corti provvisti di spine nella fase giovanile e foglie piccole; la limitata fruttificazione è espressa da drupe piccole, generalmente rotonde e con nocciolo grosso.

Integrato nel paesaggio italiano, l'olivo si distingue dalle altre piante arboree da frutto per la capacità di occupare ambienti diversi, di produrre anche in condizioni limitanti per aridità e freddo e per essere da sempre pianta funzionale del sistema agricolo, che garantisce l'equilibrio tra ciò che l'uomo crea e ciò che è naturale.

Con 180 milioni di piante (ISMEA, 2004), l'olivo in Italia, pur con diversa importanza economica e sociale, è presente in quasi tutte le regioni, dove occupa areali diversi per caratteristiche pedoclimatiche. La superficie in produzione è di circa 1.143.232 ettari e la sua coltivazione è praticata in prevalenza al Mezzogiorno, dove sono in coltura 917.049 ettari (oltre l'80% del totale nazionale)

e dove si producono 21.461.171 quintali di olive, pari all'85% della produzione italiana. In Puglia sono coltivati ad olivo 380.500 ha e vengono raccolte 7.752.450 q di olive (circa il 30% del prodotto nazionale); nelle province salentine di Lecce e Brindisi sono investiti ad olivo 160.200 ha (per una produzione di 3.195.000 q) (ISTAT, 2020).

L'olivicoltura italiana si distingue da quella degli altri paesi mediterranei per la presenza di un enorme patrimonio genetico. In esso sono comprese varietà dalle molteplici caratteristiche biologiche e produttive, piante "migliorate" perché ottenute con interventi di ibridazione, di mutagenesi o da selezione clonale, e olivi secolari che sono presenti in gran numero negli impianti tradizionali e costituiscono una ricca riserva di biodiversità "autoctona".

Lo sviluppo della pianta, determinato dalle dimensioni delle branche e dei rami in lunghezza e in diametro e dall'abbondanza di vegetazione, descrive due caratteristiche: la vigoria e la densità della chioma. Queste proprietà naturali possono variare nel tempo perché sono determinate dagli interventi di potatura, dalle condizioni ambientali (nelle zone a clima poco favorevole per l'olivo la statura delle piante tende a ridursi) e dalle pratiche agronomiche (concimazioni, irrigazioni, ecc.).

L'olivo è una pianta arborea sempreverde di medio sviluppo (4-8 m di altezza) che però può raggiungere e superare, in dipendenza della cultivar, dell'ambiente e delle condizioni colturali, anche i 15 m di altezza e il diametro di 1,5-2 m.

Tipica è la crescita "contorta" dei tronchi, sempre avvolti in senso orario; le zone di legno vecchio si alterano con facilità, soprattutto negli areali piovosi o in carenza di corrette pratiche di potatura e pulizia, pertanto il tronco è soggetto a degenerazioni ed attacchi parassitari, tra cui i fenomeni di carie da patogeni fungini (*Fomes* spp., *Stereum* spp., *Polyporus* spp., ecc.).

L'olivo, lasciato libero di vegetare senza interventi cesori, tende spesso ad assumere un aspetto cespuglioso con una chioma formata da più fusti originati direttamente dal colletto. In tali condizioni il tronco, inteso quale asse principale, non è presente: sono le pratiche agronomiche che ne modificano il portamento, da cespuglioso ad arboreo.

Una caratteristica peculiare dell'olivo, che ne influenza la crescita e le pratiche agronomiche, è rappresentata dai ricchi complessi gemmari costituiti da gemme latenti e ammassi iperplastici di gemme avventizie (sferoblasti ed ovoli) ad elevato potenziale morfogenetico. Ad essi è legata la capacità di ricostituire, a seguito di decadimento del tronco principale, nuovi fusti e nuove radici con elevato grado di giovanilità (Barone & Di Marco, 2003).

Questa caratteristica specifica dell'olivo contribuisce a conferire a questa coltura una singolare capacità di rigenerazione dei tessuti e una longevità grazie alla quale possiamo oggi osservare esemplari con centinaia di anni di età e persino millenari.

## **L'olivo e le condizioni ambientali**

L'olivo è riuscito ad adattarsi perfettamente all'ambiente mediterraneo, caratterizzato da grandi variazioni pedologiche e climatiche ed ha trovato numerose e "diverse" condizioni nelle quali il suo prodotto ha inciso in modo importante sullo sviluppo della civiltà contadina.

I risultati produttivi, in termini di qualità e di quantità, dipendono da specifici processi fisiologici quali: efficienza della fotosintesi, trasformazioni biologiche (fioritura e sviluppo del frutto), fenomeni di assorbimento, trasporto e assimilazione degli elementi nutritivi. Tali processi sono determinati, a loro volta, dalle condizioni ambientali quali il regime termico, la disponibilità di luce e acqua, le caratteristiche chimiche, fisiche ed idrologiche del terreno (Franchini *et al.*, 2006).

### ***Temperatura***

In riferimento alla temperatura, i limiti termici per il suo sviluppo sono definiti tra i 46° di latitudine Nord e i 35° di latitudine Sud, comprendendo, quindi, sia territori delle regioni del Nord Italia, sia territori in Sudafrica ed Australia.

La temperatura esercita un'influenza decisiva sulla regolazione di numerosi processi fisiologici quali la traspirazione, la respirazione, la fotosintesi, l'attività enzimatica, la formazione e la degradazione dei diversi composti presenti nel frutto, la divisione e la distensione cellulare. La temperatura agisce, di conseguenza, sulla crescita vegetativa, sulla differenziazione morfologica dei vari organi della pianta (gemme, fiori), sull'allegagione e maturazione dei frutti e quindi, in sostanza, sulla capacità produttiva della pianta.

Quasi tutti i processi metabolici sono alterati con temperature lontane da valori medi inferiori a 5°C o superiori a 35°C. L'olivo, infatti, è sensibile ai freddi invernali e primaverili. La pianta subisce danni alle foglie quando la temperatura scende sotto i -5°C e le branche e l'intera chioma possono essere danneggiate severamente se la temperatura scende sotto i -10°C.

Gli effetti delle alte temperature si manifestano soprattutto in mancanza di un'adeguata disponibilità idrica e di una ridotta traspirazione. Queste causano l'innalzamento della temperatura superficiale dei vari organi e determinano ustioni a livello fogliare, sul tronco e sulle branche. In ambienti caratterizzati da temperature estive medie giornaliere superiori ai 30°C, lo sviluppo vegetativo della pianta avviene in primavera e in autunno mentre rallenta, fino a fermarsi, in estate (Franchini *et al.*, 2006).

### ***Disponibilità idrica***

Oltre il 90% dell'olivicoltura mondiale è situata in ambiente mediterraneo. L'olivo, che è una specie adattata al lungo periodo di siccità estiva tipico di questo clima, è in grado di sopravvivere anche con precipitazioni annuali di appena 200 mm, mentre mal sopporta l'asfissia radicale.

La capacità, cioè la quantità di acqua che i vari tessuti possono cedere dalle loro riserve al flusso traspirativo dell'olivo, è molto elevata e contribuisce così all'abbassamento del contenuto idrico e alla formazione di un elevato gradiente di potenziale tra foglie e radici. Tale gradiente permette alla pianta di assorbire acqua anche quando il potenziale del suolo raggiunge valori di -2,5 MPa (il punto di appassimento di molte specie arboree da frutto si verifica con un potenziale idrico di circa -1,5 MPa). Tuttavia, se nel periodo primaverile la nutrizione idrica è insufficiente, l'assorbimento dei nutrienti da parte delle radici è notevolmente ridotto, provocando un peggioramento della crescita vegetativa della pianta. Oltre al limitato accrescimento dei germogli, che compromette la produzione, l'anno seguente si osserva una riduzione della superficie della lamina fogliare (alternanza) con conseguente diminuzione nella produzione degli elaborati (Xiloyannis *et al.*, 1999).

## **Vento**

Anche il vento, per gli effetti che può esercitare direttamente o in modo indiretto sul metabolismo della pianta, è un fattore ambientale importante per la crescita vegetativa e per la produttività dell'olivo. Pur essendo molto limitate le informazioni sugli effetti provocati dal vento alla pianta, un'eccessiva ventosità estiva e autunnale crea disseccamenti dello stigma, eccessi di traspirazione e raggrinzimento delle drupe (Franchini *et al.*, 2006).

## **L'olivo e il suolo**

L'olivo è più tollerante, rispetto alla maggior parte dei fruttiferi, a carenze o eccessi di elementi nutritivi e a substrati pietrosi, aridi e poco fertili. I suoli sui quali cresce e produce generalmente sono meno profondi, più sciolti e con un'alta percentuale di componente litoide (pietrosità e scheletro) rispetto a quelli scelti per le altre colture (Costantini, 2006).

L'olivo ha un'attività radicale prolungata durante tutto l'anno e si adatta bene in terreni privi di strati impermeabili all'aria e all'acqua, ben strutturati e con tessitura tendenzialmente "franca". Queste caratteristiche, che conferiscono sufficiente permeabilità e alta capacità di ritenzione idrica, assicurano l'intensità di scambi gassosi necessaria per lo sviluppo delle radici (Costantini, 2006).

Il passaggio dell'aria nei pori del terreno assicura la respirazione delle radici e dei microrganismi del suolo. Questa situazione favorevole allo sviluppo delle radici può divenire pregiudiziale se i pori del terreno sono scarsi oppure occupati dall'acqua (asfissia radicale) (Costantini, 2006).

L'olivo è una specie sensibile all'asfissia radicale e la sensibilità varia secondo la cultivar (Navarro & Parra, 2001); la resistenza della pianta dipende anche dall'età: alberi giovani, caratterizzati da un accrescimento molto attivo, possono non sopravvivere anche dopo pochi giorni (3 - 4) di permanenza delle radici sott'acqua. Condizioni di terreno saturo d'acqua possono verificarsi in inverno o in primavera per le abbondanti piogge o nei terreni dove si concentra l'acqua di scorrimento superficiale (fondivalle, depressioni), che sono quindi inadatte per la coltivazione dell'olivo.

Una caratteristica del suolo che induce la saturazione di acqua è la presenza di un orizzonte sottosuperficiale scarsamente permeabile e caratterizzato da un insufficiente drenaggio interno. Nei periodi di pioggia intensa, l'acqua, non percolando negli orizzonti sottostanti, impedisce l'aerazione del terreno; il suolo rimane saturo anche molto tempo dopo che le piogge sono terminate. Dove l'aerazione è limitata le radici non si sviluppano e sono prodotte ed accumulate sostanze tossiche per la pianta (Costantini, 2006).

In particolare negli ultimi anni, si sono verificati prolungati ristagni di acqua piovana in primavera, a causa delle ingenti piogge (Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2011) e delle operazioni di rullatura del terreno propedeutiche alla raccolta delle olive cascolate, che determinano forte compattamento del suolo con mancato assorbimento dell'acqua meteorica.

## **L'olivo e i cambiamenti climatici**

L'utilizzo di modelli per prevedere la risposta alle condizioni climatiche previste per il prossimo futuro, ha evidenziato come l'olivo tenderà ad espandersi sempre più verso nord, raggiungendo le latitudini maggiori intorno alla fine del secolo (2100). Nei prossimi decenni il cambiamento delle condizioni climatiche, con aumenti di temperatura associati a prolungati periodi di aridità, potrebbe determinare variazioni senza precedenti nell'areale di coltivazione dell'olivo in tutto il bacino del Mediterraneo (Moriondo, 2018). Lo scenario attuale conferma le previsioni: stiamo assistendo a una graduale espansione dell'olivicoltura oltre il 45° parallelo.

La superficie totale investita a olivicoltura nel bacino del Mediterraneo è complessivamente aumentata di circa 60.000 ettari dal 2012 al 2017, ma il trend produttivo negli ultimi dieci anni segnala una graduale perdita di produzione con forte alternanza annuale dal 2014. Le cause sono molteplici: l'applicazione del disaccoppiamento nella politica agricola comunitaria e le forti oscillazioni che si riscontrano nei prezzi, specialmente sul mercato italiano, hanno sicuramente inciso sulle scelte dei produttori. Il cambiamento climatico potrebbe essere un'altra componente: numerose osservazioni pervenute dagli *stakeholders* in un workshop organizzato nell'ambito del progetto "Olive Miracle" (progetto di ricerca europeo sulle soluzioni modellistiche per le migliori strategie gestionali per l'olivicoltura contro i futuri cambiamenti climatici), hanno messo in evidenza un sostanziale impatto dell'andamento meteorologico sulla biologia della specie, in particolare sulla fenologia fiorale (Zelasco, 2018).

### **Le varietà di *Olea europaea* nel Salento**

La presenza dell'olivo nel Salento risale all'età del bronzo (Primavera *et al.*, 2017), e nei millenni successivi ha sempre rappresentato una componente fondamentale dell'agricoltura e del paesaggio locale.

La specie, introdotta in tempi remoti nella penisola salentina, ha trovato qui un habitat ideale e nei secoli si è adattata, dando origine a quella che ancora oggi viene definita "la foresta di olivi", in grado di trasformare profondamente il territorio.

Nella maggior parte dei casi, gli oliveti attualmente esistenti sono stati ottenuti innestando piante di olivo selvatico con marze di cultivar locali, ovvero Ogliarola salentina e Cellina di Nardò.

Come confermano le notizie storiche, la composizione varietale dell'olivicoltura salentina è rimasta, nei secoli, sostanzialmente invariata, pur essendo caratterizzata da un germoplasma molto ricco di biodiversità. Con il tempo, l'evolversi delle tecniche di coltivazione, le mutate utilizzazioni del prodotto e, soprattutto, l'azione di fenomeni naturali (agenti climatici, patogeni, ecc.) hanno inciso sul patrimonio varietale in modo "disordinato". Alcune varietà sono state progressivamente abbandonate fino a scomparire, sostituite da altre che meglio rispondevano agli obiettivi della coltivazione e/o erano più dotate di capacità di adattamento alle tecniche colturali sempre più avanzate (Bruno, 2012).

Attualmente nel Salento gli oliveti sono costituiti prevalentemente dalle due varietà autoctone per eccellenza: l'Ogliarola Salentina e la Cellina di Nardò. Nel passato, invece, come rilevato in letteratura, la composizione dell'oliveto era ricca di cultivar sia a drupa piccola sia a drupa grossa. Non è dato di conoscere con precisione l'incidenza di tali tipologie sul totale degli impianti, ma è da ritenere che queste ultime varietà dovessero assumere sicuramente un ruolo marginale, giacché sovente, erano classificate come varietà "minori" (Cimato *et al.*, 2001).

Il fatto che a distanza di secoli queste tipologie "minori" non abbiano trovato diffusione, testimonia l'elevata specificità del patrimonio varietale salentino. Alcuni genotipi con produzione di frutti a pezzatura elevata, importanti in passato, oggi sono limitati a singoli alberi, mentre genotipi a drupa piccola, riconducibili in ogni caso ai due principali ceppi autoctoni e probabilmente frutto di selezioni naturali, pur non essendo diffusi in modo strutturato, rappresentano un importante patrimonio genetico (Cimato *et al.*, 2001).

### **Descrizione delle cultivar**

Le informazioni sulle cultivar di olivo sono state attinte dai seguenti siti:

- <http://www.pianidisetto.it/flex/FixedPages/Common/RegistroVarietale.php/L/IT> (MIPAAF, ISMEA, INEA, 2020)
- [https://www.soihs.it/public/41/IL\\_GERMOPLASMA\\_26\\_settembre.pdf](https://www.soihs.it/public/41/IL_GERMOPLASMA_26_settembre.pdf) (Perri *et al.*, 2016)

### **OGLIAROLA SALENTINA**

È la cultivar pugliese più diffusa, risultando coltivata su una superficie dell'ordine di 130.000 ha. È diffusa su oltre 50.000 ha in provincia di Lecce, su oltre 40.000 ha in provincia di Brindisi, su circa 25.000 ha nel sud - est della provincia di Bari (chiamata in loco "Cima di Mola") e su oltre 10.000 ha in provincia di Taranto (denominata anche "Pizzuta"). La sua diffusione è in sensibile regresso.

Ha una produzione media cumulata al 5° anno di kg 66,90 e un rapporto polpa/nocciolo medio. Presenta inoliazione tardiva e scalare ma con elevato contenuto in olio. La cultivar ha un indice di autofertilità basso.

Punti di forza di tale cultivar sono la notevole rusticità, la precoce entrata in produzione, le elevate produzioni nelle annate di carica e l'elevato contenuto in olio. Gli aspetti negativi sono dati dal bassissimo peso delle drupe e dall'inoliazione scalare e tardiva che rendono problematica la programmazione e la meccanizzazione della raccolta. Inoltre le caratteristiche complessive dell'olio non ottimali già in epoca intermedia, si alterano significativamente col procedere della maturazione e soprattutto se la raccolta delle olive si effettua da terra (come purtroppo avviene ancora nella maggior parte dei casi). Tutto ciò giustifica la contrazione della sua diffusione.

Mostra scarsa suscettibilità all'Occhio di pavone e medio-alta alla Rogna dell'olivo.

L'albero ha una vigoria alta, portamento espanso e densità della chioma elevata.

### **CELLINA DI NARDÒ**

Diffusa nelle provincie di Lecce (oltre 35.000 ha), Taranto (oltre 15.000 ha) e Brindisi (circa 10.000 ha), per un totale di oltre 60.000 ettari. La sua diffusione sta diminuendo.

Le caratteristiche di tale cultivar sono il ridotto peso delle drupe che, abbinato alla scalarità della maturazione, rende poco efficiente la raccolta meccanica. Inoltre l'inoliazione tardiva spinge gli olivicoltori a raccogliere tardi a scapito della qualità dell'olio.

Gli aspetti positivi sono dati dalla rusticità, dall'adattamento all'ambiente, dalla precocità di entrata in produzione, dalle produzioni abbondanti e relativamente alternanti, dalle caratteristiche dell'olio, medie per la composizione chimica, buone per quelle organolettiche.

La suscettibilità alle avversità biotiche è bassa per l'Occhio di pavone e medio-alta per la Rogna.

L'albero ha una vigoria alta, portamento espanso e densità della chioma elevata.

### **LECCINO**

Ha una diffusione nei principali areali olivicoli italiani e mondiali. Nel Salento è una cultivar secondaria.

La selezione è autosterile e si avvantaggia dell'impollinazione incrociata con Frantoio, Pendolino e Moraiolo, cultivar non diffuse nel Salento. Ha elevata tolleranza al freddo, alla rognia, carie ed occhio di pavone, mentre nei confronti della mosca presenta una certa suscettibilità. Alla siccità presenta resistenza media. Predilige i terreni profondi, ha una buona capacità di adattamento a situazioni di media disponibilità idrica.

L'albero ha vigoria media, portamento pendulo, chioma da rada a densa secondo i cloni.

### **CIMA DI MELFI**

È una cultivar secondaria nel Salento, mediamente vigorosa, con caratteristiche vegeto-produttive tale da consigliarla per impianti intensivi e forme di allevamento a vaso e/o monocono su cui poter effettuare la raccolta meccanica e/o quella agevolata. Essendo autosterile necessita di opportuni impollinatori. Entra precocemente in produzione e si distingue per produzioni elevate e per lo più costanti nel tempo. L'epoca di raccolta è medio-tardiva e la resa in olio delle drupe è elevata.

Essendo utilizzata prevalentemente per l'oleificazione se ne consiglia la raccolta verso la fine di novembre, allorché l'invaiaitura è ancora su livelli medi. Le caratteristiche complessive degli oli possono ritenersi molto interessanti.

Buona resistenza a stress abiotici, suscettibile alla mosca, medio-alta a Rogna e bassa ad Occhio di pavone.

L'albero ha vigoria media, portamento espanso, densità della chioma media.

### **CAROLEA**

Il principale areale di diffusione è la Calabria. È presente nel Salento come cultivar secondaria.

Come tutte le varietà antiche e molto diffuse è costituita da una popolazione multiclonale con differenze significative sia fenotipiche che genetiche tra le diverse entità. Caratterizzata da vigoria media si presta molto bene alla raccolta meccanica delle drupe, con l'uso di scuotitori, e con rese variabili dall'80% al 95%. È autosterile quindi necessita d'opportuni impollinatori. L'invaiaitura è tardiva e scalare, l'inoliazione è precoce e concentrata, la resa in olio varia secondo l'epoca di raccolta.

Le produzioni sono abbondanti ma alternanti. L'epoca ottimale di raccolta varia dalla seconda metà d'ottobre a novembre, per le olive destinate all'estrazione dell'olio, anticipata di circa un mese per quelle da tavola.

Resistente al freddo e alla rogna, raramente è stata riscontrata affetta da verticillosi, mentre è molto sensibile al cicloconio, alla mosca e alla zeuzera.

Olio con caratteristiche organolettiche e sensoriali buone che nell'insieme indicano olii di buona qualità. La pianta è di media vigoria, tipicamente assurgente, con densità della chioma media.

### **NOCIARA**

Si riscontra in provincia di Brindisi, nel sud barese e in provincia di Taranto. La diffusione, attualmente modesta, è in espansione.

La cultivar è autosterile, con entrata in produzione precoce, inoliazione tardiva e scalare e contenuto in olio medio.

Caratteristiche di questa varietà sono la medio-bassa suscettibilità a Occhio di pavone e Rogna, la precocità di entrata in produzione, la produttività elevata e abbastanza costante, la qualità complessivamente buona dell'olio. Aspetto non positivo è l'inoliazione molto tardiva (non ancora ultimata nella prima metà di dicembre) per i riflessi sulla programmazione della raccolta. La pianta è di media vigoria, di portamento assurgente, con densità della chioma media.

### **PICHOLINE**

Cultivar secondaria nel Salento, di produttività e vigoria buona.

L'albero presenta vigoria media, portamento espanso e densità della chioma media

### **CORATINA**

Presente nella regione Puglia su oltre 70.000 ha, di cui per oltre 60.000 ha in provincia di Bari (Corato, Andria, Canosa, Molfetta, ecc.), circa 10.000 ha in provincia di Foggia e presenze significative nelle altre provincie. Si riscontra anche in altre regioni. La sua diffusione sta aumentando. È caratterizzata da parziale autosterilità, rapporto polpa/nocciolo elevato, invaiatura tardiva e scalare.

La Suscettibilità alle avversità è media verso Occhio di pavone e medio scarsa verso la Rogna.

L'albero ha vigoria media, portamento espanso, densità della chioma media.

L'olio ottenuto è di alta qualità quando ottenuto secondo i canoni della buona prassi di produzione in campo e in frantoio; in purezza presenta note amare e piccanti spiccate.

### *Caratteristiche delle cultivar più diffuse*

L'Ogliarola salentina e la Cellina di Nardò rappresentano ancora oggi la grandissima maggioranza delle cultivar, costituendo oltre il 90% degli impianti olivicoli salentini.

Oltre a oliveti coetanei e della stessa cultivar ottenuti per propagazione clonale e allevati con spazi regolari, sono molti gli appezzamenti dove coesistono alberi di età diverse e le due cultivar si mescolano. Inoltre è abbastanza frequente la presenza di alberi centenari, solitamente ottenuti per innesto di piante selvatiche della zona.

Gran parte degli oliveti sono tradizionali, risalendo come struttura a quelli del cinquecento/seicento, con un numero di alberi per ettaro che varia tra 80 e 120 (Cimato *et al.*, 2001); gli alberi sono allevati a vaso con tre o quattro branche principali, impalcati in genere ad altezze superiori al metro e mezzo. La chioma assume uno sviluppo considerevole e frequentemente supera gli 8 metri di altezza. La consociazione con altre specie arboree è frequente. In Puglia, secondo dati SIAN (2013), si concentra quasi il 40% di olivi secolari e monumentali sul totale nazionale (MIPAAF, 2015). Un patrimonio varietale così antico, che si è evoluto nel tempo attraverso la selezione antropica dei fenotipi più rispondenti e grazie all'incrocio con la sottospecie selvatica *O. europaea oleaster* (Fiorino, 1998), rappresenta un ricco serbatoio di biodiversità genetica.

Gli impianti più moderni, costituiti in genere con cultivar non autoctone, sono in aumento ma rappresentano una piccola percentuale rispetto agli oliveti tradizionali. Il 62% degli oliveti ha una densità d'impianto inferiore alle 200 piante per ettaro con sesti superiori a 7x7 m., solo il 9% ha sesti di 5x5 m o 6x6 m (Sardaro *et al.*, 2015).

Le due cultivar prevalenti producono un olio caratterizzato da un altissimo contenuto di polifenoli (Coco *et al.*, 2014), se allevato con tecniche di coltivazione e raccolta razionali. La loro produzione è regolamentata dalla Commissione Europea secondo le norme dell'Indicazione Geografica Protetta (IGP).

La loro diffusione così ampia è dovuta ad un processo di adattamento plurisecolare alle condizioni ambientali e alla resilienza mostrata nella storia nei confronti di stress biotici ed abiotici di varia natura.

In relazione all'attuale sindrome da disseccamento rapido, la risposta di queste cultivar mostra una manifestazione dei sintomi non omogenea sul territorio. La diffusione della malattia, caratterizzata nei primi anni da un andamento a macchia di leopardo, sebbene sia ormai generalizzata, ancora oggi evidenzia un pattern irregolare, una discontinuità anche tra oliveti confinanti (Scortichini, 2020a), come osservato ripetutamente anche dallo scrivente.

In particolare, la cultivar Cellina di Nardò, anche in test controllati ha mostrato reazioni fenotipiche diverse in base alle condizioni ambientali. In uno studio condotto dai ricercatori tra il 2014 e il 2015 per verificare, tra l'altro, la suscettibilità di alcune varietà di olivo a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, piante di Cellina di Nardò inoculate con una sospensione del patogeno e mantenute in serra in condizioni di temperatura e umidità controllate e costanti, nel corso del tempo hanno evidenziato infezione a livello sistemico e gravi sintomi da "disseccamento rapido dell'olivo" (Saponari *et al.*, 2017).

In un esperimento parallelo condotto nell'ambito dello stesso studio, piante della medesima varietà, anch'esse inoculate artificialmente con *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ma allevate in serra aperta a condizioni ambientali naturali, hanno dato risultati diversi. In queste piante la concentrazione batterica era significativamente inferiore rispetto a quelle dell'esperimento effettuato in condizioni controllate; delle piante esposte alle condizioni naturali, sette sono risultate positive al batterio nel punto di inoculo ma solo tre sono state poi infettate a livello sistemico nei 12 mesi successivi. In nessuna di queste il batterio è stato rilevato nella porzione apicale dei germogli e nelle radici. Alcune piante hanno rivelato sintomi di disseccamento fogliare all'inizio della primavera ma i sintomi non sono progrediti nel corso della stagione e sono rimasti confinati a poche foglie, mentre la nuova

vegetazione dei mesi successivi è rimasta asintomatica; la lentezza della colonizzazione batterica era associata alla mancanza di sintomi.

La spiegazione dei ricercatori per queste differenti risposte di piante della stessa cultivar, è stata che “le basse e alte temperature che si verificano nell'area in cui è stato eseguito l'esperimento hanno influenzato significativamente la progressione delle infezioni e la colonizzazione batterica delle giovani piante inoculate artificialmente”. L'effetto delle diverse condizioni ambientali era chiaro (Saponari *et al.*, 2017).

Un altro aspetto interessante emerso dai dati di questo studio e meritevole di approfondimento, è che le piante di Cellina di Nardò infettate e allevate nella serra aperta sono cresciute in altezza più delle piante sane.

Appare importante, alla luce di questi dati, allargare il campo della ricerca anche agli effetti delle condizioni ambientali sullo sviluppo della malattia nelle piante di queste cultivar, che caratterizzano la quasi totalità degli oliveti della zona infetta.

L'importanza e il valore dell'olivicoltura in questa zona non è quantificabile solo in termini economici e sociali, ma anche in relazione alla caratterizzazione del tipico paesaggio dell'area mediterranea. L'olivo nel Salento rappresenta un elemento tutto interno alla cultura delle comunità che abitano il territorio, le quali sul rapporto con questa pianta millenaria dai molti utilizzi hanno costruito struttura sociale, identità, valori e tradizioni. Il connubio di tutte queste caratteristiche contribuisce fortemente a fare del Salento un agroecosistema che mette insieme storia, paesaggio, commercio e tradizioni sociali legate dall'olivicoltura, che rappresenta quindi una risorsa notevole per l'intero territorio.

## **Principali avversità dell'olivo nel Salento**

Nell'ecosistema oliveto convivono circa 300 specie di parassiti, tra cui un centinaio tra funghi, batteri ed altri organismi dannosi. Ciononostante, esso può essere considerato, da un punto di vista fitosanitario, tra gli agroecosistemi più stabili, come dimostra la sua millenaria coltivazione nel bacino del Mediterraneo. Le cause di tale stabilità sono molteplici e molta attenzione deve essere rivolta al loro mantenimento (Iannotta *et al.*, 2012).

Tuttavia, specialmente in conseguenza di relativamente recenti interventi antropici (monocoltura, interventi chimici destabilizzanti, metodi di propagazione e operazioni colturali sanitariamente non corrette e altro) e di cambiamenti climatici, alcuni patogeni provocano malattie e danni tali da richiedere specifici interventi fitoiatrici, con la necessità di organizzare apposite strategie di difesa fitosanitaria (Iannotta *et al.*, 2012).

Le fitopatie dell'olivo sono dipendenti da agenti biotici, essenzialmente dipendenti dall'attività patogena di entità batteriche o fungine, molto più raramente virali, o da fattori abiotici, prevalentemente relativi a sfavorevoli condizioni climatiche, a gravi squilibri nutrizionali oppure a stress da inquinamento o scorretto utilizzo di agrofarmaci.

Contrariamente a molte altre specie legnose, in realtà l'olivo mostra una situazione fitopatologica relativamente semplice. Infatti, fra i patogeni una sola specie batterica (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) e 3 funghi (*Spilocaea oleagina*, *Verticillium dahliae*, *C. gloeosporioides* – *C. acutatum*) hanno in passato assunto incidenze e diffusioni tali da compromettere l'assetto vegetativo, la produzione o la stessa vitalità della pianta. Si segnalano, inoltre, altre malattie (marciume radicale, carie e fumaggine) dovute all'azione multipla di più agenti fungini appartenenti a generi diversi. Per quanto riguarda i virus, invece, sebbene isolati in cospicuo numero, non sono ancora del tutto definiti i danni che possono provocare sulla produzione.

In quanto alle singole malattie, notevole importanza riveste l'epidemiologia, per gli stretti legami esistenti tra la biologia del patogeno e le condizioni ambientali in cui vive l'ospite, oltre naturalmente ai rapporti ospite/parassita (Iannotta *et al.*, 2012).

L'ampia distribuzione dell'olivo e le numerose diversità morfologiche e microclimatiche presenti, unite alla diversità di cultivar, determinano una notevole variabilità nella diffusione e nell'incidenza del danno provocato dai parassiti (Franchini *et al.*, 2006).

Le malattie dell'olivo possono essere fortemente condizionate dai cambiamenti climatici in atto, che possono influenzarne incidenza e gravità. Inoltre, l'alterazione della distribuzione geografica dell'olivicoltura può modificare la distribuzione spaziale dei patogeni e favorire l'emergere di nuove problematiche fitosanitarie (Graniti *et al.*, 2011).

### ***Patogeni dell'olivo***

#### **ROGNA DELL'OLIVO**

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Smith)

Le infezioni di *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, in relazione all'entità dell'attacco e dell'organo vegetativo colpito, assumono importanza economica diversificata, non quantificabile poiché la pianta, pur debilitata, sopravvive all'aggressione del batterio.

La "rogna" o "tubercolosi" è diffusa in tutti gli areali di coltivazione dell'olivo; la principale fonte d'inoculo è rappresentata dalle stesse piante ospiti, i cui organi aerei ospitano il microrganismo. Inoltre, avendo quest'ultimo una fase epifitica sul filloplano, ne consegue che il materiale di propagazione dell'olivo rappresenta nel contempo sorgente di inoculo e mezzo di disseminazione.

Nel Salento la rogna dell'olivo ha interessato le cultivar presenti sin dall'antichità (Moschettini, 1790). *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, durante le sue fasi di colonizzazione e moltiplicazione può contribuire alla diminuzione complessiva delle sostanze di difesa delle piante. In effetti, è stata osservata una riduzione dei composti fenolici rilasciati dai vacuoli delle cellule vegetali dovuta all'attività enzimatica pectolitica ed emicellulolitica del patogeno (Buonaurio *et al.*, 2015).

#### **OCCHIO DI PAVONE O CICLOCONIO**

*Spilocaea oleagina* (Cast.)

È la più importante e diffusa malattia fungina dell'olivo e si manifesta in forme più o meno gravi in relazione alla suscettibilità varietale, alle condizioni vegetative delle piante e alle situazioni pedoclimatiche dell'oliveto. Infatti, le infezioni sono maggiori negli impianti ad alta densità e nelle zone vallive, a causa della maggiore persistenza di umidità.

I danni provocati dalle infezioni del fungo vanno valutati in relazione all'entità dell'attacco. La filloptosi è la manifestazione più eclatante della malattia, a cui possono conseguire gravi squilibri ormonali e nutrizionali che interferiscono con l'antogenesi, provocando deficit produttivi.

In molti casi e in diverse zone, notevole importanza nel contenimento della malattia rivestono gli aspetti agronomici: sistemi di conduzione ad ampio sesto di impianto e con potatura frequente determinano una scarsa incidenza di "occhio di pavone".



Fig.1.3 Rogna dell'olivo (*P. savastanoi* pv. *savastanoi*)



Fig.1.4 Occhio di pavone (*S. oleagina*)

## VERTICILLIOSI

*Verticillium dahliae* (Kleb.)

La verticilliosi dell'olivo è presente in molte regioni del Mediterraneo, ma recenti indagini hanno messo in evidenza la sua forte espansione in Italia (molto diffusa, oltre che in Calabria e Sicilia, anche in Salento).

Un'indagine nella regione Puglia ha rivelato che il 16% degli oliveti censiti era infestato da *V. dahliae* e, cosa più importante, l'agente patogeno è stato trovato nel 50% dei vivai di olivi analizzati (Nigro *et al.*, 2005).

Il deperimento da tracheovorticilliosi si manifesta con evoluzione cronica (meno grave) su piante adulte, ovvero con evoluzione acuta (sindrome apoplettica) più frequente nelle giovani piantine, dove, nei casi più gravi, possono determinare un esito infausto. Una terza forma d'infezione riguarda piante asintomatiche che si limitano ad ospitare il fungo nei vasi xilematici.

Tuttavia, gli alberi colpiti possono eventualmente superare la malattia come risultato della produzione di nuovi tessuti attorno a precedenti lesioni necrotiche, e i rami degli alberi colpiti, se recuperati possono raggiungere livelli di resa normali nelle stagioni di crescita successive (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011).

Questo fungo è molto diffuso oltre che sull'olivo, anche su numerose piante coltivate, arboree ed erbacee, in quanto è notevolmente polifago. Quando si pratica in consociazione all'oliveto la coltivazione di piante orticole fortemente suscettibili al fungo (pomodoro, patata, peperone, melanzana, ecc.), queste ultime costituiscono fonte d'infezione iniziale del terreno con conseguente passaggio nel tempo anche sulle piante di olivo.



Fig.1.5 a,b Verticilliosi (*V. dahliae*)

## LEBBRA O ANTRACNOSI

*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*

Questa malattia è abbastanza nota nelle aree olivicole sin dal 1900 e si riscontra essenzialmente nelle aree di coltivazione più meridionali (Puglia, Calabria e Sicilia). Le infezioni di questi funghi si verificano in modo differente nel corso degli anni, mostrando una regressione notevole per mutamenti climatici tendenti più al secco. Non mancano, comunque, annate in cui, per la presenza di piogge o di maggiore umidità nel periodo vegetativo, si registra un elevato grado di infezione e una diffusione su ampi territori olivicoli.

In Puglia tra la fine degli anni '50 e i primi anni '60 vennero segnalate per la prima volta gravi manifestazioni epidemiche in alcuni oliveti delle province di Lecce e di Brindisi. Dopo, la malattia sembrò quasi scomparire, in realtà era presente ma senza ritornare ai precedenti livelli di gravità. Dal 2005, in seguito a stagioni caratterizzate da elevata umidità e mitezza delle temperature, la malattia è riemersa, ma ampliando l'areale coinvolto.

La manifestazione sintomatologica risulta più evidente in areali di pianura e fondovalle dove l'umidità è presente in misura importante.

Il contenimento di questa malattia non è semplice, specialmente negli ambienti dove i fattori climatici (umidi e miti) e colturali (sesti ravvicinati con piante di grandi dimensioni che, talvolta, formano quasi dei boschi) determinano condizioni favorevoli allo sviluppo del patogeno e sfavorevoli all'attuazione delle pratiche di prevenzione e terapia. Perciò, negli areali dove il rischio infezione è alto sarebbe necessario attuare una strategia integrata nella quale si contempli in primo luogo la rimozione delle cause di sviluppo del patogeno (potature a turni brevi per consentire l'arieggiamento delle chiome e ridurre la massa di inoculo, disinfezione degli attrezzi, sesti ampi, impiego di cultivar a bassa suscettibilità, concimazioni equilibrate, misure atte a favorire la stabilità ambientale, possibilmente anticipare la raccolta) ed in ultimo il ricorso ad interventi fitoiatrici di lotta chimica.



Fig.1.6 Verticilliosi (*V. dahliae*)



Fig.1.7 Lebbra (*C. gloeosporioides*, *C. acutatum*)

## BRUSCA PARASSITARIA

*Stictis panizzei* (De Not.)

Questa malattia interessa essenzialmente le foglie determinando disseccamenti parziali di colore rosso mattone a margini sfumati che successivamente diventano bruno cenere limitati da bordi di colore marrone scuro.

La malattia si riscontra in quasi tutte le aree olivicole e si evidenzia nelle annate in cui si verificano elevate umidità ed alte temperature nel periodo autunnale. In ogni caso difficilmente interessa l'intero

oliveto, ma solo piccole aree e con attacchi di lieve entità. Il fungo penetra nelle foglie in autunno attraverso gli stomi e invade i tessuti fogliari in breve tempo.

Si tende, in alcuni casi, ad associare alla brusca parassitaria quella non parassitaria, i cui sintomi sono simili macroscopicamente, ma differiscono per alcuni aspetti. Nella brusca non parassitaria l'alterazione è determinata dall'azione dei venti asciutti, sciroccali, ecc.; inizia con disseccamenti dell'apice della foglia in corrispondenza del mucrone, dove vi è maggiore traspirazione per assenza della cuticola e prosegue sulla lamina fogliare, senza mai interessare le zone laterali delle foglie. Su tali aree disseccate non si manifesta alcun tipo di punteggiatura in quanto non vi sono elementi vegetativi.

## FUNGHI TRACHEOMICOTICI

*Phaeoacremonium spp.*, *Phaeomoniella spp.*

*Phaeoacremonium* e *Phaeomoniella* sono generi di funghi ascomiceti tracheomicotici cui appartengono specie che sono state isolate da un'ampia gamma di piante legnose, sia come semplici e innocui endofiti, sia come agenti patogeni associati a deperimenti, disseccamenti e morte dei vegetali.

Agli inizi degli anni '80, *P. parasiticum*, originariamente descritto come *Phialophora parasitica*, è stato indicato quale agente di gravi disseccamenti dell'olivo in Grecia.

A metà degli anni 2000, durante un'indagine sugli oliveti della Puglia, è stato notato un declino degli olivi: i sintomi consistevano in un declino generalizzato degli alberi che iniziava con l'imbrunimento fogliare e la caduta delle foglie, l'appassimento dei germogli apicali, la morte di ramoscelli e rami e striature brune sotto la corteccia del tronco, dei rami e dei ramoscelli. Negli stadi più avanzati della malattia, sulla corteccia sono stati osservati necrosi e cancro (Carlucci *et al.*, 2013). Furono isolati *Phaeoacremonium spp.*, *Pl. Richardsiae* e varie specie appartenenti alle *Botryosphaeriaceae*.

Successivamente in Puglia Nigro *et al.*, (2013) hanno isolato da tessuti sintomatici di olivo affetto da "disseccamento rapido dell'olivo": *Phaeomoniella spp.*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium alvesii*, *Phaeoacremonium parasiticum* e *Phaeoacremonium rubrigenum*.

È stata riscontrata in diversi casi la presenza di tali funghi nel legno dove si riscontrano i fori determinati dalle larve di *Zeuzera pyrina*. È stato ipotizzato che la presenza di tali funghi possa giocare un ruolo nello sviluppo dei sintomi da "disseccamento rapido dell'olivo".

Infatti si è ritenuto che questi, con il contributo di altri patogeni e fitofagi, contribuissero a determinare il disseccamento degli olivi insieme a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Martelli, 2013; Nigro *et al.*, 2013; Giunta Regionale Puglia, 2013). In seguito, *X. fastidiosa* subsp. *pauca* è stata riconosciuta quale agente eziologico principale della malattia; EFSA nel 2015 ha sottolineato l'importanza di comprendere il contributo dei diversi agenti che si sospetta siano coinvolti nella sindrome da declino rapido dell'olivo ed ha raccomandato un approfondimento della ricerca su questi e sulla gestione sostenibile di un sistema così complesso (Efsa, 2015).



**Fitofagi dell'olivo**

Come detto, l'oliveto è uno degli agroecosistemi più stabili: la mancata dannosità dei fitofagi spesso è da ricercare nel clima delle aree olivicole, nell'adattamento delle diverse cultivar e nella loro risposta alle infestazioni, nonché nell'elevata presenza di antagonisti naturali.

Nell'oliveto, inoltre, non si sono verificate introduzioni frequenti di fitofagi esotici e la maggioranza delle specie non raggiunge, di norma, densità di popolazione tali da determinare perdite economiche, in quanto controllate da fattori biotici e abiotici.

La fauna dell'agroecosistema è particolarmente complessa e differenziata in relazione alle diverse aree di coltivazione. Sono presenti numerose specie, in gran parte insetti, sia fitofaghe che entomofaghe (Rotundo & De Cristofaro, 2003).

Una peculiarità dell'olivo è la scarsa rilevanza fitosanitaria di afidi, acari, nematodi e la contenuta incidenza di malattie crittogamiche (Delrio, 1995).

Delle circa 50 specie di fitofagi più comuni, solo tre sono in grado di arrecare danni rilevanti alla produzione: *Bactrocera oleae* (Gmel.), *Prays oleae* (Bern.) e *Saissetia oleae* (Oliv.).

**MOSCA DELLE OLIVE**

*Bactrocera oleae* (Gmel.)

Nel bacino del Mediterraneo la specie si trova in tutte le aree in cui è coltivato l'olivo o dove è presente l'olivastro. Tuttavia la fenologia e la densità di popolazione del dittero variano sensibilmente da una zona all'altra in funzione delle condizioni macro e microclimatiche e delle caratteristiche agronomico-colturali. In generale, la fenologia della mosca appare differenziata secondo i gradienti climatici relativi alla latitudine e all'altitudine. Relativamente all'area di distribuzione, il ciclo biologico subisce un'interruzione in inverno al Nord, in inverno ed estate al Centro e solo in estate al Sud.

Relativamente alla produzione di olive da olio, possono essere distinti tre principali tipi di danno: distruzione diretta della polpa dovuta all'attività trofica delle larve, cascola delle drupe infestate, alterazione qualitativa delle olive e conseguentemente dell'olio.

L'esigenza di adottare misure di difesa è strettamente legata alle perdite dirette e indirette causate dall'attività del fitofago.

**TIGNOLA DELL'OLIVO**

*Prays oleae* (Bern.)

La tignola dell'olivo è un microlepidottero diffuso in tutto l'areale Circummediterraneo. Raramente raggiunge livelli di dannosità tali da giustificare il ricorso a interventi chimici

La reale dannosità è comunque valutabile solo dal superamento delle soglie di intervento.

L'entità dei danni arrecati da *P. oleae* presenta, nelle zone di diffusione, una variabilità molto ampia. Non esistono misure preventive in grado di controllare questo fitofago, pertanto, in caso di attacchi che superino le soglie d'intervento citate, si rende necessario il trattamento insetticida.

**COCCINIGLIA NERA O "MEZZO GRANO DI PEPE"**

*Saissetia oleae* (Oliv.)

La presenza di questa cocciniglia polifaga diffusa in tutte le aree olivicole mediterranee è molto temuta dagli agricoltori, tuttavia raramente causa gravi danni, poiché può facilmente trovare condizioni avverse al suo sviluppo.

L'adozione di semplici pratiche colturali come la realizzazione di potature annuali o biennali volte a equilibrare e ad arieggiare le chiome, il ricorso a concimazioni bilanciate e la presenza di numerosi antagonisti naturali sono sufficienti a limitare i danni del coccide. Nonostante questo, la modificazione anche temporanea di alcune variabili climatiche o colturali può favorire lo sviluppo di infestazioni localizzate anche di notevole intensità.

Le normali cure colturali rappresentano un importante criterio di prevenzione "ecologico". Infatti, le uova e le neanidi della cocciniglia sono sensibili alle alte temperature e al clima secco, pertanto, potando con regolarità gli olivi, si crea a livello della pianta un microclima sfavorevole all'insediamento dell'insetto.

Anche il ricorso a concimazioni bilanciate, evitando forti apporti di azoto, e un uso limitato e corretto dell'irrigazione rendono le piante meno soggette all'attacco dei coccidi in genere.

### **Avversità emergenti**

Il panorama fitosanitario dell'olivo, negli ultimi anni, in seguito alla siccità, al cambiamento nella quantità e distribuzione delle precipitazioni, all'aumento delle temperature, ha visto aumentare le segnalazioni di danni causati da funghi patogeni come la lebbra (*Colletotrichum gloeosporioides*) e da fitofagi secondari come la Cecidomia suggiscorza (*Resseliella oleisuga*) (Vizzarri, 2018).

Recentemente, in alberi del Salento colpiti dalla sindrome da disseccamento rapido, sono stati rinvenuti di frequente patogeni e parassiti secondari, quali: *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.), *Rosellinia necatrix* (Prill), *Zuzera pyrina* L., *Resseliella oleisuga* (Targ.-Tozz.), funghi responsabili della Carie del legno.

### **MARCIUMI RADICALI**

*Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.), *Rosellinia necatrix* (Prill.)

*Armillaria mellea* è un fungo basidiomicete responsabile di marciumi e carie del legno su numerose specie vegetali, piante arboree da frutto, piante spontanee arbustive, forestali e agrarie, ma anche macchia mediterranea. È un micete ubiquitario, capace di vivere come parassita, saprofita e persino in simbiosi micorrizica con le piante ospiti.

*Rosellinia necatrix* è un fungo ascomicete che, al pari di *A. mellea*, determina marciumi radicali (ma non carie) su numerose specie vegetali, piante arboree da frutto, arbustive, forestali e agrarie.

I sintomi dell'attacco di entrambi questi patogeni sono generalmente aspecifici e si estrinsecano in uno stato di debilitazione e di sofferenza generale, disseccamenti e infine morte della pianta ospite. L'andamento della malattia può essere cronico (prolungarsi per diversi anni) o acuto (improvviso/apoplettico).

Piante di olivo affette da marciumi al colletto e alle radici determinate da *R. necatrix* e *Armillaria* sp. sono state rivenute in provincia di Lecce in poderi affetti da "disseccamento rapido dell'olivo" (D'Amico *et al.*, 2018).

### **CARIE DEL LEGNO**

Agenti fungini vari (*Perenniporia spp.*, *Fomitiporia spp.*, *Agrocybe spp.*, *Trametes spp.*, *Fomes spp.*, *Stereum spp.*, *Polyporus spp.*, *Schizophyllum spp.* e altri)

La malattia è presente in tutti gli oliveti ed è particolarmente grave nelle zone dove si pratica la potatura di grossi rami o di intere branche. Viene compromessa la funzionalità dei vasi di trasporto della linfa grezza e della linfa elaborata: questo determina un arresto o una riduzione nell'alimentazione della chioma, che può andare incontro a defogliazione e disseccamento dei rami e delle branche.

La carie non determina sintomi specifici a carico delle foglie; invece, in concomitanza con fenomeni di tracheomicosi (verticilliosi), può favorire la comparsa di colpi apoplettici.

Al fine di prevenire lo sviluppo e la diffusione dei miceti agenti di carie, è molto importante eseguire, in primo luogo, le operazioni di potatura correttamente e, in secondo luogo, proteggere le superfici esposte e derivate dai grossi tagli con i mastici protettivi.

Le misure preventive, oltre a costituire fattori agronomici di buona coltivazione (concimazioni equilibrate, aerazione della chioma e degli strati superficiali del terreno in situazioni di eccessiva compattezza dello stesso, potature equilibrate, ecc.), concorrono a mantenere uno stato fisiologico della pianta ottimale e, di conseguenza, favoriscono la formazione delle resistenze naturali della pianta stessa nei confronti di agenti invasivi, quali quelli della carie (Ricciolini & Rizzo, 2010).

### **RODILEGNO GIALLO**

*Zeuzera pyrina* L.

È una specie polifaga presente in tutto il mondo; i suoi attacchi sono particolarmente gravi nei comprensori olivicoli del Mediterraneo orientale. Su olivo il ciclo biologico di *Z. pyrina* è in genere annuale a differenza di quanto avviene sugli altri ospiti, sui quali è biennale.

Questa specie può essere contenuta da vari insetti parassitoidi e da parassiti entomopatogeni (*Beauveria bassiana* e *Hirsutella thompsonii* var. *synematos*).



Fig.1.10 Rodilegno giallo  
(*Zeuzera pyrina*)



Fig.1.11 Cecidomia suggiscorza dell'Olivo  
(*Resseliella oleisuga*)

### **CECIDOMIA SUGGISCORZA**

*Resseliella oleisuga* (Targ.-Tozz.)

Le popolazioni di questo dittero cecidomide presente in tutti i Paesi olivicoli mediterranei rivestono in genere un'importanza marginale.

I danni maggiori si manifestano soprattutto su fusto e rami di olivo con meno di cinque anni di età, che presentano ferite da cause varie. La vegetazione soprastante le zone attaccate può seccarsi del tutto o in parte, a seconda che la necrosi provocata dalla larva abbracci per intero o parzialmente la circonferenza del fusto o dei rami compromettendo l'accrescimento della pianta. I tessuti così alterati vengono spesso colonizzati da organismi secondari.

Negli ultimi anni si è manifestato un significativo ed inaspettato incremento delle infestazioni di questo fitofago in Puglia (Laccone & Porcelli, 2014). Larve di suggiscorza sono state rivenute in alberi di olivo con sintomatologia riferibile al disseccamento rapido (osservazioni personali).

Che l'oliveto possa essere considerato, da un punto di vista fitosanitario, tra gli agroecosistemi più stabili, è dimostrato dall'incredibile longevità degli alberi e dalla loro millenaria coltivazione nel

bacino del Mediterraneo (Iannotta *et al.*, 2012). La principale causa di tale stabilità è l'elevata adattabilità della specie dovuta alla variabilità genetica legata al gran numero di cultivar esistenti, alle modificazioni del genotipo fissate per via vegetativa e alle fluttuazioni nell'espressione dei caratteri varietali nei diversi ambienti. A ciò si aggiunge la capacità di risposta dell'albero alle infestazioni dei fitofagi, il clima delle aree di coltivazione, nonché l'elevata presenza di antagonisti naturali. Tali peculiarità rappresentano una risorsa endogena preziosa per gli olivicoltori, quindi molta attenzione deve essere rivolta al loro mantenimento.

La coltura dell'olivo, presente nel Salento da circa 4000 anni, ha subito nel corso del tempo diverse e gravi avversità. Verso la fine del Settecento e all'inizio del Novecento, alterazioni della chioma hanno causato ingenti danni agli alberi coltivati principalmente nella parte occidentale della Penisola Salentina. La bruciatura fogliare (o "brusca") osservata nel Salento era stata causata da un disturbo nell'approvvigionamento idrico degli olivi, la cui causa può essere di origine abiotica ("brusca non parassitaria"), dovuta a insufficiente umidità nel terreno, radici danneggiate, carenza di nutrienti, a venti caldi, secchi o salmastri, oppure di origine biotica ("brusca parassitaria") determinata da deboli patogeni fungini come lo *Stictis panizzei* (De Not.) o da altri funghi o batteri invasori dello xilema che ostruiscono i vasi conduttori dell'acqua (Frisullo *et al.*, 2014). Tuttavia, l'agroecosistema olivicolo attaccato ha espresso la propria capacità di resilienza ed è tornato, in entrambi i periodi, alla sua precedente integrità.

Altre problematiche fitopatologiche di rilievo nel Salento a carico dell'olivo erano state segnalate nel 2006 dalle autorità fitosanitarie della regione Puglia, consistenti in disseccamenti sugli alberi, successivamente attribuiti a "Lebbra delle Olive" (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*). Le cause scatenanti la malattia furono ricondotte a mutamenti macro e micro climatici ed a condizioni agronomico-colturali; vennero quindi attivati campi sperimentali e infine definite strategie di controllo sotto forma soprattutto di misure agronomiche (Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2011).

## APPENDICE 2

### L'ambiente nel Salento

L'ambiente delle colture agrarie può dirsi la risultante del clima (macro-, micro- e clima delle colture), del suolo, della disponibilità idrica e della qualità delle acque, delle piante stesse con il microbioma ad esse associato e dell'insieme delle pratiche colturali.

Vengono di seguito esaminate alcune caratteristiche generali dell'ambiente di coltivazione dell'Olivio nel Salento, con riferimento al clima, alle acque e al suolo.

#### Il clima

L'olivo è una delle specie arboree più importanti nel bacino del Mediterraneo, la cui coltivazione è fortemente condizionata dal clima; molte evidenze scientifiche derivanti dalla letteratura, da indagini archeo-botaniche e dall'analisi dei pollini fossili, hanno indicato come l'espansione e la riduzione mostrate dalle aree olivicole nel corso degli ultimi due millenni siano dipese principalmente da variazioni delle condizioni climatiche prevalentemente associate a livelli di temperatura (più calde o più fredde). L'utilizzo di diversi modelli per analizzare le risposte alle condizioni climatiche previste per il prossimo futuro, ha evidenziato come l'olivo tenderà ad espandersi sempre più verso nord, raggiungendo le latitudini maggiori intorno alla fine del secolo (2100) (Moriondo, 2018).

A livello globale si è evidenziato che:

- a) la presenza della specie di olivo può essere considerata come uno dei migliori indicatori del clima Mediterraneo, mentre la sua area di coltivazione può essere utilizzata come bioindicatore in relazione ai futuri cambiamenti climatici in tutto il bacino;
- b) nei prossimi decenni il cambiamento delle condizioni climatiche, con aumenti di temperatura associati a prolungati periodi di aridità, potrebbe determinare variazioni senza precedenti nell'areale di coltivazione dell'olivo in tutto il bacino del Mediterraneo (Moriondo, 2018).

#### *Generalità sul clima del Salento*

La Puglia, dal punto di vista climatico, è compresa in un'ampia area del bacino del Mediterraneo sud-orientale che include la Sicilia e la Sardegna, la penisola italiana a sud della linea Roma-Ravenna, la Grecia, parte dell'Anatolia, il Libano, le coste palestinesi e le regioni più settentrionali dell'Africa. Tutta quest'area è caratterizzata da un regime di precipitazioni invernali e di aridità estiva, a volte spinta (Zito *et al.*, 1991).

La penisola salentina, per la sua posizione geografica compresa tra il mar Jonio e quello Adriatico, per la sua ampiezza limitata, per il suo enorme sviluppo costiero e per l'assenza di veri e propri rilievi montuosi, ad eccezione del limitato e basso sistema collinare delle Serre, è caratterizzata da un particolare clima notevolmente differenziato rispetto al clima regionale (Macchia, 1984).

Il clima del Salento è di tipo termomediterraneo, caratterizzato da estati calde e poco piovose ed inverni non eccessivamente freddi e mediamente piovosi, con abbondanza di precipitazioni durante la stagione autunnale.

Le estati sono calde, con temperature medie estive comprese fra i 25°C ed i 30°C e punte di oltre 40°C nelle giornate più calde. Sul versante ionico, durante il periodo estivo, si possono raggiungere temperature particolarmente elevate, anche superiori a 30 - 35°C per lungo tempo. Gli inverni sono relativamente temperati e la temperatura scende di rado sotto lo 0°C (Cotecchia, 2017).

Un clima particolarmente mite è reso evidente lungo il lato ionico della penisola dalle isoterme di gennaio, le quali circoscrivono un'area climatica che si svolge parallelamente alla costa, compresa

tra 9,5 °C e 9,0 °C. Questo enorme apporto termico del versante ionico nei mesi freddi raggiunge quasi l'opposto lato adriatico (poco influente nella determinazione del carattere termico invernale), delimitando così un'ampia area omogenea, tra 8,5 °C e 9,0 °C, comprendente la pianura di Brindisi e di Lecce.

L'effetto del lato ionico è evidente anche dall'andamento della temperatura media del mese più caldo (luglio). Le isoterme comprese tra 26,5 °C e 25,0 °C, anche in questo caso, penetrano nell'entroterra occupando così la maggior parte della penisola salentina. L'effetto è amplificato se in concomitanza di vento caldo da sud-est (scirocco), uno dei venti prevalenti sul versante ionico del Salento. Nel versante adriatico, invece, le isoterme di luglio sono molto più attenuate, essendo comprese tra 23,0 °C e 25,0 °C (Carlino, 2010).

Le isoterme annue sono comprese tra 17,0 °C e 16,0 °C, con un valore massimo di 17,5 °C nei pressi di Gallipoli ed un valore minimo di 16,0 °C, registrato sul versante adriatico, nella zona che va da Otranto al Capo di Leuca.

### ***Le precipitazioni piovose nel Salento***

I dati pluviometrici rilevano precipitazioni particolarmente abbondanti verso il Salento meridionale, con valori massimi superiori a 850 mm annui soprattutto in corrispondenza delle Serre orientali. Procedendo verso i limiti settentrionali del Salento, le isoiete diminuiscono raggiungendo valori di poco inferiori a 650 mm nella pianura messapica. Il settore ionico, al contrario, presenta i valori pluviometrici annui più bassi, con l'isoieta di 600 mm a Nord di Gallipoli.

La conferma di queste due fasce pluviometriche sugli opposti versanti, jonico ed adriatico, è data dal numero medio annuo dei giorni piovosi che risulta essere minore lungo la costa occidentale della penisola salentina (59 gg piovosi nella stazione di Gallipoli) (Carlino, 2010).

In linea generale nella penisola salentina le precipitazioni hanno un comportamento stagionale anomalo. E' possibile rilevare, infatti, un solo valore massimo, molto elevato, durante l'inverno e una quasi assenza di pioggia durante l'estate che determina un'accentuata aridità (Zito *et al.*, 1991). In estate è possibile che si verifichino rari eventi di pioggia intensa molto concentrati, ma di breve durata.

Questo clima fa sì che alla ricarica degli acquiferi contribuiscano significativamente solo le precipitazioni del tardo periodo autunnale e quelle invernali. Le precipitazioni del primo autunno e quelle estive, infatti, contribuiscono a ricostituire il contenuto d'acqua solo negli strati più superficiali; quelle estive, inoltre, vanno perse in modo significativo anche per evapotraspirazione. Per quanto riguarda le precipitazioni, la penisola salentina risente fortemente delle perturbazioni meridionali, che danno luogo ad eventi di pioggia abbondanti ma concentrati, con precipitazioni di breve durata e notevolissima intensità. Le caratteristiche delle precipitazioni influiscono in maniera rilevante e negativa sui meccanismi di infiltrazione dell'acqua e sulla disponibilità delle risorse idriche sotterranee (Cotecchia, 2017).

Da diversi anni è in corso un ampio dibattito a proposito delle variazioni climatiche che interessano la Puglia e più in generale l'Italia meridionale (Caloiero *et al.*, 2011; Doglioni, 2011). In particolare, gli studi condotti hanno evidenziato in tutta l'Italia meridionale una diminuzione delle precipitazioni, concentrata soprattutto durante il periodo invernale, con modesti incrementi nel periodo estivo (Cotecchia, 2017).

L'andamento delle precipitazioni rilevato per le stazioni pluviometriche del Salento mostra in maniera evidente la riduzione delle precipitazioni registrata tra la fine degli anni Settanta e l'inizio dei Novanta, cui segue una fase di precipitazioni stabili. Considerando tutte le stazioni pluviometriche nel loro insieme, i valori iniziali delle medie trentennali delle precipitazioni determinati nel 2008 sono compresi tra 750 mm e 530 mm (Cotecchia, 2017).

Rispetto al periodo di riferimento 1961÷1990 si evidenzia nettamente il crollo delle precipitazioni, verificatosi grossomodo tra gli anni Ottanta e Novanta e la successiva stabilizzazione; tali dati caratterizzano l'intera Penisola Salentina (Cotecchia, 2017).

Nel Salento la riduzione complessiva delle precipitazioni e la contemporanea accresciuta intensità delle stesse, unitamente ai prolungati periodi di assenza di piogge nel periodo estivo, stanno determinando un'insufficiente ricarica degli acquiferi e la carenza di disponibilità delle risorse idriche sotterranee (Cotecchia, 2017).

A questa situazione che determina periodi di siccità prolungata, con ricadute negative sulla produttività e sullo sviluppo delle colture, si associa il problema del ridotto assorbimento da parte del suolo della copiosa quantità d'acqua riversata dai sempre più frequenti fenomeni anomali.

### ***Effetti dei cambiamenti climatici sulla produzione e sullo stato fitosanitario degli olivi***

Il clima influenza l'incidenza e la distribuzione temporale e spaziale delle malattie delle piante. I principali fattori che controllano la crescita e lo sviluppo di malattie sono la temperatura, la luce e l'acqua. Il cambiamento climatico influenza la sopravvivenza, il vigore, il tasso di moltiplicazione, la sporulazione, la direzione e la distanza di dispersione degli inoculi, il tasso di germinazione delle spore e la penetrazione dei patogeni. Il clima condiziona tutte le fasi della vita del patogeno e dell'ospite e pone una sfida a molti patosistemi. Il cambiamento ambientale, soprattutto se combinato con l'introduzione di agenti patogeni e ospiti, può portare a effetti senza precedenti (Ahanger *et al.*, 2013).

Nei Paesi coinvolti nel progetto di ricerca europeo "Olive-Miracle", vale a dire Italia, Spagna, Cipro e Grecia, c'è un generale consenso intorno all'esistenza di effetti prodotti dai cambiamenti climatici già riscontrabili nella pratica di campo dell'olivicoltura, che hanno riguardato maggiormente i seguenti aspetti:

- variazioni nel ciclo di sviluppo: le crescenti temperature anticipano le fasi fenologiche, con effetti generalmente negativi su fioritura e allegagione, mentre aumentano i rischi da ritorni di freddo;
- problemi fitosanitari: si riscontra da alcuni anni una crescente recrudescenza di diversi patogeni e parassiti, alcuni già noti, altri che fino ad ora non erano considerati particolarmente dannosi;
- rese e qualità dell'olio: negli ultimi anni sono stati registrati cali di rese, spesso associati a diminuzioni del livello qualitativo. La carenza idrica e i problemi fitosanitari sono i fattori maggiormente chiamati in causa (Fila, 2018).

In Italia i cambiamenti climatici incrementeranno l'azione dei processi di erosione, di salinizzazione e di perdita di sostanza organica nei suoli. La siccità poi aumenterà il rischio di incendi e di stress idrico. Il degrado del territorio può incrementare i suoi nefasti effetti, ambientali, sociali ed economici in conseguenza dei cambiamenti climatici, specialmente nelle regioni meridionali ed insulari maggiormente sensibili ai fenomeni di desertificazione e degrado del suolo, Puglia compresa (Castellari *et al.*, 2014).

Negli ultimi anni le precipitazioni di elevata intensità sono aumentate in tutto il bacino del Mediterraneo (Polade *et al.*, 2017). Nel Salento questi eventi estremi hanno frequentemente prodotto danni diretti alla vegetazione: grande quantità di pioggia in poche ore, talvolta accompagnata da grandine e vento forte, hanno causato lesioni agli alberi e favorito la colonizzazione di fitopatogeni, come *P. savastanoi* pv. *Savastanoi* (Scortichini, 2020b).

Inoltre, a causa del suolo fortemente compattato negli oliveti, dovuto alle comuni tecniche di preparazione del suolo per la raccolta delle olive da terra con l'ausilio di macchine spazzolatrici-raccattatrici, si è verificata in diverse annate una prolungata permanenza dell'acqua piovana negli appezzamenti, con conseguenze negative indirette per la fisiologia degli alberi. Quando per molti giorni il terreno rimane saturo d'acqua per il ristagno idrico, le condizioni anaerobiche inducono

ipossia radicale e possono determinare una riduzione del tasso di fotosintesi (Parent *et al.*, 2008; Pezeshki *et al.*, 1996), nonché un ridotto assorbimento e trasporto di acqua e sostanze nutritive: ciò indebolisce le piante ed influisce negativamente sulla produzione (Sanzani *et al.*, 2012).



Figura 2.12 Oliveto in provincia di Lecce con allagamento prolungato in seguito a precipitazioni intense verificatesi in breve tempo; il suolo estremamente compatto non permette all'acqua di infiltrarsi. (Scortichini, 2020b)

Questa situazione favorisce inoltre lo sviluppo di funghi fitopatogeni, contribuendo ad uno stato di deperimento generalizzato degli olivi. In particolare, come documentato per alcune zone del Salento dall'Osservatorio Fitosanitario Regionale, le condizioni climatiche caratterizzate da abbondanti piogge verificatesi per due anni consecutivi, nel 2009 e 2010, hanno favorito lo sviluppo degli agenti della “Lebbra delle olive” (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*). Nei precedenti 4-5 anni la malattia era ritornata a livelli alti di preoccupazione per la rapida e quasi esponenziale diffusione e gravità, specialmente nelle province di Lecce e Brindisi. Se, infatti, il frequente manifestarsi epidemico della malattia è favorito dalle particolari condizioni ambientali caratterizzate da autunni con temperature miti ed elevata umidità, i cambiamenti climatici cui si assiste, come l'aumento delle temperature medie e delle piogge autunnali, ma anche gli eventi calamitosi sempre più frequenti, come le abbondanti precipitazioni del mese di novembre 2010 (circa 150 millimetri), hanno consentito una diffusione abnorme della Lebbra negli oliveti delle zone indicate.

Le cause sono state attribuite a eventi non prevedibili, come quelli climatici, ma anche a condizioni agronomiche che contribuiscono a favorire le infezioni dei funghi. Il progressivo abbandono delle corrette tecniche agronomiche, quali la potatura almeno biennale con aerazione della chioma, e la diffusa pratica della raccolta delle olive da terra, sono state individuate dalle autorità fitosanitarie regionali come cause predisponenti la diffusione e la virulenza della malattia (Servizio Agricoltura Reg. Puglia, 2011).

Nella zona sono inoltre frequenti i venti caldi che soffiano solitamente da sud-est, provocando aumento dell'evapotraspirazione, estesi appassimenti fogliari e defogliazioni durante la primavera e l'autunno (Frisullo *et al.*, 2014).

Nel bacino del Mediterraneo gli eventi di gelo e siccità stanno diventando meno rari rispetto al passato. Il gelo si sta verificando con più frequenza rispetto ai decenni precedenti, sia in inverno, ma spesso anche all'inizio della primavera. A gennaio 2017, in alcune zone del Salento, nell'arco di una settimana la temperatura minima giornaliera ha raggiunto valori inferiori a 0° C e alcuni giorni ha raggiunto -4,0° e -5,0° C (Scortichini *et al.*, 2018). Temperature di congelamento possono produrre all'olivo danni diretti alla corteccia e defogliazione (Ruiz *et al.*, 2006).

L'elemento climatico che negli ultimi anni ha inciso maggiormente nella penisola salentina – con diversa modulazione tra le varie zone – è la siccità estiva, determinata da elevate temperature congiunte ad assenza di pioggia e a venti caldi.

A titolo di esempio, nel 2012 la siccità del periodo estivo ha determinato pesanti danni all'agricoltura in tutta la Puglia (180 milioni €), dove tra l'altro è andata persa la metà del raccolto di pomodori (Castellari *et al.*, 2014).

Nel periodo luglio-agosto 2015, per più di 40 giorni consecutivi la temperatura massima nelle aree della provincia di Lecce è stata di 1–4° C superiore ai record storici per l'area, mentre nell'estate 2017, nelle stesse zone, la piovosità totale è stata di solo 7,8 mm dal 1° giugno al 30 agosto (Scortichini *et al.*, 2018). La siccità rappresenta uno dei fattori più critici per il mantenimento delle colture nel bacino del Mediterraneo (Brito *et al.*, 2019), poiché provoca una diminuzione del contenuto di acqua fogliare, con conseguente perdita di turgore e associata riduzione della fotosintesi. Il potenziale xilematico diminuisce e ciò può determinare un aumento della cavitazione, che può causare embolia e l'interruzione del trasporto dell'acqua dalla radice alla chioma (Fernández *et al.*, 2006). Lo stress da siccità si traduce in una marcata riduzione dell'assorbimento di nutrienti all'interno della pianta, con conseguente riduzione della resa, della massa secca dei frutti e dell'accumulo di olio (Stefanoudaki *et al.*, 2007; Tognetti *et al.*, 2007).

È evidente che tali eventi climatici avversi e ricorrenti possono indebolire le piante e predisporle negativamente a perturbazioni biotiche e abiotiche, includendo eventualmente anche “disseccamento rapido dell'olivo”.

Per contrastare gli effetti dannosi dei cambiamenti climatici è stata evidenziata la necessità di una profonda revisione delle pratiche agronomiche (Fila, 2018).

La stretta connessione delle variabili bioclimatiche con lo sviluppo e la diffusione di *X. fastidiosa* è stata evidenziata da diversi studi (Godefroid *et al.*, 2018; Bosso *et al.*, 2016), che sulla base di numerosi parametri climatici hanno previsto la sua potenziale ulteriore diffusione

Secondo Bosso *et al.* (2016), le precipitazioni dei mesi più secchi e più piovosi sono i principali fattori che influenzano maggiormente l'analisi. Sulla base delle previsioni del modello, *X. fastidiosa* ha un'alta probabilità di colonizzare aree caratterizzate da: bassa quota (0–150 m s.l.m.); precipitazioni nel mese più secco <10 mm, nel mese più piovoso comprese tra 80 e 110 mm e durante il trimestre più caldo <60 mm; aree agricole comprendenti agricoltura intensiva, modelli di coltivazione complessi, oliveti, colture annuali associate a colture permanenti, frutteti e vigneti (Bosso, Russo, *et al.*, 2016). Il Salento e l'intera Puglia rientrano appieno in questa descrizione bioclimatica e, analizzando la situazione italiana, la diffusione del patogeno ha un'elevata probabilità di estendersi ad altri areali esterni alla regione, quali: Calabria, Basilicata, Sicilia, Sardegna e aree costiere della Campania, Lazio e Toscana meridionale. Fortunatamente, pur ricorrendo le condizioni previste nel modello, attualmente non risultano informazioni sulla presenza di *X. fastidiosa* in tali zone, né nella parte più settentrionale della Puglia.

## **L'acqua**

### ***Area idrogeologica del Salento***

Il Salento, porzione meridionale emersa della Microplacca Apula (Auct.), è costituito da depositi mesozoici, cenozoici e neozoici prevalentemente carbonatici e, meno frequentemente, marnosi ed argilloso-siltosi. L'area idrogeologica, di forma allungata in direzione appenninica e compresa tra il Mare Adriatico ad Est, e quello Jonio ad Ovest e a Sud, si estende per una superficie pari a circa 3400 km<sup>2</sup>, al cui interno si individuano: parte della Piana Messapica a N-NO, la Terra d'Otranto ad Est, il Basso Salento a Sud e l'Arco Jonico compreso tra i comuni di Gallipoli e Maruggio ad Ovest (fig. 1.13). Superfici pianeggianti variamente estese, collegate con la Piana di Brindisi, caratterizzano il

settore settentrionale del territorio in esame, mentre rilievi calcarei molto dolci, denominati “Serre Salentine”, intervallati da depressioni diversamente estese, definiscono il settore meridionale, noto come Basso Salento (Cotecchia, 2017).

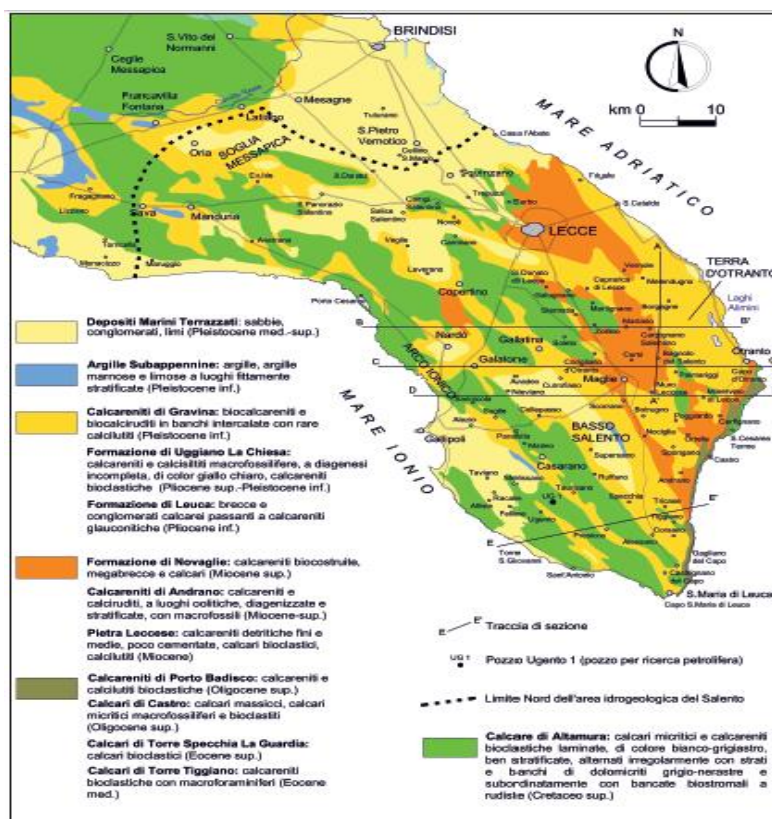


Fig.1.13 Carta geologica della Penisola Salentina

Per la sua natura carsica, il Salento è privo di reti idrografiche organizzate. Sono diffusi, tuttavia, canali di drenaggio che sfociano a mare e in specchi d’acqua salmastra o, nelle zone interne della penisola, in inghiottitoi carsici e in doline di crollo ingegnerizzate.

L’assetto geologico del Salento determina la presenza di più acquiferi nel sottosuolo. I depositi mesozoici sono molto permeabili per fratturazione e carsismo, mentre quelli terziari e quaternari presentano un’ampia gamma di valori di permeabilità in funzione della granulometria e della percentuale di matrice siltoso-argillosa, nonché delle caratteristiche dei sistemi di frattura (Delle Rose *et al.*, 2003).

Le riserve idriche sotterranee del Salento e, in particolare, quelle dell’acquifero carbonatico profondo hanno rappresentato nell’ultimo secolo la principale fonte per la crescita del settore agricolo dell’area, oltre che costituire la risorsa basilare per il settore potabile, contribuendo quindi allo sviluppo socio-economico di questa terra.

La falda profonda è soggetta, tuttavia, a un’intensa e incontrollata attività estrattiva, spesso condotta in forma abusiva, responsabile nel tempo della riduzione di spessore della lente di acqua dolce e del conseguente incremento della concentrazione salina delle acque di falda. Verosimile diventa dunque lo scenario di un futuro, neppure troppo lontano, in cui ci si dovrà confrontare con un’autentica catastrofe idrogeologica, indotta dalla progressiva e incontrollata ingressione dell’acqua marina nel continente (Delle Rose *et al.*, 2003).

L’acquifero profondo ed alcuni acquiferi superficiali sono di tipo “costiero”, in quanto le acque di falda sono sostenute alla base da acque marine di intrusione continentale.

In prima approssimazione, assumendo condizioni statiche e di immiscibilità delle due acque (interfaccia brusca e netta), lo spessore dell'acqua dolce è circa 40 volte l'altezza della superficie piezometrica sul livello del mare. In realtà, tra la falda e l'acqua marina è presente una zona di transizione a salinità variabile, il cui spessore è funzione del grado di eterogeneità dell'ammasso.

Ogni variazione del livello di falda dà luogo a una variazione della posizione dell'interfaccia acqua dolce - zona di transizione. Quando la falda è sottoposta a eccessivo emungimento, si innesca il fenomeno della contaminazione salina, acque salate essendo richiamate dal basso (*upcoming*) e - per l'inversione del gradiente idraulico - anche dalla costa (*lateral intrusion*) a miscelarsi con le acque dolci, con l'effetto di locale espansione della zona di transizione e di aumento del contenuto salino dell'acqua emunta (Delle Rose *et al.*, 2003).

Negli ultimi decenni, una progressiva e preoccupante crescita della salinità dell'acqua della falda profonda ha interessato il Salento (Cotecchia *et al.*, 1986; Tulipano & Fidelibus, 1989; Federico, 1999).

La salinizzazione delle acque della falda profonda del Salento è un fenomeno molto più preoccupante rispetto alle altre forme d'inquinamento prodotte dalle attività antropiche (Napoli & Vanino, 2011). In quest'area è stata rilevata una riduzione di spessore della falda di acqua dolce di circa 70 metri in 40 anni, provocata dal sollevamento di acque salmastre provenienti dalla zona di transizione e attribuibile a disequilibrio idraulico fra l'acqua dolce di falda e quella marina sottostante (Napoli & Vanino, 2011).

Nell'ambito del progetto RIADE "Ricerca integrata per l'applicazione di tecnologie e processi innovativi per la lotta alla desertificazione", sono stati realizzati rapporti su ricerche condotte in Italia negli ultimi 20-30 anni sui processi di desertificazione. Le problematiche ambientali riscontrate e i processi di degrado delle acque individuati nel Salento e nelle aree pugliesi sono stati riassunti nello schema seguente (Iannetta & Trotta, 2008).

### 2.1.2 Schematizzazione secondo il modello DPSIR: ACQUE

ACQUE SUPERFICIALI					
Regione	Driving Forces	Pressioni	Stato	Impatti	Risposte
Puglia	Acquifero del Tavoliere di Foggia: INSEDIAMENTI URBANI	<ul style="list-style-type: none"> <li>consumo di acqua per uso potabile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>salinazione</li> <li>misure piezometriche</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>insediamenti urbani</li> <li>livello della falda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>
	Acquifero Murgiano e Falda costiera di Fasano: ATTIVITÀ AGRICOLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>consumo di acqua per uso agricolo</li> <li>Sorgenti di nitrati</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>salinazione</li> <li>parametri chimico-fisici</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nessuna indicazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>
	Acquifero del Gargano (San Nazario): ATTIVITÀ ZOOTECNICHE	<ul style="list-style-type: none"> <li>sovrasfruttamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>salinazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Piano tutela delle acque D.Lgs. 152/99</li> </ul>
	Acquifero del Tavoliere di Foggia e del Salentino: ATTIVITÀ AGRICOLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>consumo di acqua per uso agricolo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>misure piezometriche</li> <li>salinazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>livello della falda</li> <li>qualità dell'acqua irrigua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>
	Acquifero Talantino: - INSEDIAMENTI INDUSTRIALI - ATTIVITÀ AGRICOLE - IMPIANTI DI TRATTAMENTO REFLUI CIVILI	<ul style="list-style-type: none"> <li>sorgenti di sostanze pericolose e nitrati</li> <li>uso di pesticidi</li> <li>emissione reflui</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- parametri chimico-fisici</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>
	Acquifero Murgiano (Alta Murgia): INSEDIAMENTI URBANI	<ul style="list-style-type: none"> <li>pressione antropica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>parametri chimico-fisici</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>qualità dell'acqua potabile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>

Nel Salento le pressioni sulle acque superficiali sono causate in buona parte dalle attività agricole che, in seguito al consumo di idrico per l'irrigazione, determinano l'assottigliamento delle falde e la loro salinizzazione e ne alterano i parametri chimici con l'uso di pesticidi e nitrati. Gli insediamenti industriali e gli impianti di trattamento dei reflui civili sono responsabili dell'inquinamento chimico attraverso l'emissione e lo sversamento di sostanze pericolose.

La situazione idrica del Salento sta diventando sempre più grave e questo ha una ricaduta diretta sullo stato del suolo e delle piante coltivate.

### ***Olivo e stress idrico***

L'olivo riesce a tollerare la carenza idrica attraverso una serie di adattamenti anatomici, fisiologici e biochimici. *Olea europaea* è caratterizzata da un elevato grado di sclerofillia, foglie piccole, presenza di peli stellari, elevata densità stomatica, vasi xilematici piccoli e numerosi, elevata capacità dell'apparato radicale di esplorare velocemente il suolo a disposizione e da una crescita della parte aerea lenta (che permette di migliorare il rapporto radici/foglie). In condizioni di scarse disponibilità idriche, la crescita vegetativa è il primo processo a essere rallentato (Xiloyannis *et al.*, 2004).

Grazie alla capacità molto elevata (la quantità di acqua che i vari tessuti possono cedere dalle loro riserve al flusso traspirativo), l'olivo forma un elevato gradiente di potenziale tra le foglie e le radici che permette alla pianta di assorbire l'acqua anche quando il potenziale del suolo raggiunge valori di  $-2,5$  MPa (il punto di appassimento di molte specie arboree da frutto è a circa  $-1,5$  MPa). Con la progressiva diminuzione del contenuto idrico del suolo si riduce sia la traspirazione sia la fotosintesi.

Per resistere alla siccità, l'olivo aumenta la concentrazione di osmoliti, composti chimici in grado di provocare spostamenti di acqua per osmosi dagli apoplasti ai simplasti, causando il cosiddetto aggiustamento osmotico attivo. Ad esso si affianca un aggiustamento osmotico passivo, cioè una concentrazione delle molecole biologiche già presenti all'interno delle cellule, dovuta alla perdita di acqua cellulare (Xiloyannis *et al.*, 2004)(Xiloyannis, C, Dichio, B., Sofo, A., Palese, 2004)(Xiloyannis, C, Dichio, B., Sofo, A., Palese, 2004). Un altro processo importante è l'ispessimento delle pareti cellulari.

Contemporaneamente a queste risposte fisiologiche, le cellule delle foglie e delle radici dell'olivo incrementano l'attività di alcuni enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi, ascorbato perossidasi), in grado di eliminare i radicali liberi e altre sostanze tossiche (specie attivate dell'ossigeno, AOS), che sono prodotte in maggior misura nei periodi di avversità ambientali, tra cui la siccità. Ciò permette di limitare i danni alle cellule causati dalle AOS e in particolare quelli all'apparato fotosintetico (Xiloyannis *et al.*, 2004).

Il gradiente di potenziale permette quindi all'olivo di sopportare lunghi periodi di siccità, in particolare nei terreni con buona capacità d'immagazzinamento idrico. In un terreno che riesce a immagazzinare acqua per circa 1,5 m di profondità, la riserva idrica è sufficiente a mantenere un minimo di attività fotosintetica e traspiratoria (10-15% circa) per un periodo di circa 100 giorni, fino all'arrivo delle piogge autunnali. Dal volume di terreno esplorato dalle radici, dipende sia la riserva idrica utile sia quella facilmente utilizzabile dalle piante (Xiloyannis *et al.*, 2004).

La capacità dell'olivo di non risentire eccessivamente della carenza idrica è legata alle caratteristiche fisiche del suolo: se questo è in struttura, sarà in grado di fornire alla pianta l'acqua necessaria nel periodo secco.

Nel Salento, a causa delle operazioni necessarie per la raccolta delle olive da terra, una grandissima parte delle aziende olivicole applica una sequenza di lavorazioni che danneggiano lo stato strutturale del terreno. Due-tre trattamenti con erbicidi e fresature precedono almeno due rullature, che servono per rassodare e livellare perfettamente il terreno, su cui dovranno operare le macchine spazzolatrici-raccattrici per la raccolta. L'effetto, soprattutto dopo molti anni di tale gestione, è un suolo tenacemente compattato, impermeabile all'aria e all'acqua, con ridotta attività microbiologica. Questo terreno non è in grado di immagazzinare le acque meteoriche del periodo autunno-invernale, anche perché, a causa dei cambiamenti climatici, le precipitazioni assumono spesso caratteri di fenomeni estremi con grandi quantità d'acqua piovute in poco tempo.

Il cambiamento climatico riguarda anche l'innalzamento delle temperature e l'assenza prolungata di precipitazioni nei mesi estivi. Nell'estate del 2017, ad esempio, un triplo stress ha colpito gli oliveti

nel sud Italia: alte temperature, carenza d'acqua e elevata irradiazione solare. Si tratta, in tutti e tre i casi, di fenomeni pro-ossidativi che compromettono la capacità dell'olivo di vegetare e di portare a termine lo sviluppo e la maturazione dei frutti (Teatro Naturale, 2017, <https://www.teatronaturale.it/strettamente-tecnico/l-arca-olearia/24823-il-triplo-stress-che-sta-colpendo-l-olivo-alte-temperature-carenza-d-acqua-elevata-irradiazione-luminosa.htm>).

Nel Salento tale situazione è resa ancor più grave dalle ridotte riserve idriche del suolo e dalla progressiva e crescente salinizzazione degli acquiferi. In queste condizioni, le piante sono indebolite e più esposte ad eventuali stress abiotici e biotici, favorendo tra l'altro lo sviluppo di *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (D'attoma *et al.*, 2019).

Infatti, sebbene i sintomi dello stress idrico indotti da *X. fastidiosa* nella vite siano quantitativamente e qualitativamente diversi da quelli indotti dalla ridotta disponibilità di acqua, è stato dimostrato che condizioni di stress idrico esterno favoriscono lo sviluppo della malattia (McElrone *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2013).

Anche su caffè i sintomi da *X. fastidiosa* sono più gravi in condizioni di stress idrico, mentre in primavera l'aspetto della pianta torna a migliorare con produzione di nuovi germogli; gli alberi generalmente non muoiono o solo dopo alcuni anni (De Lima *et al.*, 1998). Negli Agrumi, lo stress idrico può aggravare i sintomi di CVC (Janse & Obradovic, 2010).

Janse e Obradovic (2010), sulla base di studi condotti su più specie vegetali (vite, caffè, agrumi, pesco ed altri ospiti), hanno riscontrato che una volta che una pianta è stata infettata da *X. fastidiosa*, gli stress sono spesso fattori determinanti nello sviluppo dei sintomi; di conseguenza, le pratiche colturali dovrebbero essere indirizzate a tutelare la salute complessiva delle piante e a fornire un'alimentazione adeguata per garantirne la crescita (Janse & Obradovic, 2010). Si conferma, quindi, l'importanza delle tecniche colturali per ridurre gli stress e lo sviluppo dei sintomi della malattia.

## Il suolo

Le peculiari caratteristiche pedologiche del Salento vanno considerate congiuntamente alla profonda azione antropica sull'uso del suolo, operata principalmente per le attività agricole, industriali o per rendere abitabili zone inospitali.

La penisola salentina rientra nella zona pedoclimatica delle *terre rosse* o delle *terre brune* dei luoghi semiaridi (Carlino, 2010).

Le *terre rosse* sono caratterizzate da una scarsa quantità di *humus* e da un complesso argilloso parzialmente desilicizzato, ricco di sesquiossidi, soprattutto di alluminio e di ferro, da cui il colore. Queste caratteristiche si ritrovano anche nei suoli salentini la cui genesi è, però, particolarmente influenzata da fattori geologici e litologici piuttosto che da quelli morfologici e climatici. Questi suoli, dunque, si ritrovano in uno stato iniziale: hanno profili poco definiti, non è possibile distinguere orizzonti e poggiano direttamente sulla roccia madre (profili A-C). Tutto ciò è dovuto anche a fattori antropici, come i processi di coltivazione più o meno intensi nel corso dei millenni, che determinano un continuo rimescolamento dei diversi strati del *solum* (Carlino, 2010).

Sono suoli, inoltre, dallo scarso spessore, e questa loro superficialità è accompagnata spesso dalla presenza di roccia affiorante, anche nei luoghi pianeggianti, o da abbondante materiale assai grossolano (scheletro) (Carlino, 2010).

Inoltre, questi suoli sono caratterizzati da un elevato grado di aridità, che deve oramai essere considerato per l'intera penisola salentina come uno "stato naturale", determinato oltre che da una forte antropizzazione, anche da fattori generali e da alcuni locali (Carlino, 2010).

Su questo tipo di suoli la vegetazione naturale è spesso costituita da forme più o meno degradate di macchia o di gariga, oppure da pascoli magri in cui le entità vegetali più abbondanti sono le xerofite e le spinescenti. Questa tipologia di suolo nella penisola salentina la si ritrova soprattutto a livello costiero, senza troppo penetrare all'interno.

I *suoli bruni calcarei* hanno un profilo pedologico del tipo A(B)C, sono privi di carbonati negli orizzonti alti e leggermente argillosi. In alcuni casi, però, è possibile la formazione di un orizzonte B illuviale o argillico. Questo tipo di suolo, a differenza del precedente, si ritrova diffuso soprattutto nelle zone più interne di gran parte del Salento (Carlino, 2010).

La particolare morfologia della regione, priva di rilievi significativi, la presenza di correnti marine calde sottocosta dirette verso S. Maria di Leuca sia sul lato jonico che su quello adriatico, la totale mancanza di protezione delle Serre allungate nella stessa direzione dei venti dominanti, lo schermo a Nord della dorsale appenninica e dell'altopiano delle Murge, incrementano notevolmente il grado di aridità generale di queste terre, collocandole fra quelle idricamente più povere (Battista *et al.*, 1987). In conclusione, si può notare una prevalenza nella penisola salentina di terre rosse su substrato calcareo e di terreni calcareo-sabbiosi su carparo (Battista *et al.*, 1987).

### ***La degradazione del suolo***

Le funzioni del suolo possono essere seriamente compromesse da una serie di fenomeni, derivanti in gran parte dalle azioni antropiche, sino a giungere all'ultimo stadio della degradazione: la desertificazione (APAT, 2008).

Il fenomeno della desertificazione del suolo è un processo irreversibile che interessa i suoli soggetti a svariati rischi e minacce, quali l'*erosione*, la *diminuzione di materia organica*, la *contaminazione* locale o diffusa, l'*impermeabilizzazione (sealing)*, la *compattazione*, l'*erosione della biodiversità*, la *salinizzazione*, le *alluvioni* e gli *smottamenti*.

Quando questi rischi s'innestano su condizioni climatiche aride o semiaride, il suolo perde di fertilità e diventa suscettibile al processo di desertificazione (Lacarbonara, 2012).

Le aree sensibili alla desertificazione sono in generale caratterizzate dalla presenza di condizioni climatiche che generano ecosistemi con scarsa produttività biologica, scarsità di risorse idriche e suoli fragili (Castellari *et al.*, 2014).

La comunità internazionale presta grande attenzione a questo processo in atto, poiché potrà avere un profondo impatto sulla struttura e sulle funzioni degli ecosistemi agricoli e forestali, influenzando i cicli fisici, chimici e biologici, la produttività e la resilienza.

Sulla base di indici riferiti a clima, suolo, copertura vegetale e gestione del territorio, l'applicazione della metodologia ESA (Kosmas *et al.*, 1999) fornisce una valutazione delle aree sensibili alla desertificazione e al degrado del territorio in Italia. Tutte le regioni hanno aree sensibili ma con gradi d'intensità e con estensione delle aree interessate diverse. Tra le regioni con una percentuale di territorio "molto sensibile", superiore alla media nazionale, vi è anche la Puglia.

Per quanto riguarda il futuro, con elevata probabilità i cambiamenti climatici avranno un forte impatto sui processi di desertificazione, a causa del progressivo assottigliarsi delle riserve idriche e dell'aumento degli eventi siccitosi, di cui peraltro non esiste ancora un quadro conoscitivo esaustivo (Castellari *et al.*, 2014).

L'Atlante della desertificazione in Italia (Castellari *et al.*, 2014), realizzato tra il 2004 ed il 2006, ha stimato che il 51,8% del territorio italiano è potenzialmente a rischio di degrado. La Puglia è sicuramente una delle regioni mediterranee maggiormente esposta alla desertificazione; tale fenomeno può essere sintetizzato e facilmente compreso, nella perdita o la compromissione delle funzioni della risorsa suolo in modo irreversibile, a causa di fenomeni naturali e/o antropici e di lunghi periodi siccitosi (APAT, 2008).

L'Italia, e la Puglia in particolare, sono quindi osservati speciali in questi processi di degradazione del suolo: esaminiamo in sintesi la situazione attuale.

### *Erosione*

L'erosione idrica determina l'asportazione della parte superficiale del suolo; particolarmente delicata è la situazione dei paesaggi delle Murge e del Salento; queste aree, caratterizzate da un substrato calcareo ricoperto da suoli formati prevalentemente da terre rosse facilmente erodibili, sono stati oggetto, nei tempi passati, sia di forti disboscamenti sia di intensi pascolamenti e coltivazioni, che hanno reso molte aree completamente prive di suolo, soprattutto nelle zone con pendenze accentuate (Bellino, 2008).

#### *Perdita di sostanza organica*

La diminuzione di materia organica nel suolo desta particolari preoccupazioni nelle zone mediterranee. Secondo l'Ufficio europeo del suolo, in base ai limitati dati disponibili, quasi il 75% della superficie totale analizzata in Europa meridionale ha un tenore di materia organica basso (3,4%) o estremamente basso (1,7%). Secondo gli esperti di riferimento della Commissione Europea, le zone con un carico organico del suolo inferiore all'1,7% sono nella fase immediatamente precedente la desertificazione (Commissione Europea, 2006). La diminuzione del contenuto di sostanza organica nel suolo ne influenza fortemente le proprietà fisico-chimiche e biologiche e quindi la capacità produttiva (Castellari *et al.*, 2014).

Le condizioni climatiche della Puglia sono tali che il livello della sostanza organica nei suoli tende ad assestarsi naturalmente su valori relativamente bassi rispetto agli standard presi a riferimento in sede europea. Il contenuto di sostanza organica nei suoli viene influenzato dalle tecniche di lavorazione, oltre che dall'andamento climatico, che nel Salento è abbastanza arido e soleggiato per lunghi periodi durante le stagioni calde. Ciò facilita fenomeni di rapida mineralizzazione che portano ad abbassamenti del contenuto in s.o. (APAT, 2008).

#### *Salinizzazione*

La salinizzazione, cioè l'accumulo nel suolo di sali solubili di sodio, magnesio e calcio in quantità tali per cui la fertilità è notevolmente ridotta, è un processo che ha un impatto potenzialmente molto rilevante soprattutto quando riguarda le aree con produzioni irrigue o zone a clima molto caldo. Nell'UE, la salinizzazione del suolo interessa una superficie di circa un milione di ettari, soprattutto nei paesi mediterranei (Commissione Europea, 2006).

La salinizzazione dei suoli nelle aree irrigue costiere è indotta dall'utilizzo di acque di falda soggette all'intrusione di acqua marina. Le coste del Salento, come la maggior parte delle aree costiere italiane, sono interessate dall'intrusione salina, generalmente attribuita al sovrasfruttamento degli acquiferi e al conseguente abbassamento dei livelli di falda (INEA, 2011).

I principali fattori che nel Salento contribuiscono a tale fenomeno sono dovuti alla particolare lunghezza delle coste, alla geologia e morfologia del territorio, al forte utilizzo delle acque di falda a scopi agricoli, industriali e civili e ai lunghi periodi di siccità.

La particolare morfologia, caratterizzata da pianure costiere ampie e da una serie di altopiani (Murge salentine), unita a un'intensa attività agricola, determina l'avanzamento del cuneo salino verso le aree interne anche di alcuni chilometri; in questa situazione molti pozzi, soprattutto in prossimità della costa, sono diventati salmastri con valori di conducibilità dell'acqua che va da 4 a 10 mS/cm (APAT, 2008).

L'incremento del fabbisogno idrico dovuto ai cambiamenti climatici (prolungati periodi di siccità, riduzione della piovosità, fenomeni di forte intensità concentrati in tempi ristretti) ha già iniziato a determinare un maggiore emungimento e, quindi, una maggiore intrusione marina e salinizzazione degli acquiferi costieri. La riduzione delle precipitazioni, poi, oltre a diminuire l'apporto meteorico alle falde, può determinare una minore rimozione dei sali nell'orizzonte più superficiale del suolo (lisciviazione), rendendolo progressivamente meno produttivo.

### *Diminuzione della biodiversità del suolo*

La diminuzione della biodiversità espone maggiormente il suolo ad altri processi di degrado. La biodiversità è quindi utilizzata come indicatore complessivo dello stato di salute del suolo. Un grammo di suolo in buone condizioni può contenere fino a 600 milioni di batteri appartenenti a 15.000-20.000 specie diverse. Queste cifre scendono rispettivamente a 1 milione e 5.000-8.000 se il suolo è di tipo desertico.

Anche se le complesse dinamiche alla base della biodiversità del suolo non sono state del tutto chiarite, esistono prove che l'attività biologica nel suolo dipende in larga misura dalla presenza di adeguate concentrazioni di materia organica. L'uso inadeguato di pesticidi può avere effetti molto negativi per via della loro scarsa selettività. Alcuni studi indicano che determinati erbicidi sopprimono in maniera significativa l'attività di funghi e batteri. L'uso eccessivo di sostanze nutritive può inoltre alterare seriamente gli equilibri ecologici e quindi ridurre la biodiversità del suolo (Commissione Europea, 2006, *Strategia tematica per la protezione del suolo*).

### *Compattazione del suolo*

La compattazione si verifica quando il suolo è soggetto a pressioni meccaniche in seguito all'uso di macchinari pesanti o al pascolamento eccessivo, soprattutto se umido. La compattazione riduce lo spazio poroso tra le particelle del suolo, con conseguente perdita parziale o integrale della sua capacità di assorbimento. Quando il fenomeno raggiunge gli strati profondi del suolo è pressoché irreversibile. Il deterioramento complessivo della struttura del suolo provocato dalla compattazione limita la crescita delle radici, la capacità di stoccaggio dell'acqua, la fertilità, l'attività biologica e la stabilità. Inoltre, in caso di precipitazioni intense, l'acqua non riesce più a infiltrarsi facilmente nel suolo (Commissione Europea, 2006, *Strategia tematica per la protezione del suolo*).

Secondo Iannetta e Trotta (2008), in uno studio finalizzato alla lotta alla siccità e alla desertificazione in Puglia, la compattazione del suolo nel Salento, insieme all'erosione e alla diminuzione del contenuto di sostanza organica, sono effetti dovuti alle pressioni esercitate da lavorazioni agricole non razionali. Ciò è in grado di determinare, tra gli altri impatti, una diminuzione delle funzioni del suolo e una modificazione della stabilità degli ecosistemi (Iannetta & Trotta, 2008).

### ***Classificazione dei suoli in base ai processi di degradazione in atto***

Nell'area delle Murge e del Salento, dove i suoli presentano il regime idrico e termico caratteristico dei suoli di tipo xerico secco-termico, sono in atto diversi processi degenerativi.

Influiscono su tali processi le caratteristiche naturali, poiché i suoli sono sottili, con accumulo di ossidi di ferro e di argilla e carbonati in profondità; frequenti, però sono i suoli costruiti dall'uomo tramite riporto di terra e macinazione della roccia.

I suoli di queste aree sono classificati di III, IV e V classe, a causa dello scarso spessore, della rocciosità e dell'aridità.

I suoli di classe III sono suoli con notevoli limitazioni, che riducono la scelta colturale o che richiedono un'accurata e continua manutenzione delle sistemazioni idrauliche agrarie e forestali. Quelli di IV classe presentano limitazioni molto forti all'utilizzazione agricola. Consentono solo una limitata possibilità di scelta.

Alla classe V appartengono i "suoli non arabili", che presentano limitazioni ineliminabili non dovute a fenomeni di erosione e che ne riducono il loro uso alla forestazione, alla produzione di foraggi, al pascolo o al mantenimento dell'ambiente naturale (ad esempio, suoli molto pietrosi, suoli delle aree golenali) (Costantini, 2006).

I processi degradativi più frequenti sono legati al fatto che si tratta di aree a forte competizione tra usi diversi e per l'uso della risorsa idrica; nel Salento la morfologia non accentuata ha consentito un'elevata diffusione delle attività extra-agricole, soprattutto lungo il lungo tratto di coste.

La competizione nell'uso della risorsa idrica ha portato all'uso irriguo di acque di bassa qualità e a localizzati fenomeni di degradazione delle qualità fisiche e chimiche dei suoli causati dall'uso di acque salmastre o dal non idoneo spandimento di fanghi di depurazione urbana. Si stima che circa 4000 km<sup>2</sup> siano soggetti a fenomeni di salinizzazione e alcalinizzazione e complessivi 20 km<sup>2</sup> da contaminazione di metalli pesanti in seguito all'uso eccessivo di fanghi di depurazione urbana. Le acque superficiali sono spesso inquinate da nitrati e da forme batteriche (coliformi, streptococchi).

Le perdite di suolo per erosione idrica superficiale sono frequenti, soprattutto nei suoli delle zone interne. Di particolare gravità ed estesi sono gli interventi di sbancamento e riporto di terra, che contribuiscono a diminuire il contenuto in sostanza organica degli orizzonti superficiali. Queste pratiche, spesso accompagnate dalla creazione di nuovo suolo mediante macinamento della roccia, causano la perdita del paesaggio tradizionale, caratterizzato dal tipico alternarsi di colori bianchi della roccia calcarea e rossi dei suoli originali, con diminuzione del valore turistico oltre che colturale del suolo (Costantini, 1999).

### ***Vulnerabilità dei suoli nell'area pedologica comprendente il Salento***

Nell'ambito del progetto RIADE "Ricerca integrata per l'applicazione di tecnologie e processi innovativi per la lotta alla desertificazione", sono stati realizzati rapporti su ricerche condotte in Italia negli ultimi 20-30 anni sui processi di desertificazione. Le problematiche ambientali riscontrate e i processi di degrado dei suoli individuati nel Salento e nelle aree pugliesi sono stati riassunti negli schemi seguenti.

#### **2.1.1 Schematizzazione secondo il modello DPSIR: SUOLI**

<b>SUOLI ("Le driving forces di origine naturale sono da intendersi come "fattori predisponenti")</b>					
Regione	Driving Forces <sup>(*)</sup>	Pressioni	Stato <sup>(*)</sup>	Impatti	Risposte
Puglia	Tavoliere di Foggia, Murge baresi e salentine: ATTIVITÀ AGRICOLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>irrigazioni con acque salmastre</li> <li>sfruttamento eccessivo degli acquiferi costieri</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>salinizzazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>modificazione dei sistemi produttivi</li> <li>cambiamenti delle rese colturali</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>direttive sulle acque e sulle politiche agricole</li> </ul>
	ATTIVITÀ AGRICOLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>lavorazioni non razionali</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>erosione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>perdita di suolo</li> <li>modificazione dei sistemi produttivi</li> <li>cambiamenti delle rese colturali</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>direttive sulle acque e sulle politiche agricole</li> </ul>
	Tavoliere di Foggia, Murge baresi e salentine: ATTIVITÀ AGRICOLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>lavorazioni non razionali</li> <li>variazioni di uso del suolo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>erosione</li> <li>compattazione</li> <li>diminuzione del contenuto di sostanza organica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>perdita di suolo</li> <li>incidenza economica</li> <li>modificazione dei sistemi produttivi</li> <li>diminuzione delle rese colturali</li> <li>diminuzione delle funzioni del suolo</li> <li>modificazione della stabilità degli ecosistemi</li> <li>alterazione della qualità del paesaggio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>politiche e pratiche di gestione del suolo</li> </ul>
Provincia di Lecce: URBANIZZAZIONE	URBANIZZAZIONE	<ul style="list-style-type: none"> <li>occupazione di aree agricole</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>consumo di suoli agricoli</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>perdita di suolo produttivo</li> <li>cambiamenti nelle funzioni del suolo</li> <li>perdita di biodiversità</li> <li>modificazione della stabilità degli ecosistemi</li> <li>alterazione della qualità del paesaggio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessuna indicazione</li> </ul>

Sintesi per località

Regione	Località	Suoli	Acque
Puglia	Gargano e Tavoliere di Foggia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>valori elevati di salinità delle acque irrigue</b> comprensorio del Fortore: problematiche di produttività e fertilità dei suoli legate all'utilizzo di acque irrigue con valori di conducibilità elettrica elevati</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>elevata salinità delle acque sorgive causata da eccessivi emungimenti o da fenomeni naturali</b></li> <li>• <b>concentrazioni elevate di boro negli acquiferi profondi</b></li> <li>• sovrasfruttamento della falda superficiale che causa abbassamenti della piezometria</li> <li>• - presenza di bicarbonati sodici nell'acquifero profondo che rende le acque non idonee all'uso irriguo</li> </ul>
	Brindisi e Murge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>salinizzazione dei suoli</b></li> <li>• alcalinizzazione che causa il degrado della struttura dei suoli (deflocculazione argille)</li> <li>• errate tecniche di lavorazione che predispongono i suoli ai processi di erosione</li> <li>• processi di salinizzazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>salinazione delle acque causata da eccessivi emungimenti o da fenomeni naturali</b></li> <li>• <b>inquinamento da pesticidi, prodotti petroliferi, nitrati, cloro derivanti da scarichi fognari</b></li> <li>• arco ionico tarantino: inquinanti da acque reflue, provenienti da emissioni localizzate nella zona di ricarica dell'acquifero</li> <li>• contaminazione salina delle acque sotterranee costiere</li> </ul>
	Lecce	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>consumo di suoli agricoli produttivi in seguito ad urbanizzazione</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>intrusione marina</b></li> </ul>

Nel Salento lo stato di salinizzazione dei suoli è dovuto alla pressione esercitata dalle irrigazioni con acque salmastre e dallo sfruttamento eccessivo degli acquiferi costieri. Le lavorazioni non razionali determinano erosione, compattazione e diminuzione della sostanza organica.

### Linee di intervento

La principale strategia di riduzione della vulnerabilità e di adattamento alla desertificazione ed agli impatti dei cambiamenti climatici è stato il Programma di Azione Nazionale di Lotta alla Desertificazione, lanciato all'inizio del 2000, che prevedeva misure specifiche di carattere agronomico, forestale, civile e sociale per la protezione del suolo, la gestione sostenibile delle risorse idriche, la riduzione dell'impatto delle attività produttive e il riequilibrio del territorio (CIPE 299/1999).

La copertura vegetale gioca un ruolo determinante nella conservazione del suolo. Buona parte del territorio è caratterizzata da una copertura vegetale fortemente disturbata dalle attività antropiche, che rende il territorio più sensibile a fenomeni di degrado (Castellari *et al.*, 2014).

La superficie forestale pugliese, secondo il censimento ISTAT del 2003, è pari a 116.529 ha, con un indice di boscosità del 6%, che pone la regione in ultima posizione in Italia, lontana anche dalla media del Mezzogiorno (17,3%). La distribuzione tra le province è disomogenea: Brindisi e Lecce sono quelle con la minor superficie, cumulando insieme il 4,4% della superficie forestale della regione.

Alla ridotta estensione della vegetazione naturale si aggiunge una gestione non sempre razionale delle specie coltivate. Per quanto riguarda l'olivicoltura, sono diverse le pratiche agricole sotto accusa nei processi di degrado del suolo.

La fertilizzazione organica degli oliveti è diventata una pratica rara nel contesto salentino, dove peraltro, essendo assenti corsi d'acqua di superficie, sono scarsi gli allevamenti zootecnici. Sono diminuite di molto le superfici ove viene praticato il sovescio o l'inerbimento controllato; un tempo era diffuso l'utilizzo di essenze leguminose, particolarmente il favino, per la sua capacità di fissare l'azoto atmosferico e per le caratteristiche del suo apparato radicale fittonante e ramificato con capacità di dissodare in maniera naturale il terreno grazie al discreto sviluppo in profondità. Un'altra specie utilizzata in provincia di Lecce per il sovescio era una varietà locale di cavolo broccolo (definita "*Mugnolo*"), appartenente alla famiglia delle brassicacee, particolarmente apprezzata per il suo potenziale biofumigante dovuto ad un elevato contenuto di glucosinolati (Argentieri *et al.*, 2011).

I glucosinolati sono molecole ad elevata attività biologica nei confronti di funghi, batteri, nematodi e insetti, che si liberano e si attivano al momento della trinciatura e interrimento delle brassicacee (Tookey *et al.*, 1980). Diverse ricerche hanno dimostrato che il sovescio di brassicacee esercita un contenimento di diverse malattie causate da patogeni terricoli e sposta l'equilibrio della biocenosi microbica tellurica verso microrganismi saprofiti e antagonisti (D'Amico, 2001). Purtroppo le aziende che ancora utilizzano questa pratica sono attualmente molto poche.

Nell'ultimo decennio è venuta meno anche la restituzione al suolo della sostanza organica proveniente dai residui di potatura; infatti, a causa della sempre più ridotta redditività della coltura e dell'elevato costo della manodopera, i contratti con le ditte contoterziste di potatura prevedono molto spesso l'asportazione dall'appezzamento del legname, quale parziale compenso per il lavoro effettuato.

In tutta l'area, negli ultimi decenni sono diventate rare erpicature leggere della superficie del suolo, mentre la strategia di contenimento delle infestanti è incentrata sull'utilizzo di erbicidi, principalmente glifosato, che ha anche la funzione di coadiuvante nel preparare il terreno per la raccolta del prodotto. Infatti, nella maggior parte delle aziende è pratica diffusa la raccolta delle olive da terra con macchine semoventi spazzolatrici-raccattatrici, a seguito di cascola naturale o provocata con scuotitori: pertanto, il terreno viene trattato per due-tre volte a stagione con glifosato (Collavo, 2012), poi fresato e successivamente vengono praticate più rullature per rendere il suolo sodo, così da permettere l'intervento dei cantieri di raccolta. Con il passare degli anni, l'applicazione di questo protocollo ha determinato una grave compattazione del terreno, con tutti i problemi di impermeabilizzazione, di ipossia e di ristagno già citati.

Questa tipologia di gestione, se eseguita per un lungo periodo e più di una volta l'anno, può avere effetti negativi sugli olivi: il ripetuto e massiccio utilizzo di erbicidi, negli anni diminuisce la disponibilità e il contenuto complessivo di materia organica, azoto e fosforo nel suolo (Ferreira *et al.*, 2013); può immobilizzare micronutrienti (Glass, 1984) e determinare una ridotta assimilazione di zinco e rame nella pianta (Serra *et al.*, 2011). Un altro impatto ecologicamente grave si sostanzia nell'alterare l'assetto microbico del suolo a vantaggio dei patogeni (Kremer *et al.*, 2005; Kremer & Means, 2009). L'importanza di un microbioma rizosferico in equilibrio, capace di garantire un regolare sviluppo e la salute delle piante è invece una realtà largamente condivisa.

L'elevato consumo di diserbanti nel Salento è documentato da uno studio basato su dati ISTAT, secondo il quale tra il 2003 e il 2009 nella provincia di Lecce è stata impiegata una quantità per ettaro di erbicida fino a due volte superiore rispetto alla provincia di Bari e fino a quattro volte la provincia di Foggia (Ciervo, 2016).

È evidente che una situazione di degrado del suolo e della sua fertilità fisica, chimica e biologica può avere una ricaduta negativa anche sulla salute delle piante: le condizioni ambientali possono influenzare profondamente la pianta anche quando affronta una malattia e la corretta gestione del suolo è fondamentale per applicare strategie efficaci di controllo dei patogeni (Keane and Kerr, 1997; Ghorbani *et al.*, 2008). L'alterazione delle funzioni del suolo viene amplificata se concorrono anche una fragilità delle condizioni climatiche ed una situazione idrologica critica: in questo quadro ambientale di modificazione della stabilità degli ecosistemi, le piante possono essere maggiormente esposte a stress di diversa natura.

L'agroecosistema oliveto nel Salento ha superato nei secoli numerose avversità, sia biotiche sia abiotiche; è importante adottare pratiche di gestione agronomica del suolo razionali per contenere i processi di degrado e desertificazione che possono predisporre all'insorgenza di nuove situazioni patologiche. È vitale comprendere tutte le azioni che possano garantire la resilienza del gran numero di alberi di olivo presenti su questo territorio.

## Bibliografía

- Achat, D. L., Fortin, M., Landmann, G., Ringeval, B., & Augusto, L. (2015). Forest soil carbon is threatened by intensive biomass harvesting. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15991>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (Elsevier Academic Press (ed.); Fifth Edit). Dana Dreibelbis.
- Ahanger R., Bhat H., Bhat T., Ganie S., Lone A., Wani I., Ganai S., Haq S., Khan O., Junaid J., B. T. (2013). Impact of Climate Change on Plant Diseases. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1, 105–115. [https://www.researchgate.net/publication/304675646\\_Impact\\_of\\_Climate\\_Change\\_on\\_Plant\\_Diseases](https://www.researchgate.net/publication/304675646_Impact_of_Climate_Change_on_Plant_Diseases)
- Aislabie, J. M., Chhour, K. L., Saul, D. J., Miyauchi, S., Ayton, J., Paetzold, R. F., & Balks, M. R. (2006). Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10), 3041–3056. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.02.018>
- Albuquerque, L., Johnson, M. M., Schumann, P., Rainey, F. A., & da Costa, M. S. (2014). Description of two new thermophilic species of the genus *Rubrobacter*, *Rubrobacter calidifluminis* sp. nov. and *Rubrobacter naiadicus* sp. nov., and emended description of the genus *Rubrobacter* and the species *Rubrobacter bracarensis*. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(4), 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.03.001>
- Aldwinckle, H. S., Reddy, M. V. B., & Norelli, J. L. (2002). Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Horticulturae*, 590, 325–331. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.590.48>
- Aleklett, K., Leff, J. W., Fierer, N., & Hart, M. (2015). Wild plant species growing closely connected in a subalpine meadow host distinct root-associated bacterial communities. *PeerJ*, 2015(2), e804. <https://doi.org/10.7717/peerj.804>
- Almeida, R. P. P. (2016). Can Apulia's olive trees be saved? *Science*, 353(6297), 346–348. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9710>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Álvarez, B., Biosca, E. G., & López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.
- Andersen, P. C., & French, W. J. (1987). Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31(1), 25–40. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(87\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0885-5765(87)90004-X)
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., & Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology

- drivers. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 19, Issue 10, pp. 535–544). Trends Ecol Evol. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., & Baldoni, L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(3–4), 411–421. <https://doi.org/10.1007/s001220051087>
- Anjum, N. A., Gill, R., Kaushik, M., Hasanuzzaman, M., Pereira, E., Ahmad, I., Tuteja, N., & Gill, S. S. (2015). ATP-sulfurylase, sulfur-compounds, and plant stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00210>
- APAT. (2008). *Il suolo, la radice della vita* (p. 102). APAT.
- Aranda, S., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., & Landa, B. B. (2011). Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant and Soil*, 343(1–2), 329–345. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0721-2>
- Argentieri, M. P., Accogli, R., Fanizzi, F. P., & Avato, P. (2011). Glucosinolates profile of mugnolo, a variety of *Brassica oleracea* L. native to southern Italy (Salento). *Planta Medica*, 77(3), 287–292. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250291>
- Assoproli Bari. (2016). *Diffusi disseccamenti causati da Cecidomia suggiscorza dell'olivo... Non abbassate la guardia, ma attenzione, non si tratta di Xylella fastidiosa! - assoproli*. <https://assoproli.it/diffusi-disseccamenti-causati-da-cecidomia-suggiscorza-delloolivo-non-abbassate-la-guardia-ma-attenzione-non-si-tratta-di-xylella-fastidiosa/>
- Atwood T, Campbell P, Parish H, Smith T, Stirling J, V. F. (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Badri, D. V., Loyola-Vargas, V. M., Du, J., Stermitz, F. R., Broeckling, C. D., Iglesias-Andreu, L., & Vivanco, J. M. (2008). Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytologist*, 179(1), 209–223. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02458.x>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 57, pp. 233–266). Annu Rev Plant Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Baker, R. (1991). Diversity in biological control. *Crop Protection*, 10(2), 85–94. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(91\)90054-U](https://doi.org/10.1016/0261-2194(91)90054-U)
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239–243. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0239>
- Balandreau J, K. R. (1978). The Rhizosphere. In S. . . Dommergues, YR, Krupa (Ed.), *Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants* (pp. 243–268). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-088775-0.X5000-9>

- Balestra, G.M., Gallipoli, L., Tagliavento, V., Anselmi, Ercolani, A., Renzi, M., Mariotti, E., Ciarroni, S., Mazzaglia, A. (2014). Cancro batterico del kiwi: strategie di convivenza. *Informatore Agrario*, 22, 50–53.
- Ball, L., Accotto, G.-P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S., & Mullineaux, P. M. (2004). Evidence for a Direct Link between Glutathione Biosynthesis and Stress Defense Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(9), 2448–2462. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022608>
- Baptista, P., Cameirão, C., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Abou Kubaa, R., Altamura, G., D’Attoma, G., Pereira, J., Lino-Neto, T., & Saldarelli, P. (2019). Understanding the olive microbiome of susceptible and resistant cultivars for sustainable biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 101, 860–861. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3552272>
- Barone E., Di Marco, L. (2003). Morfologia e Ciclo di sviluppo. In Fiorino P. (Ed.), *Olea - Trattato di Olivicoltura* (I, pp. 13–34). Edagricole.
- Bashan, Y, Puente M E., & de-Bashan L E. (2008). Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. *Plant-Microbe Interactions*.
- Bashan, Yoav, & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8–9), 1225–1228. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00187-9)
- Battista C., Pennetta L., Specchio V., Zito G. M. (1987). L’aridità del suolo nella penisola salentina. *Quaderni Di Ricerche Del Centro Studi Geobotanici e d’Ingegneria*, 11, 259–274.
- Bellino F. (2008). Processi degradativi dei suoli nelle regioni pedologiche italiane. In Di Fabbio, A., Fumanti, F. (Ed.), *Il suolo la radice della vita* (pp. 102–103). APAT.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue JUN, p. 148). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2006). The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 250–261. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00025.x>
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: Implications for experimental botany. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Issue 4, pp. 995–1002). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv466>
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>

- Bettenfeld, P., Fontaine, F., Trouvelot, S., Fernandez, O., & Courty, P. E. (2020). Woody Plant Declines. What's Wrong with the Microbiome? *Trends in Plant Science*, 25(4), 381–394. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.12.024>
- Bloem, J., Hopkins, D., Benedetti, A. (2006). *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI International.
- Bloem, E., Haneklaus, S., & Schnug, E. (2005). Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. *Journal of Plant Nutrition*, 28(5), 763–784. <https://doi.org/10.1081/PLN-200055532>
- Bolle-Jones, E. W., & Hilton, R. N. (1956). Zinc-deficiency of hevea brasiliensis as a predisposing factor to oidium infection. In *Nature* (Vol. 177, Issue 4509, pp. 619–620). <https://doi.org/10.1038/177619b0>
- Bonmati, M., Ceccanti, B., & Nanniperi, P. (1991). Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(4), 391–396. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90196-Q](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90196-Q)
- Boscia, D., Altamura, G., Ciniero, A., Di Carolo, M., Dongiovanni, C., Fumarola, G., Giampetruzzi, A., Greco, P., La Notte, P., Loconsole, G., Manni, F., Melcarne, G., Montilon, V., Morelli, M., Murrone, N., Palmisano, F., Pollastro, P., Potere, O., Roseti, V., ... Martelli, G. (2017). Resistenza a Xylella fastidiosa in diverse cultivar di olivo. *L'Informatore Agrario*, 11, 59–63. <https://doi.org/10.5281/zenodo.495708>
- Bosso, L., Di Febbraro, M., Cristinzio, G., Zoina, A., & Russo, D. (2016). Shedding light on the effects of climate change on the potential distribution of Xylella fastidiosa in the Mediterranean basin. *Biological Invasions*, 18(6), 1759–1768. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1118-1>
- Bosso, L., Russo, D., Di Febbraro, M., Cristinzio, G., & Zoina, A. (2016). Potential distribution of Xylella fastidiosa in Italy: A maximum entropy model. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1), 62–72. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-16429](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16429)
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L.-J. J., & Sessitsch, A. (2017). Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 61–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>
- Brito, C., Dinis, L. T., Moutinho-Pereira, J., & Correia, C. M. (2019). Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate. *Plants*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/plants8070232>
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2011). Function of Nutrients: Micronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (pp. 191–248). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8>
- Bron, P. A., Van Baarlen, P., & Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 66–78). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2690>
- Bru, D., Ramette, A., Saby, N. P. A., Dequiedt, S., Ranjard, L., Jolivet, C., Arrouays, D., & Philippot, L. (2011). Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME Journal*, 5(3), 532–542. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.130>
- Brunetta, G. (2013). L'olivicoltura nella provincia di Lecce - Focus su alcuni aspetti di rilievo. *Nuovi*

- Bruno, A. (2012). *Il germoplasma olivicolo in provincia di Lecce*. <https://centrostudiagronomi.blogspot.com/search?q=Il+germoplasma+olivicolo+in+provincia+di+Lecce+>
- Bruno, G. L., Cariddi, C., & Botrugno, L. (2020). Exploring a sustainable solution to control *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* on olive in the Salento Peninsula, Southern Italy. *Crop Protection*, *139*, 105288. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105288>
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, *184*(2), 449–456. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x>
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host and Microbe*, *17*(3), 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppli, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T., & Schulze-Lefert, P. (2020). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. In *Nature* (Vol. 488, Issue 7409, pp. 91–95). Nature. <https://doi.org/10.1038/nature11336>
- Buonaurio, R., Moretti, C., Da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., & Venturi, V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science*, *6*(June), 434. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00434>
- Burbank, L. P., & Stenger, D. C. (2017). The DinJ/RelE Toxin-Antitoxin System Suppresses Bacterial Proliferation and Virulence of *Xylella fastidiosa* in Grapevine. *Phytopathology*®, *107*(4), 388–394. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-16-0374-R>
- Burnell, J. N. (1988). The Biochemistry of Manganese in Plants. In *Manganese in Soils and Plants* (pp. 125–137). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2817-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2817-6_10)
- Burr TJ, Norelli JL, Katz B, Wilcox WF, H. S. (1988). Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchards and its association with a conjugative plasmid. *Phytopathology*, *4*(410), 3.
- Cabanás, C. G. L., Legarda, G., Ruano-Rosa, D., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Niqui, J. L., Triviño, J. C., Roca, A., & Mercado-Blanco, J. (2018). Indigenous *Pseudomonas* spp. Strains from the Olive (*Olea europaea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: From the host roots to the bacterial genomes. *Frontiers in Microbiology*, *9*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00277>
- Cabanás, C. G. L., Sesmero, R., Valverde-Corredor, A., Javier López-Escudero, F., & Mercado-Blanco, J. (2017). A split-root system to assess biocontrol effectiveness and defense-related genetic responses in above-ground tissues during the tripartite interaction *Verticillium dahliae*-olive-*Pseudomonas fluorescens* PICF7 in roots. *Plant and Soil*, *417*(1–2), 433–452. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3269-y>

- Caloiero, T., Coscarelli, R., Ferrari, E., & Mancini, M. (2011). Precipitation change in Southern Italy linked to global scale oscillation indexes. *Natural Hazards and Earth System Science*, 11(6), 1683–1694. <https://doi.org/10.5194/nhess-11-1683-2011>
- Cameirão, C., Giampetruzzi, A., Saponari, M., Saldarelli, P., Morelli, M., D’Attoma, G., Pereira, J., Costa, D., Lino-Neto, T., Baptista, P. (2018). The Microbiome of Olive Tree Xylem : Can They Be the Key To Control Xylella Fastidiosa? *Proceedings of 2nd Joint Annual Meeting of H2020 POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) and XF-ACTORS (Xylella Fastidiosa Active Containment Through a Multidisciplinary-Oriented Research Strategy) Projects. Valencia, Spain, 23-26 October 2018, November, 48.* [https://www.researchgate.net/publication/328661917\\_The\\_microbiome\\_of\\_olive\\_tree\\_xylem\\_can\\_they\\_be\\_the\\_key\\_to\\_control\\_Xylella\\_fastidiosa](https://www.researchgate.net/publication/328661917_The_microbiome_of_olive_tree_xylem_can_they_be_the_key_to_control_Xylella_fastidiosa)
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pêa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. In *Nature Methods* (Vol. 7, Issue 5, pp. 335–336). Nat Methods. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Cardinale, M., Luvisi, A., Meyer, J. B., Sabella, E., De Bellis, L., Cruz, A. C., Ampatzidis, Y., & Cherubini, P. (2018). Specific Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) Test to Highlight Colonization of Xylem Vessels by Xylella fastidiosa in Naturally Infected Olive Trees (*Olea europaea* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 431. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00431>
- Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., De Stradis, A., Loconsole, G., Nigro, F., Porcelli, F., Potere, O., & Martelli, G. P. (2014). Isolation of a Xylella fastidiosa strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 425–429. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I2.024>
- Carlino P. (2010). *Piano di gestione dei Siti di Importanza Comunitaria (SIC) della RETE NATURA 2000 della Provincia di Lecce QUADRO CONOSCITIVO.*
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Cibelli, F., Phillips, A. J. L., & Lops, F. (2013). Pleurostomophora richardsiae, Neofusicoccum parvum and Phaeoacremonium aleophilum associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(3), 517–527.
- Carreto, L., Moore, E., Nobre, M. F., Wait, R., Riley, P. W., Sharp, R. J., & Da Costa, M. S. (1996). Rubrobacter xylanophilus sp. nov., a new thermophilic species isolated from a thermally polluted effluent. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(2), 460–465. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-460>
- Carvalho, M. E. A., Piotto, F. A., Nogueira, M. L., Gomes-Junior, F. G., Chamma, H. M. C. P., Pizzaia, D., & Azevedo, R. A. (2018). Cadmium exposure triggers genotype-dependent changes in seed vigor and germination of tomato offspring. *Protoplasma*, 255(4), 989–999. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1210-8>
- Castellari, S., Venturini, S., Ballarin Denti, A., Bigano, A., Bindi, M., Bosello, F., Carrera, L., Chiriaco, M. V., Danovaro, R., Desiato, F., Filpa, A., Gatto, M., Gaudio, D., Giovanardi, O., Giupponi, C., Gualdi, S., Guzzetti, F., Luise, A., Marino, G., ... Zavatarelli, M. (2014). *Elementi per una Strategia Nazionale di Adattamento ai Cambiamenti Climatici.* [http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/clima/snacc\\_2014\\_elementi.pdf](http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/clima/snacc_2014_elementi.pdf)
- Castellari, S., Venturini, S., Ballarin Denti, A., Bigano, A., Bindi, M., Bosello, F., Carrera, L.,

- Chiriaco, M. V., Danovaro, R., Desiato, F., Filpa, A., Gaudio, D., Giovanardi, O., Giupponi, C., Gualdi, S., Guzzetti, F., Lapi, M., Luise, A., Mysiak, J., ... Zavatarelli, M. (2014). *Rapporto sullo stato delle conoscenze scientifiche su impatti, vulnerabilità ed adattamento ai cambiamenti climatici* in *Italia*. [http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/clima/snacc\\_2014\\_rapporto\\_stat\\_o\\_conoscenze.pdf](http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/clima/snacc_2014_rapporto_stat_o_conoscenze.pdf)
- Cavaliere, V., Cornara, D., Dongiovanni, C., Altamura, G., Boscia, D., Porcelli, F., Bosco, D., & Saponari, M. (2018). Transmission of the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* by different insect species. In *XI European Congress of Entomology* (Issue July, pp. 144–145). <https://www.ponteproject.eu/scientific-publications/transmission-of-the-codiro-strain-of-xylella-fastidiosa-by-different-insect-species/>
- Cavigelli, M. A., Mirsky, S. B., Teasdale, J. R., Spargo, J. T., & Doran, J. (2013). Organic grain cropping systems to enhance ecosystem services. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 28(2), 145–159. <https://doi.org/10.1017/S1742170512000439>
- Celletti, S., Pii, Y., Mimmo, T., Cesco, S., & Astolfi, S. (2016). The characterization of the adaptive responses of durum wheat to different Fe availability highlights an optimum Fe requirement threshold. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.010>
- Chatzistathis, T., Papaioannou, A., Gasparatos, D., & Molassiotis, A. (2017). From which soil metal fractions Fe, Mn, Zn and Cu are taken up by olive trees (*Olea europaea* L., cv. ‘Chondrolia Chalkidikis’) in organic groves? *Journal of Environmental Management*, 203, 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.079>
- Chen, M. Y., Wu, S. H., Lin, G. H., Lu, C. P., Lin, Y. T., Chang, W. C., & Tsay, S. S. (2004). *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1849–1855. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63109-0>
- Cheng, Z., McConkey, B. J., & Glick, B. R. (2010). Proteomic studies of plant-bacterial interactions. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 42, Issue 10, pp. 1673–1684). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.033>
- Choi, H. K., Iandolino, A., Da Silva, F. G., & Cook, D. R. (2013). Water deficit modulates the response of *Vitis vinifera* to the Pierce’s disease pathogen *Xylella fastidiosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(6), 643–657. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0217-R>
- Ciervo, M. (2016). The olive quick decline syndrome (OQDS) diffusion in Apulia Region: An apparent contradiction according to the agricultural model. *Belgeo*, 2016(4), 0–22. <https://doi.org/10.4000/belgeo.20290>
- Cimato, A.; De Rinaldis, G.; Calogiuri, A.L.; Sani, G. (2001). *Il Germoplasma Olivicolo in Provincia di Lecce*. 89.
- Cobine, P. A., Cruz, L. F., Navarrete, F., Duncan, D., Tygart, M., & de la Fuente, L. (2013). *Xylella fastidiosa* Differentially Accumulates Mineral Elements in Biofilm and Planktonic Cells. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054936>
- Coco, L. Del, Pascali, S. A. De, & Fanizzi, F. P. (2014). NMR-Metabolomic Study on Monocultivar and Blend Salento EVOOs including Some from Secular Olive Trees. *Food and Nutrition*

*Sciences*, 05(01), 89–95. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.51012>

- Coker, T. L. R., Rozsypálek, J., Edwards, A., Harwood, T. P., Butfoy, L., & Buggs, R. J. A. (2019). Estimating mortality rates of European ash ( *Fraxinus excelsior* ) under the ash dieback ( *Hymenoscyphus fraxineus* ) epidemic . *PLANTS, PEOPLE, PLANET*. <https://doi.org/10.1002/ppp3.11>
- Collavo, A. (2012). Resistenza al glifosate nelle colture arboree. *Forum Fitoiatico Del 19 Gennaio 2012 – Gestione Delle Resistenze: Nuove Strategie Di Difesa Integrata*. <https://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/Forum Fito>
- Commissione delle Comunità Europee. (2002). *COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL CONSIGLIO E AL PARLAMENTO EUROPEO, AL COMITATO ECONOMICO E SOCIALE E AL COMITATO DELLE REGIONI Verso una strategia tematica per la protezione del suolo*.
- Commissione Europea. (2006). *COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL CONSIGLIO, AL PARLAMENTO EUROPEO, AL COMITATO ECONOMICO E SOCIALE EUROPEO E AL COMITATO DELLE REGIONI: Strategia tematica per la protezione del suolo*.
- Commissione Europea. (2020). *REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2020/1201 DELLA COMMISSIONE del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della Xylella fastidiosa (Wells et al. )* (Vol. 17, Issue 5). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 269/2 17.8.2020.
- Commissione UE. (2017). *DECISIONE DI ESECUZIONE (UE) 2017/2352 DELLA COMMISSIONE - del 14 dicembre 2017 - che modifica la decisione di esecuzione (UE) 2015/789 relativa alle misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della Xylella fastidiosa (Wells et al.)*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3989>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 42, Issue 5, pp. 669–678). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. In *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Compant, S., Saikkonen, K., Mitter, B., Campisano, A., & Mercado-Blanco, J. (2016). Editorial special issue: soil, plants and endophytes. *Plant and Soil*, 405(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2927-9>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Connon, S. A., Lester, E. D., Shafaat, H. S., Obenhuber, D. C., & Ponce, A. (2007). Bacterial diversity in hyperarid atacama desert soils. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 112(4), 1–9. <https://doi.org/10.1029/2006JG000311>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M. A.,

- Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., & Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting ready for battle. In *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 19, Issue 10, pp. 1062–1071). *Mol Plant Microbe Interact.* <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>
- Costantini, E.A.C. (1999). The recognition of soils as part of our cultural heritage. The second international Symposium on the conservation of our geological heritage. Roma, 20-21 maggio 1996. In *Mem. Descr. Carta Geol. d'It.* (Vol. LIV, pp. 175–180). Ist. Pol. Zecca dello Stato.
- Costantini, Edoardo A. C. (2006). *Metodi di valutazione dei suoli e delle terre*. 7, 922.
- Costantini, Edoardo A. C. (2006). La classificazione della capacità d'uso delle terre (Land Capability Classification). *Metodi Di Valutazione Dei Suoli e Delle Terre. Ministero Delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Osservatorio Nazionale Pedologico e per La Qualità Del Suolo Agricolo e Forestale*, 7, 53–62.
- Cotecchia V., Fidelibus M. D., T. L. (1986). Phenomenologies connected with the variation of equilibria between fresh and salt water in the coastal karst carbonate aquifers of the Salento Peninsula (Southern Italy). *Proc. 9th Salt-Water Intrusion Meeting*, 19–28.
- Cotecchia, V. (2017). Area Idrogeologica del Salento. In *Memorie descrittive della Carta Geologica d'Italia* (Vol. 92, pp. 312–442). <http://www.isprambiente.gov.it/files2017/pubblicazioni/periodici-tecnici/memorie-descrittive-della-carta-geologica-ditalia/volume-92>
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., & Scannell, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10494–10499. <https://doi.org/10.1073/pnas.142680199>
- D'Amico M. (2001). *Sistemi di lotta integrata contro la “suberosi radicale” del pomodoro e la “verticilliosi” della melanzana*. Ph. D. thesis Bari, Italy.
- D'Amico, M., Gioffreda, I., Marescotti, D., Pandolfi, S., & Mariotti, R. (2018). *Relazione tecnico-scientifica finale Progetto pilota Codice C “ Sistemi di lotta ecocompatibile contro il CoDiRO – SILECC .”* <https://www.fabianoamati.it/wp-content/uploads/2018/12/Relazione-finale-Silecc.pdf>
- D'attoma, G., Morelli, M., Saldarelli, P., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Boscia, D., Savino, V. N., Fuente, L. D. La, & Cobine, P. A. (2019). Ionomics differences between susceptible and resistant olive cultivars infected by *Xylella fastidiosa* in the outbreak area of salento, Italy. *Pathogens*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040272>
- Datnoff L.E., Elmer W.H., H. D. M. (2007). *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press – The American Phytopathological Society. <http://www.plantprotection.pl/Datnoff-L-E-Elmer-W-H-Huber-D-M-Eds-2007-Mineral-Nutrition-nand-Plant-Disease-APS,92566,0,2.html>
- De Benedictis, M., De Caroli, M., Baccelli, I., Marchi, G., Bleve, G., Gallo, A., Ranaldi, F., Falco, V., Pasquali, V., Piro, G., Mita, G., & Di Sansebastiano, G. Pietro. (2017). Vessel occlusion in three cultivars of *Olea europaea* naturally exposed to *Xylella fastidiosa* in open field. *Journal of Phytopathology*, 165(9), 589–594. <https://doi.org/10.1111/jph.12596>
- De La Fuente, L., Parker, J. K., Oliver, J. E., Granger, S., Brannen, P. M., van Santen, E., & Cobine, P. A. (2013). The Bacterial Pathogen *Xylella fastidiosa* Affects the Leaf Ionome of Plant Hosts

during Infection. *PLoS ONE*, 8(5), e62945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062945>

De Lima, J. E. O., Miranda, V. S., Hartung, J. S., Brlansky, R. H., Coutinho, A., Roberto, S. R., & Carlos, E. F. (1998). Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Disease*, 82(1), 94–97. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.94>

Chapter 6 Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance, Chapter 6, 51 *Advances in Botanical Research* 223 (2009). [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51006-3)

Delle Rose, M., Marco, M. D. E., Federico, A., Fidelibus, C., Internò, G., Orgiato, W., & Piscazzi, A. (2003). Studio preliminare sul rischio di desertificazione nel territorio carsico di Lecce. *Thalassia Salentina*, 26, 135–144.

Delrio G. (1995). Controllo integrato dei fitofagi dell’olivo. *Informatore Fitopatologico*, 12, 9–15.

Deyett, E., Roper, M. C., Ruegger, P., Yang, J. I., Borneman, J., & Rolshausen, P. E. (2017). Microbial landscape of the grapevine endosphere in the context of Pierce’s disease. *Phytobiomes Journal*, 1(3), 138–149. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-08-17-0033-R>

Dias, M. P., Bastos, M. S., Xavier, V. B., Cassel, E., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2017). Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 479–493. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.017>

Dilly, O. (2006). Consensus of microbiological methods for soil quality. In A. (Eds. . Bloem, J., Hopkins, D., Benedetti (Ed.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality* (pp. 296–300). CABI, Wallington.

Dirigente del Servizio Agricoltura Regione Puglia. (2015). *Determinazione del Dirigente del Servizio Agricoltura del 13 Marzo 2015, n. 54 Direttiva 2000/29/CE, D.Lgs. 214/2005 e s.m.i., DM 2777 del 26/07/2014 - Terza definizione delle aree delimitate per Xylella fastidiosa ed adempimenti fitosanitari* (pp. 9534–9541). Bollettino Ufficiale della Regione Puglia - n. 39 del 19-03-2015. [http://www.emergenzaxylella.it/portal/portale\\_gestione\\_agricoltura/Documenti/normRegionale/PortalXylellaNormativaRegionaleIstanceWindow?IDNEWS=38&action=e&windowstate=normal&mode=view&ACTION\\_NEWS=DETAIL](http://www.emergenzaxylella.it/portal/portale_gestione_agricoltura/Documenti/normRegionale/PortalXylellaNormativaRegionaleIstanceWindow?IDNEWS=38&action=e&windowstate=normal&mode=view&ACTION_NEWS=DETAIL)

Dirigente Osservatorio Fitosanitario Reg. Puglia. (2018). *Determinazione del Dirigente Sezione Osservatorio Fitosanitario 13 luglio 2018, n.591* (p. 45591). Bollettino Ufficiale della Regione Puglia – n.96 del 9-7-2018.

Dirigente Servizio Agricoltura Reg. Puglia. (2014). *Determinazione del Dirigente Servizio Agricoltura 18 aprile 2014, n. 157 “Direttiva 2000/29/CE, D.Lgs. 214/2005 e s.m.i., DGR 2023/2013 e DGR 580/2014 - Istituzione delle aree demarcate (zone contaminate e zone tampone) a seguito di ritrovamento della Xyl.*

Dirigente Servizio Agricoltura Regione Puglia. (2015). *Determinazione del Dirigente Servizio Agricoltura 16 gennaio 2015, n. 3. Direttiva 2000/29/CE, D.Lgs. 214/2005 e s.m.i., DM 2777 del 26/07/2014 - “Ridefinizione delle aree delimitate per Xylella fastidiosa”* (pp. 32958–32963). Bollettino Ufficiale della Regione Puglia - n. 108 del 30-07-2015.

Dirigente Servizio Fitosanitario Puglia. (2019). *Determinazione del Dirigente Sezione Osservatorio Fitosanitario 21 maggio 2019, n. 59 “Aggiornamento delle aree delimitate alla Xylella fastidiosa sottospecie Pauca ST53.”* Regione Puglia, Dipartimento Agricoltura, Sviluppo rurale

e ambientale.

- Doglion, A. (2011). Impatto delle variazioni climatiche di piccola scala sugli acquiferi della Puglia meridionale. In *Atti delle Giornate di Studio "Impatto delle modificazioni climatiche su rischi e risorse naturali. Strategie e criteri d'intervento per l'adattamento e la mitigazione."* ITA.
- Dollwet, H. H. A., & Sorenson, J. R. J. (1985). Historic uses of copper compounds in medicine. *Trace Elements in Medicine*.
- Doornbos, R. F., Geraats, B. P. J., Kuramae, E. E., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2011). Effects of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(4), 395–407. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0115>
- Doran, J. W., Sarrantonio, M., & Liebig, M. A. (1996). Soil Health and Sustainability. In *Advances in Agronomy* (Vol. 56, Issue C, pp. 1–54). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60178-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60178-9)
- Doran, John W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6)
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. In *Physiological Reviews* (Vol. 82, Issue 1, pp. 47–95). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., Sundaresan, V., & Jeffery, L. D. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), E911–E920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
- Efsa. (2015). Response to scientific and technical information provided by an NGO on *Xylella fastidiosa*. In *EFSA Journal* (Vol. 13, Issue 4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4082>
- EFSA. (2015a). Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal*, 13(1), 3989. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3989>
- EFSA. (2015b). Categorisation of plants for planting, excluding seeds, according to the risk of introduction of *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal*, 13(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4061>
- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., & Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01424.x>
- El Yacoubi, B., Brunings, A. M., Yuan, Q., Shankar, S., & Gabriel, D. W. (2007). In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1612–1621. <https://doi.org/10.1128/AEM.00261-06>
- Ellingboe, A. H. (2001). Plant-pathogen interactions: Genetic and comparative analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 79–84. <https://doi.org/10.1023/A:1008762005904>

- Emmert, E. A. ., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13405.x>
- EPPO. (n.d.). *Xylella fastidiosa (XYLEFA)[Categorization]* EPPO Global Database. Retrieved January 27, 2021, from <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/categorization>
- EPPO. (2019). *Xylella fastidiosa (XYLEFA)[World distribution]* EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/distribution>
- Fausto, C., Mininni, A. N., Sofo, A., Crecchio, C., Scagliola, M., Dichio, B., & Xiloyannis, C. (2018). Olive orchard microbiome: characterisation of bacterial communities in soil-plant compartments and their comparison between sustainable and conventional soil management systems. *Plant Ecology and Diversity*, 11(5–6), 597–610. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1596172>
- Federico A. (1999). Aspetti geologico-ingegneristici dell'area carsica salentina. *Atti Del I° Incontro Di Studi "Il Carsismo Nell'area Mediterranea"*, Castro. *Thalassia Salentina*, 23 Suppl., 35–46.
- Feil, E. J., & Spratt, B. G. (2001). Recombination and the Population Structures of Bacterial Pathogens. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 561–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.561>
- Ferguson, A. R. (2011). Kiwifruit: evolution of a crop. *Acta Horticulturae*, 913(913), 31–42. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.913.1>
- Fernández, J. E., Díaz-Espejo, A., Infante, J. M., Durán, P., Palomo, M. J., Chamorro, V., Girón, I. F., & Villagarcía, L. (2006). Water relations and gas exchange in olive trees under regulated deficit irrigation and partial rootzone drying. *Plant and Soil*, 284(1–2), 273–291. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0045-9>
- Ferreira, I. Q., Arrobas, M., Claro, A. M., & Rodrigues, M. A. (2013). Soil management in rainfed olive orchards may result in conflicting effects on olive production and soil fertility. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(2), 472–480. <https://doi.org/10.5424/sjar/2013112-3501>
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 579–590). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Fierro, A., Liccardo, A., & Porcelli, F. (2019). A lattice model to manage the vector and the infection of the *Xylella fastidiosa* on olive trees. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44997-4>
- Fila, G. (2018). I problemi emergenti visti dagli operatori: primi risultati di un programma di consultazioni nei paesi mediterranei. In CREA-Agricoltura e Ambiente (Ed.), *Convegno: L'agricoltura italiana di fronte ai cambiamenti climatici: il caso dell'olivicoltura, Roma - 11 giugno 2018*. CREA, Roma.
- Filonov, A. E., Akhmetov, L. I., Puntus, I. F., Esikova, T. Z., Gafarov, A. B., Izmalkova, T. Y., Sokolov, S. L., Kosheleva, I. A., & Boronin, A. M. (2005). The construction and monitoring of genetically tagged, plasmid-containing, naphthalene-degrading strains in soil. *Microbiology*,

- Fiorino P. (1998). Il germoplasma in olivicoltura. *Atti VII International Corse on Olive Growing. Scandicci, 6-11 Maggio 1996*, 33–37.
- Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., & Johnson, M. T. J. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(6), E1157–E1165. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29358405/>
- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdottir, V., Krogh Pedersen, H., Arumugam, M., Kristiansen, K., Yvonne Voigt, A., Vestergaard, H., Hercog, R., Igor Costea, P., Roat Kultima, J., Li, J., Jørgensen, T., ... Pedersen, O. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, 528(7581), 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature15766>
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 154, pp. 134–142). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants - reevaluation of the concept. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1056–1071.
- Francaviglia, R., Carroni, A. M., Ruda, P., Salis, M., Bazzoffi, P., Carnevale, S., Rocchini, A., Troccoli, A., Russo, M., Speroni, M., Borrelli, L., Cabassi, G., Neri, U., Napoli, R., Falcucci, M., Pennelli, B., Simonetti, G., Migliore, M., Piccini, C., ... Puri, D. (2015). Environmental effectiveness of GAEC cross-compliance Standard 3.1 ‘Ploughing in good soil moisture conditions’ and economic evaluation of the competitiveness gap for farmers. *Italian Journal of Agronomy*, 10(1s), 0–3. <https://doi.org/10.4081/ija.2015.695>
- Franchini, E., Cimato, A., Costantini, E. A. C. (2006). Olivo. In Edoardo A. C. Costantini (Ed.), *Metodi di valutazione dei suoli e delle terre. Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo Agricolo e Forestale* (pp. 597–662). Cantagalli.
- Francl, L. J. (2001). The Disease Triangle: A Plant Pathological Paradigm Revisited. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-t-2001-0517-01>
- Frisullo, S., Camele, I., Agosteo, G. E. E., Boscia, D., & Martelli, G. P. P. (2014). Brief historical account of olive leaf scorch (“brusca”) in the salento peninsula of Italy and state-of-the-art of the olive quick decline syndrome. *Journal of Plant Pathology*, 96(3), 441–449. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I3.009>
- Fryer, M. J. (2002). Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1249–1254. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1249>
- Fryer, Michael J., Ball, L., Oxborough, K., Karpinski, S., Mullineaux, P. M., & Baker, N. R. (2003). Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. *Plant Journal*, 33(4), 691–705. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01656.x>
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American*

*Journal of Botany*, 100(9), 1738–1750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>

- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2015). Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00284>
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., & Glick, B. R. (2009). Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. In *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/W09-010>
- Gandara, G. (1920). *Enfermedades y plagas del naranjo*. Riquelme y Vargas Ediciones.
- Garbeva, P., Van Elsas, J. D., & Van Veen, J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil*, 302(1–2), 19–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9432-0>
- Garbeva, P., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. In *Annual Review of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Garbeva, Paolina, Hol, W. H. G., Termorshuizen, A. J., Kowalchuk, G. A., & De Boer, W. (2011). Fungistasis and general soil biostasis - A new synthesis. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 43, Issue 3, pp. 469–477). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.020>
- Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010). Emerging soilborne diseases of horticultural crops and new trends in their management. *Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2010.883.2>
- Garrett, K. A., Forbes, G. A., Savary, S., Skelsey, P., Sparks, A. H., Valdivia, C., Van Bruggen, A. H. C., Willocquet, L., Djurle, A., Duveiller, E., Eckersten, H., Pande, S., Vera Cruz, C., & Yuen, J. (2011). Complexity in climate-change impacts: An analytical framework for effects mediated by plant disease. In *Plant Pathology* (Vol. 60, Issue 1, pp. 15–30). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02409.x>
- Ghorbani, R., Wilcockson, S., Koocheki, A., & Leifert, C. (2008). Soil management for sustainable crop disease control: A review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 6, Issue 3, pp. 149–162). <https://doi.org/10.1007/s10311-008-0147-0>
- Giampetruzzi, A., Baptista, P., Morelli, M., Cameirão, C., Neto, T. L., Costa, D., D’attoma, G., Kubaa, R. A., Altamura, G., Saponari, M., Pereira, J. A., & Saldarelli, P. (2020). Differences in the endophytic microbiome of olive cultivars infected by *Xylella fastidiosa* across seasons. *Pathogens*, 9(9), 1–29. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090723>
- Giampetruzzi, A., Saponari, M., National, I., Attoma, G. D., National, I., Morelli, M., & National, I. (2016). *A metagenomic investigation of the microbiome of Xylella fastidiosa-infected olives*. April 2017. <https://www.ponteproject.eu/scientific-publications/metagenomic-investigation-microbiome-xylella-fastidiosa-infected-olives/>
- Giunta Regionale Puglia. (2013). *Deliberazione Giunta Regionale Puglia 29 ottobre 2013 n. 2023. Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e la eradicazione del batterio da quarantena Xylella fastidiosa associato al “Complesso del disseccamento rapido dell’olivo”* (pp. 38706–38717). Bollettino Ufficiale della Regione Puglia - n. 153 del 22-11-2013.
- Giunta Regionale Puglia. (2016). *Deliberazione Giunta Regionale 459 08/04/2016 Misure Fitosanitarie da attuare per il contenimento della diffusione di X. fastidiosa ai sensi dell’art. 17 del DM 19/06/2015 e s.m.i.* (pp. 19528–19559).

- Glass, R. L. (1984). Metal complex formation by glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(6), 1249–1253. <https://doi.org/10.1021/jf00126a010>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B. R. (2015). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* (I). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0_1)
- Godefroid, M., Cruaud, A., Streito, J.-C., Rasplus, J.-Y., & Rossi, J.-P. (2018). Climate change and the potential distribution of *Xylella fastidiosa* in Europe. *BioRxiv*, 289876. <https://doi.org/10.1101/289876>
- Gomes, T., Pereira, J. A., Lino-Neto, T., Bennett, A. E., & Baptista, P. (2019). Bacterial disease induced changes in fungal communities of olive tree twigs depend on host genotype. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42391-8>
- Goodman RN. (1954). Fire blight control with sprays of agrimycin, a streptomycin–terramycin combination. *Plant Dis Rep.*, 38, 874–8.
- Gouran, H., Gillespie, H., Nascimento, R., Chakraborty, S., Zaini, P. A., Jacobson, A., Phinney, B. S., Dolan, D., Durbin-Johnson, B. P., Antonova, E. S., Lindow, S. E., Mellema, M. S., Goulart, L. R., & Dandekar, A. M. (2016). The Secreted Protease PrtA Controls Cell Growth, Biofilm Formation and Pathogenicity in *Xylella fastidiosa*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31098>
- Gowdar, S., Deepa, H., & Amaresh, Y. (2018). A brief review on biocontrol potential and PGPR traits of *Streptomyces* sp. for the management of plant diseases. *Undefined*.
- Graham, RD., Webb, M. (1991). Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In R. M. Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., Welch (Ed.), *Micronutrients in Agriculture* (2nd editio, pp. 329–370). Soil Science Society of America.
- Gramaje, D., Urbez-Torres, J. R., & Sosnowski, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>
- Graniti, A., Faedda, R., Cacciola, O., & di San Lio, M. (2011). Olive diseases in a changing ecosystem. In *Olive Diseases and Disorders* (Issue January).
- Grant, J. J., & Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. In *Plant Physiology* (Vol. 124, Issue 1, pp. 21–29). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.21>
- Großkinsky, D. K., Koffler, B. E., Roitsch, T., Maier, R., & Zechmann, B. (2012). Compartment-specific antioxidative defense in *Arabidopsis* against virulent and avirulent *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology*, 102(7), 662–673. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-12-0022-R>
- Gu, Y.-H., & Mazzola, M. (2003). Modification of fluorescent pseudomonad community and control of apple replant disease induced in a wheat cultivar-specific manner. *Applied Soil Ecology*, 24(1), 57–72. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(03\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(03)00066-0)
- Guario, A., Nigro, F., Boscia, D., & Saponari, M. (2013). Disseccamento rapido dell'olivo, cause e misure di contenimento. *L'Informatore Agrario*, 46, 51–54.

[https://www.researchgate.net/publication/263423332\\_Disseccamento\\_rapido\\_dell%27olivocause\\_e\\_misure\\_di\\_contenimento](https://www.researchgate.net/publication/263423332_Disseccamento_rapido_dell%27olivocause_e_misure_di_contenimento)

- Guerrero, R., Margulis, L., & Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: The holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology*, 16(3), 133–143. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.188>
- Gupta, N., Debnath, S., Sharma, S., Sharma, P., & Purohit, J. (2017). Role of nutrients in controlling the plant diseases in sustainable agriculture. In *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* (Vol. 2, pp. 217–262). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5343-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5343-6_8)
- Haichar, F. E. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., & Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal*, 2(12), 1221–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Hamel, C., Vujanovic, V., Nakano-Hylander, A., Jeannotte, R., & St-Arnaud, M. (2005). Factors associated with fusarium crown and root rot of asparagus outbreaks in Quebec. *Phytopathology*, 95(8), 867–873. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0867>
- Hamonts, K., Trivedi, P., Garg, A., Janitz, C., Grinyer, J., Holford, P., Botha, F. C., Anderson, I. C., & Singh, B. K. (2018). Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. *Environmental Microbiology*, 20(1), 124–140. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14031>
- Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 12, Issue 3, pp. 259–266). Curr Opin Plant Biol. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/mubr.00050-14>
- Hargreaves, P. R., Brookes, P. C., Ross, G. J. S., & Poulton, P. R. (2003). Evaluating soil microbial biomass carbon as an indicator of long-term environmental change. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 401–407. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00291-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00291-2)
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., & Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. In *Plant and Soil* (Vol. 321, Issues 1–2, pp. 235–257). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Hartmann, M., Howes, C. G., Vaninsberghe, D., Yu, H., Bachar, D., Christen, R., Henrik Nilsson, R., Hallam, S. J., & Mohn, W. W. (2012). Significant and persistent impact of timber harvesting on soil microbial communities in Northern coniferous forests. *ISME Journal*, 6(12), 2199–2218. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.84>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. In *Annals of Microbiology* (Vol. 60, Issue 4, pp. 579–598). <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- He, J. Z., Shen, J. P., Zhang, L. M., Zhu, Y. G., Zheng, Y. M., Xu, M. G., & Di, H. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices.

*Environmental Microbiology*, 9(9), 2364–2374. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01358.x>

- Hein, J. W., Wolfe, G. V., & Blee, K. A. (2008). Comparison of rhizosphere bacterial communities in *Arabidopsis thaliana* mutants for systemic acquired resistance. *Microbial Ecology*, 55(2), 333–343. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9279-1>
- Hell, R., Kruse, C. (2007). Sulfur in biotic interactions of plants. In Hawkesford M.J. and De Kok L.J. (Ed.), *Sulfur in Plants An Ecological Perspective* (pp. 197–224). Springer.
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., Curran-Cournane, F., Taylor, M., & Lear, G. (2017). Bacteria as emerging indicators of soil condition. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.02826-16>
- Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., & Young, I. M. (2009). Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. In *Plant and Soil* (Vol. 321, Issues 1–2, pp. 117–152). <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9885-9>
- Höller, K., Király, L., Künstler, A., Müller, M., Gullner, G., Fattinger, M., & Zechmann, B. (2010). Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur-induced resistance in tobacco mosaic virus-infected genetically susceptible *Nicotiana glauca* plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(11), 1448–1459. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0117>
- Holmes, A. J., Bowyer, J., Holley, M. P., O'Donoghue, M., Montgomery, M., & Gillings, M. R. (2000). Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(2), 111–120. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00051-9)
- Homma, Y., Sato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H., & Suzui, T. (1989). Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(5), 723–728. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90070-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90070-9)
- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 8, pp. 525–537). *Nat Rev Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro2836>
- Huber, D.M. and Graham, R. D. (1999). The Role of Nutrition in Crop Resistance and Tolerance to Disease. In Rengel Z. (Ed.), *Mineral Nutrition of Crops Fundamental Mechanisms and Implications* (pp. 205–226). Food Product Press.
- Iannetta, M., Trotta, C. (2008). *Piano di Azione Locale ( PAL ) per la lotta alla Siccità e alla Desertificazione della Regione Puglia.*
- Iannotta, N., Loconsole, G., Noce, M.E., Saponari, M., Savino, V. N., Vizzarri, V., Zaffina, F. (2012). Principali patogeni e difesa. In *Collana divulgativa dell'Accademia: Vol. XIII* (p. 27). Accademia Nazionale dell ' Olivo e dell ' Olio.
- Iannotta, N. (2003). Fitofagi dell'olivo. In Fiorino P. (Ed.), *Olea - Trattato di Olivicoltura* (pp. 393–409). Edagricole.
- Iftikhar, Y., Sajid, A., Shakeel, Q., Ahmad, Z., & Ul Haq, Z. (2020). *Biological Antagonism: A Safe and Sustainable Way to Manage Plant Diseases* (pp. 83–109). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_5)

- Isermeyer, H. (1952). Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 56(1–3), 26–38. <https://doi.org/10.1002/jpln.19520560107>
- ISMEA Istituto dei Servizi per il mercato agricolo alimentare. (2019). Scheda di Settore Olio di Oliva. *Report*, 1–46.
- ISTAT. (2020). *Dati ISTAT Coltivazioni*. <http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=33706>
- Janse, J. D. (2012). Emerging bacterial and phytoplasma diseases of fruit trees that are or may become a threat for the Mediterranean basin: Notes on epidemiology, risks, prevention and management on first occurrence. *Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.940.81>
- Janse, J. D., & Obradovic, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: Its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.4454/jpp.v92i1sup.2504>
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Maitelle, T., & Steinberg, C. (2007). Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.07.001>
- Jeger, M., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Grégoire, J. C., Jaques Miret, J. A., MacLeod, A., Navajas Navarro, M., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., Van Bruggen, A., Van der Werf, W., West, J., ... Bragard, C. (2018). Updated pest categorisation of *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal*, 16(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5357>
- Jog, R., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S. (2016). Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes* (pp. 33–45). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0707-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0707-1_3)
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. In *Plant and Soil* (Vol. 321, Issues 1–2, pp. 5–33). <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Jousset, A., Rochat, L., Lanoue, A., Bonkowski, M., Keel, C., & Scheu, S. (2011). Plants respond to pathogen infection by enhancing the antifungal gene expression of root-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 352–358. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0208>
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., & Mullineaux, P. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, 284(5414), 654–657. <https://doi.org/10.1126/science.284.5414.654>
- Kawashima, R. (1927). Influence of silica on rice blast disease. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1, 86–91.
- Keane, P.J.; Kerr, A. (1997). Factors affecting disease development. In H. G. Brown, J.F., Ogle (Ed.), *Plant Pathogens and Plant Disease* (Rockvale P, pp. 287–298). <https://doi.org/10.1016/b978-044450584-2/50004-6>
- Khoshgoftarmanesh, A. H., Kabiri, S., Shariatmadari, H., Sharifnabi, B., & Schulin, R. (2010). Zinc nutrition effect on the tolerance of wheat genotypes to *Fusarium* root-rot disease in a solution culture experiment. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56(2), 234–243.

<https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00441.x>

- Király, L., Künstler, A., Höller, K., Fattinger, M., Juhász, C., Müller, M., Gullner, G., & Zechmann, B. (2012). Sulfate supply influences compartment specific glutathione metabolism and confers enhanced resistance to Tobacco mosaic virus during a hypersensitive response. *Plant Physiology and Biochemistry*, *59*, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.10.020>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, *41*(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, *94*(11), 1259–1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 740–755). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>
- Koskella, B., Meaden, S., Crowther, W. J., Leimu, R., & Metcalf, C. J. E. (2017). A signature of tree health? Shifts in the microbiome and the ecological drivers of horse chestnut bleeding canker disease. *New Phytologist*, *215*(2), 737–746. <https://doi.org/10.1111/nph.14560>
- Kosmas, C., Kirkby, M., & Geeson, N. (1999). Key indicators and methodology for mapping environmentally sensitive areas (ESA's) to desertification. In N. Kosmas, K. Kirkby, M. Geeson (Ed.), *European Commission Project* (Issue ENV4 CT 950119). European Union. [https://www.researchgate.net/publication/262374822\\_Methodology\\_for\\_mapping\\_Environmentally\\_Sensitive\\_Areas\\_ESAs\\_to\\_desertification](https://www.researchgate.net/publication/262374822_Methodology_for_mapping_Environmentally_Sensitive_Areas_ESAs_to_desertification)
- Kotsou, M., Mari, I., Lasaridi, K., Chatzipavlidis, I., Balis, C., & Kyriacou, A. (2004). The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*, *26*(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.12.001>
- Kremer, R. J., & Means, N. E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *European Journal of Agronomy*, *31*(3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.06.004>
- Kremer, R. J., Means, N. E., & Kim, S. (2005). Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *85*(15), 1165–1174. <https://doi.org/10.1080/03067310500273146>
- Lacarbonara M. (2012). Suolo. In AA.VV. (Ed.), *Relazione sullo Stato dell'Ambiente 2011 Regione Puglia*. A.R.P.A. Puglia. [http://www.arpa.puglia.it/web/guest/pubblicazioni\\_documenti](http://www.arpa.puglia.it/web/guest/pubblicazioni_documenti)
- Laccone, G., & Porcelli, F. (2014). Unusual outbreaks of poplar leaf roller (*Byctiscus betulae*) in vineyard and olive bark midge (*Resseliella oleisuga*) in Apulia. *Atti, Giornate Fitopatologiche, Chianciano Terme (Siena), 18-21 Marzo 2014, Volume Primo*, 289–294.
- Ladygina, N., & Hedlund, K. (2010). Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(2), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.009>

- Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E. L., Abid, K. B., Rogers, E. E., Guerinot, M. L., Harper, J. F., Ward, J. M., McIntyre, L., Schroeder, J. I., & Salt, D. E. (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, *21*(10), 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/nbt865>
- Lamichhane, J. R., & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: A growing trend. *Frontiers in Plant Science*, *6*(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Lee, B., Lee, S., & Ryu, C. M. (2012). Foliar aphid feeding recruits rhizosphere bacteria and primes plant immunity against pathogenic and non-pathogenic bacteria in pepper. *Annals of Botany*, *110*(2), 281–290. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs055>
- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Goh, B. H., Yin, W. F., Ab Mutalib, N. S., & Chan, K. G. (2014). Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *Scientific World Journal*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/698178>
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moëne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Issue 7, pp. 583–595). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>
- Leon, M. C. C., Stone, A., & Dick, R. P. (2006). Organic soil amendments: Impacts on snap bean common root rot (*Aphanomyces euteiches*) and soil quality. *Applied Soil Ecology*, *31*(3), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.05.008>
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A., & Davies, J. P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Biology*, *51*, 141–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.141>
- Lindow, S., Newman, K., Chatterjee, S., Baccari, C., Lavarone, A. T., & Ionescu, M. (2014). Production of xylella fastidiosa diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of pierce's disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(3), 244–254. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0197-FI>
- Lombardo N. (2003). Aspetti generali dell'olivicoltura. In Piero Fiorino (Ed.), *Olea. Trattato di olivicoltura* (I, pp. 3–12). Edagricole.
- Longa, C. M. O., Nicola, L., Antonielli, L., Mescalchin, E., Zanzotti, R., Turco, E., & Pertot, I. (2017). Soil microbiota respond to green manure in organic vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(6), 1547–1560. <https://doi.org/10.1111/jam.13606>
- Lopes, S. A., Ribeiro, D. M., Roberto, P. G., França, S. C., & Santos, J. M. (2000). *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-Xylella fastidiosa interactions. *Plant Disease*, *84*(8), 827–830. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.8.827>
- López-Escudero, F. J., & Mercado-Blanco, J. (2011). Verticillium wilt of olive: A case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*, *344*(1), 1–50. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0629-2>
- Lotareva, O. V., & Prozorov, A. A. (2005). The conjugal transfer of plasmid pUB110 in *Bacillus subtilis* in soils of different natural landscapes. *Microbiology*, *74*(1), 116–117. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0038-3>

- Lucas, G. B., Campbell, C. L., Stewart, E. L., Lucas, G. B., Campbell, C. L., & Lucas, L. T. (2012). Introduction to Plant Diseases: Identification and Management. In Springer Science & Business Media (Ed.), *Mycologia*. <https://doi.org/10.2307/3759945>
- Lucas, J. A. (2011). Advances in plant disease and pest management. *The Journal of Agricultural Science*. <https://doi.org/10.1017/s0021859610000997>
- Luchetti F. (2002). Il settore olivicolo mondiale: situazione attuale e prospettive. *ISOI (2002) - Convegno Internazionale Di Olivicoltura*.
- Luisi, N., De Cicco, V. (1975). Danni da Bromacile su olivi consociati ad agrumi in Puglia. *Informatore Fitopatologico. Edagricole, Bologna, 6*, 17–19.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrekton, A., Kunin, V., Rio, T. G. Del, Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2012). Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Luvisi, A., Nicolì, F., & De Bellis, L. (2017). Sustainable management of plant quarantine pests: The case of olive quick decline syndrome. *Sustainability (Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/su9040659>
- M. Morelli, G. D'Attoma, M. Saponari, P. S. (2017). Evaluation of an endophytic symbiont as biocontrol agent against Xylella fastidiosa CoDiRO. *Journal of Plant Pathology*, 99(November). <https://doi.org/10.5281/zenodo.1051042>
- Macchia F. (1984). Il fitoclima del Salento. *Not. Soc. Ital. Fitosoc.*, 19(2), 29–60.
- Machado, M. A., Cristofani-Yaly, M., & Bastianel, M. (2011). Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(SPEC. ISSUE 1), 158–172. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452011000500019>
- Mäder, P., Fließbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P., & Niggli, U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, 296(5573), 1694–1697. <https://doi.org/10.1126/science.1071148>
- Marcelletti, S., & Scortichini, M. (2014). Definition of plant-pathogenic pseudomonas genomospecies of the pseudomonas syringae complex through multiple comparative approaches. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0344-R>
- Martelli, G. P., Boscia, D., Porcelli, F., & Saponari, M. (2016). The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 144, Issue 2, pp. 235–243). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0784-7>
- Martelli, Giovanni P. (2013). *Disseccamento rapido dell'olivo*. <http://www.georgofili.info/contenuti/disseccamento-rapido-delloolivo/1510>
- Martelli, Giovanni P. (2016a). Il punto su Xylella fastidiosa e disseccamento rapido dell'olivo. *L'informatore Agrario*, 24, 40–46.
- Martelli, Giovanni P. (2016b). The current status of the quick decline syndrome of olive in southern Italy. *Phytoparasitica*, 44(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0498-6>

- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G., & Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *10*(3), 293–319. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>
- Matta, A., Buonauro, R., Favaron, F., Scala, A. (2017). *Fondamenti di patologia vegetale* (2nd ed.). Pàtron, Bologna.
- Mauch-Mani, B., & Métraux, J. P. (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0726>
- McElrone, A. J., Sherald, J. L., & Forseth, I. N. (2003). Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. *Journal of Experimental Botany*, *54*(381), 419–430. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg046>
- McManus, P. S., & Jones, A. L. (1994). Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-627>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 5, pp. 634–663). <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, *332*(6033), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Mercado-Blanco, Jesús, Abrantes, I., Caracciolo, A. B., Bevivino, A., Ciancio, A., Grenni, P., Hryniewicz, K., Kredics, L., & Proença, D. N. (2018). Belowground microbiota and the health of tree crops. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01006>
- Mercado-Blanco, Jesus, & Lugtenberg, B. (2014). Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Current Biotechnology*, *3*(1), 60–75. <https://doi.org/10.2174/22115501113026660038>
- Mercado-Blanco, Jesús, Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2004). Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, *30*(2), 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.02.002>
- Meyer, J. B., Lutz, M. P., Frapolli, M., Péchy-Tarr, M., Rochat, L., Keel, C., Défago, G., & Maurhofer, M. (2010). Interplay between wheat cultivars, biocontrol pseudomonads, and soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(18), 6196–6204. <https://doi.org/10.1128/AEM.00752-10>
- Micallef, S. A., Shiaris, M. P., & Colón-Carmona, A. (2009). Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *60*(6), 1729–1742. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp053>
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., & Tebbe, C. C. (2000). Variation of microbial rhizosphere

- communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*, 40(1), 43–56. <https://doi.org/10.1007/s002480000021>
- Mikkelsen L, E. J. and J. D. (2006). *Literature review on detection and eradication of plant pathogens in sludge, soils and treated biowaste. Desk study on bulk density* (The European Commission DG RTD under Framework 6. (ed.)).
- Millet, Y. A., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D., & Ausubel, F. M. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell*, 22(3), 973–990. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069658>
- Ministero dell’Ambiente. (2019). *Catalogo dei sussidi ambientalmente dannosi e dei sussidi ambientalmente favorevoli. Terza Edizione, dicembre 2019.*
- MIPAAF, ISMEA, INEA, B. M. T. I. (2020). *Piani di Settore - Registro Varietale Olivo.* <http://www.pianidisettoe.it/flex/FixedPages/Common/RegistroVarietale.php/L/IT>
- MiPAAF. (2016). *Piano di settore olivicolo-oleario 2016* (p. 37). Accordo in sede di Conferenza Stato-Regioni del 24 marzo 2016 Repertorio atti 42/CSR.
- MIPAAF. (2015). *Misure di contrasto alla Xylella fastidiosa in Italia Stato di attuazione Misure di lotta alla Xylella fastidiosa in Italia.*
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Issue 1, pp. 11–19). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Monteiro, M. P., Clerici, J. H., Sahoo, P. K., Cesar, C. L., de Souza, A. A., & Cotta, M. A. (2017). Stiffness signatures along early stages of *Xylella fastidiosa* biofilm formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.075>
- Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2013). Linking microbial functional diversity of olive rhizosphere soil to management systems in commercial orchards in southern Spain. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 181, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.09.021>
- Moriondo, M. (2018). I cambiamenti climatici e la coltivazione dell’olivo nel passato e possibili scenari futuri. In CREA - Agricoltura e Ambiente (Ed.), *Convegno: L’agricoltura italiana di fronte ai cambiamenti climatici: il caso dell’olivicoltura, Roma - 11 giugno 2018.* CREA, Roma.
- Moschettini, C. (1790). *Della Rogna degli Ulivi.* Stamperia Aniello De Dominicis.
- Müller, H., Berg, C., Landa, B. B., Auerbach, A., Moissl-Eichinger, C., & Berg, G. (2015). Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus* antagonists colonize Mediterranean olive trees. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00138>
- Mummey, D. L., Stahl, P. D., & Buyer, J. S. (2002). Soil microbiological properties 20 years after surface mine reclamation: Spatial analysis of reclaimed and undisturbed sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1717–1725. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00158-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00158-X)
- Napoli, R., & Vanino, S. (2011). *Valutazione del rischio di salinizzazione dei suoli e di intrusione marina nelle aree costiere delle regioni meridionali in relazione agli usi irrigui.* 232. <http://dspace.crea.gov.it/handle/inea/445>

- Navarrete, F., & De La Fuente, L. (2014). Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: Decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 1097–1107. <https://doi.org/10.1128/AEM.02998-13>
- Navarrete, F., & De La Fuente, L. (2015). Zinc detoxification is required for full virulence and modification of the host leaf ionome by *Xylella fastidiosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(4), 497–507. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-14-0221-R>
- Navarro, C., Parra, M.A. (2001). Plantación. In *El cultivo del olivo*, Barranco, D., Fernandez-Escobar, R., Rallo, L., (Ed.) Junta de Andalusia (pp. 173–213).
- Nigro, F., Boscia, D., Antelmi, I., & Ippolito, A. (2013). Fungal species associated with a severe decline of olive in southern Italy. In *Journal of Plant Pathology* (Vol. 95, Issue 3, p. 668). <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.034>
- Nigro, F., Gallone, P., Romanazzi, G., Schena, L., Ippolito, A., & Salerno, M. G. (2005). Incidence of *Verticillium* wilt on olive in Apulia and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from infected trees. In *Journal of Plant Pathology* (Vol. 87, Issue 1, pp. 13–23). <https://doi.org/10.4454/jpp.v87i1.892>
- Nobre, M. F., Milton, S., Albuquerque, L., França, L., Rainey, F. A., Schumann, P., Nobre, M. F., & Da Costa, M. S. (2011). *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of Gaiellaceae. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(8), 595–599. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.07.001>
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Norman, J. S., King, G. M., & Friesen, M. L. (2017). *Rubrobacter spartanus* sp. nov., a moderately thermophilic oligotrophic bacterium isolated from volcanic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3597–3602. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002175>
- Nunney, L., Ortiz, B., Russell, S. A., Sánchez, R. R., Stouthamer, R., Ruiz Sánchez, R., & Stouthamer, R. (2014). The complex biogeography of the plant pathogen *xylella fastidiosa*: Genetic evidence of introductions and subspecific introgression in central America. *PLoS ONE*, 9(11), e112463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112463>
- Nunney, L., Schuenzel, E. L., Scally, M., Bromley, R. E., & Stouthamer, R. (2014). Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3025–3033. <https://doi.org/10.1128/AEM.04112-13>
- Olano, C., García, I., González, A., Rodríguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A. F., Méndez, C., & Salas, J. A. (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus*J1074. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 242–256. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12116>
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 4, pp. 252–

263). *Nat Rev Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>

- Oliver, J. E., Cobine, P. A., De, L., & Fuente, L. (2015). *Xylella fastidiosa* Isolates from Both subsp. *multiplex* and *fastidiosa* Cause Disease on Southern Highbush Blueberry (*Vaccinium* sp.) Under Greenhouse Conditions. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-14-0322-FI>
- Oliver, J. E., Sefick, S. A., Parker, J. K., Arnold, T., Cobine, P. A., & De La Fuente, L. (2014). Ionome changes in *Xylella fastidiosa*-infected *Nicotiana tabacum* correlate with virulence and discriminate between subspecies of bacterial isolates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10), 1048–1058. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-14-0151-R>
- Op Den Camp, R. G. L., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, É., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M., & Apel, K. (2003). Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15(10), 2320–2332. <https://doi.org/10.1105/tpc.014662>
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., & Biosca, E. G. (2010). Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. *Research in Microbiology*, 161(7), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.003>
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Pankhurst, C. E., McDonald, H. J., Hawke, B. G., & Kirkby, C. A. (2002). Effect of tillage and stubble management on chemical and microbiological properties and the development of suppression towards cereal root disease in soils from two sites in NSW, Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(6), 833–840. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00014-7)
- Papaïx, J., Burdon, J. J., Zhan, J., & Thrall, P. H. (2015). Crop pathogen emergence and evolution in agro-ecological landscapes. *Evolutionary Applications*. <https://doi.org/10.1111/eva.12251>
- Parent, C., Capelli, N., Berger, A., Crèvecoeur, M., & Dat, J. (2008). An overview of plant responses to soil waterlogging. *Plant Stress*, 2(1), 20–27.
- Parisot, D., Dufresne, M., Veneault, C., Laugé, R., & Langin, T. (2002). *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(2), 139–151. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0744-8>
- Pautasso, M., Petter, F., Rortais, A., & Roy, A. S. (2015). Emerging risks to plant health: A European perspective. In *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* (Vol. 10). CABI International. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510021>
- Pereira Serra, A., Estevão, M., Ii, M., Carina Da Silva, A., Ii, C., Ribeiro, A. C., Iii, D., Jacob, P., & Iii, C. (2011). *Glyphosate influence on nitrogen, manganese, iron, copper and zinc nutritional efficiency in glyphosate resistant soybean*. 41(1), 77–84. <https://periodicos.ufsm.br/cr/article/view/58049>
- Perri, E., Zelasco, S., Benincasa, C., Vizzarri, V., Carbone, F., Lo Feudo, G., Alessandrino, S., Salimonti, A., Romano, E., Pellegrino, M., Godino, G., Zaffina, F., Parise, A. (2016). *Il germoplasma olivicolo del campo collezione del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria Centro di ricerca per l'olivicultura*.

[https://www.soihs.it/public/41/IL\\_GERMOPLASMA\\_26\\_settembre.pdf](https://www.soihs.it/public/41/IL_GERMOPLASMA_26_settembre.pdf)

- Pezeshki, S. R., Pardue, J. H., & Delaune, R. D. (1996). Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. *Tree Physiology*, *16*(4), 453–458. <https://doi.org/10.1093/treephys/16.4.453>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 789–799). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 5, Issue 5, pp. 308–316). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pignatti, S. (1982). *Flora d'Italia*. Edagricole. <http://www.librinlinea.it/titolo/flora-ditalia-anzalone-bruno-pignatti/RAV0076170>
- Pineda, A., Kaplan, I., & Bezemer, T. M. (2017). Steering Soil Microbiomes to Suppress Aboveground Insect Pests. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Issue 9, pp. 770–778). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.002>
- Pineda, A., Zheng, S. J., van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: The role of beneficial soil-borne microbes. In *Trends in Plant Science* (Vol. 15, Issue 9, pp. 507–514). Trends Plant Sci. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.007>
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & C. Gomes, A. (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE*, *9*(1), e85622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085622>
- Polade, S. D., Gershunov, A., Cayan, D. R., Dettinger, M. D., & Pierce, D. W. (2017). Precipitation in a warming world: Assessing projected hydro-climate changes in California and other Mediterranean climate regions. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11285-y>
- Poschenrieder, C., Tolrà, R., & Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends in Plant Science*, *11*(6), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.04.007>
- Powlson, D. S. (1994). The soil microbial biomass: before, beyond and back. In K. E. Ritz, K., Dighton, J., Giller (Ed.), *Beyond the Biomass* (pp. 3–20). Wiley-Sayce, Chichester.
- Pozo, M. J., Van Der Ent, S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *180*(2), 511–523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02578.x>
- Prasad, D., Singh, R., & Singh, A. (2010). Management of sheath blight of rice with integrated nutrients. In *Indian Phytopath* (Vol. 63, Issue 1).
- Primavera, M., D'Oronzo, C., Muntoni, I. M., Radina, F., & Fiorentino, G. (2017). Environment, crops and harvesting strategies during the II millennium BC: Resilience and adaptation in socio-economic systems of Bronze Age communities in Apulia (SE Italy). *Quaternary International*, *436*(436), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.05.070>
- Provenzano, M. R., El-Bilali, H., Simeone, V., Mondelli, D., & Baser, N. (2009). Monitoring of soil

- copper concentrations in different organic farms over a three-year period in Apulia, South-Eastern Italy. *Italian Journal of Agronomy*, 4(1), 41–51. <https://doi.org/10.4081/ija.2009.1.41>
- Purcell, A. H., & Hopkins, D. L. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 34, Issue 1, pp. 131–151). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.131>
- Raghavendra, M. P., & Santhoshkannada, A. N. (2020). *Role of Rhizomicrobiome in Maintaining Soil Fertility and Crop Production* (pp. 373–401). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-44364-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-44364-1_19)
- Ramazzotti, M., Cimaglia, F., Gallo, A., Ranaldi, F., Surico, G., Mita, G., Bleve, G., & Marchi, G. (2018). Insights on a founder effect: The case of *Xylella fastidiosa* in the Salento area of Apulia, Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(1), 8–25. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-22263](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22263)
- Ramírez-puebla, S. T., Servín-Garcidueñas, L. E., Jiménez-marín, B., Bolaños, L. M., Rosenblueth, M., Martínez, J., Rogel, M. A., Ormeño-orriillo, E., & Martínez-romero, E. (2013). Gut and root microbiota commonalities. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 79, Issue 1, pp. 2–9). Appl Environ Microbiol. <https://doi.org/10.1128/AEM.02553-12>
- Randall, J. J., Goldberg, N. P., Kemp, J. D., Radionenko, M., French, J. M., Olsen, M. W., & Hanson, S. F. (2009). Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the Southwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5631–5638. <https://doi.org/10.1128/AEM.00609-09>
- Rapicavoli, J. N., Blanco-Ulate, B., Muszyński, A., Figueroa-Balderas, R., Morales-Cruz, A., Azadi, P., Dobruchowska, J. M., Castro, C., Cantu, D., & Roper, M. C. (2018). Lipopolysaccharide O-antigen delays plant innate immune recognition of *Xylella fastidiosa*. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02861-5>
- Reale, S., Doveri, S., Díaz, A., Angiolillo, A., Lucentini, L., Pilla, F., Martín, A., Donini, P., & Lee, D. (2006). SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome*, 49(9), 1193–1205. <https://doi.org/10.1139/G06-068>
- Regione Puglia - Osserv. Fitosanitario. (2019). *Monitoraggio batterio Xylella fastidiosa*.
- Reinhold-Hurek, B., Bünger, W., Burbano, C. S., Sabale, M., & Hurek, T. (2015). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 403–424. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102342>
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: Bacterial endophytes. In *Current Opinion in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>
- Ren, Y. Y., & West, C. A. (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology*, 99(3), 1169–1178. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1169>
- Ricciolini, M., Rizzo, D. (2010). *Avversità dell'olivo e strategie di difesa in Toscana*. [www.arsia.toscana.it](http://www.arsia.toscana.it)
- Riffaldi, R., Saviozzi, A., & Levi-Minzi, R. (1996). Carbon mineralization kinetics as influenced by soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, 22(4), 293–298. <https://doi.org/10.1007/BF00334572>

- Ritchie, D. F. (1991). Copper- and Streptomycin-Resistant Strains and Host Differentiated Races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pd-75-0733>
- Rodrigues, M. Â., Lopes, J. I., Ferreira, I. Q., & Arrobas, M. (2018). Olive tree response to the severity of pruning. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *42*(2), 103–113. <https://doi.org/10.3906/tar-1708-56>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *2016*(10), e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K. M., Siewers, V., Tenberge, K. B., Tudzynski, B., & Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: The major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology*, *5*(1), 17–27. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00201.x>
- Roper, C., Castro, C., & Ingel, B. (2019). *Xylella fastidiosa*: bacterial parasitism with hallmarks of commensalism. *Current Opinion in Plant Biology*, *50*, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.05.005>
- Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. M., & Kirkpatrick, B. C. (2007). Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(22), 7252–7258. <https://doi.org/10.1128/AEM.00895-07>
- Rotundo, G., De Cristofaro, A. (2003). Fitofagi dell'olivo. In Fiorino P. (Ed.), *Olea - Trattato di Olivicoltura* (I, pp. 411–435). Edagricole.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, *148*(3), 1547–1556. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127613>
- Ruiz, N., Barranco, D., & Rapoport, H. F. (2006). Anatomical response of olive (*Olea europaea* L.) to freezing temperatures. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *81*(5), 783–790. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512138>
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. In *Plant Cell* (Vol. 8, Issue 10, pp. 1809–1819). American Society of Plant Physiologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809>
- Sabella, E., Aprile, A., Genga, A., Siciliano, T., Nutricati, E., Nicolì, F., Vergine, M., Negro, C., De Bellis, L., & Luvisi, A. (2019). Xylem cavitation susceptibility and refilling mechanisms in olive trees infected by *Xylella fastidiosa*. *Scientific Reports*, *9*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46092-0>
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1503–1509. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>
- Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Poole, P. S., & Tkacz, A. (2017). Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 38, pp. 188–196). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.07.001>

- Sanzani, S. M., Schena, L., Nigro, F., Sergeeva, V., Ippolito, A., & Salerno, M. G. (2012). Abiotic diseases of olive. In *Journal of Plant Pathology* (Vol. 94, Issue 3, pp. 469–491). <https://doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.069>
- Saponari, M., Boscia, D., Altamura, G., D'Attoma, G., Cavalieri, V., Zicca, S., Morelli, M., Tavano, D., Loconsole, G., Susca, L., Potere, O., Savino, V., Martelli, G. P., Palmisano, F., Dongiovanni, C., Saponari, A., Fumarola, G., & Carolo, M. Di. (2017). Pilot project on *Xylella fastidiosa* to reduce risk assessment uncertainties. *EFSA Supporting Publications*, 13(3). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.en-1013>
- Saponari, M., Boscia, D., Altamura, G., Loconsole, G., Zicca, S., D'Attoma, G., Morelli, M., Palmisano, F., Saponari, A., Tavano, D., Savino, V. N., Dongiovanni, C., & Martelli, G. P. (2017). Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17957-z>
- 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). In *Journal of Plant Pathology* (Vol. 95, Issue 3, p. 668). <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.035>
- Saponari, Maria, Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R. K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G. P., Krugner, R., & Porcelli, F. (2014). Infectivity and Transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *J. Econ. Entomol*, 107(4), 1316–1319. <https://doi.org/10.1603/EC14142>
- Sardaro, R., Acciani, C., De Gennaro, B., Fucilli, V., & Roselli, L. (2015). Valutazione dell'impatto economico e paesaggistico causato da *Xylella fastidiosa* sull'olivicoltura del Salento. In *Elementi giuridici, urbanistici e economico-estimativi* (pp. 345–372). [https://www.academia.edu/29271452/Valutazione\\_dell\\_impatto\\_economico\\_e\\_paesaggistico\\_causato\\_da\\_Xylella\\_fastidiosa\\_sull\\_olivicoltura\\_del\\_Salento](https://www.academia.edu/29271452/Valutazione_dell_impatto_economico_e_paesaggistico_causato_da_Xylella_fastidiosa_sull_olivicoltura_del_Salento)
- Savary, S., Nelson, A., Sparks, A. H., Willocquet, L., Duveiller, E., Mahuku, G., Forbes, G., Garrett, K. A., Hodson, D., Padgham, J., Pande, S., Sharma, M., Yuen, J., & Djurle, A. (2011). International agricultural research tackling the effects of global and climate changes on plant diseases in the developing world. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0316>
- Sayler, R. J., & Kirkpatrick, B. C. (2003). The effect of copper sprays and fertilization on bacterial canker in French prune. *Canadian Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1080/07060660309507097>
- Scala, V., Pucci, N., Salustri, M., Modesti, V., L'Aurora, A., Scortichini, M., Zaccaria, M., Momeni, B., Reverberi, M., & Loreti, S. (2019). Bacterial and plant produced lipids can exacerbate the Olive Quick Decline Syndrome caused by *Xylella*. In *bioRxiv* (p. 867523). <https://doi.org/10.1101/867523>
- Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., & Mercado-Blanco, J. (2012). Genetic Responses Induced in Olive Roots upon Colonization by the Biocontrol Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PLoS ONE*, 7(11), e48646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048646>
- Schlaeppli, K., & Bulgarelli, D. (2015). The plant microbiome at work. In *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 28, Issue 3, pp. 212–217). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0334-FI>

- Schlaeppli, K., Dombrowski, N., Oter, R. G., Ver Loren Van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2014). Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(2), 585–592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321597111>
- Schlöter, M., Dilly, O., & Munch, J. C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *98*(1–3), 255–262. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00085-9)
- Schnug, E., Haneklaus, S., Borchers, A., & Polle, A. (1995). Relations between sulphur supply and glutathione and ascorbate concentrations in *Brassica napus*. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, *158*(1), 67–69. <https://doi.org/10.1002/jpln.19951580113>
- Scortichini, M. (2020a). The Multi-Millennial Olive Agroecosystem of Salento (Apulia, Italy) Threatened by *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*: A Working Possibility of Restoration. *Sustainability*, *12*(17), 6700. <https://doi.org/10.3390/su12176700>
- Scortichini, M. (2020b). Predisposing Factors for “Olive Quick Decline Syndrome” in Salento (Apulia, Italy). *Agronomy*, *10*(9), 1445. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091445>
- Scortichini, M., & Cesari, G. (2019). An Evaluation of Monitoring Surveys of the Quarantine Bacterium *Xylella fastidiosa* Performed in Containment and Buffer Areas of Apulia, Southern Italy. *Applied Biosafety*, *24*(2), 96–99. <https://doi.org/10.1177/1535676019845738>
- Scortichini, M., Chen, J., De Caroli, M., Dalessandro, G., Pucci, N., Modesti, V., L’Aurora, A., Petriccione, M., Zampella, L., Mastrobuoni, F., Migoni, D., Del Coco, L., Girelli, C. R., Piacente, F., Cristella, N., Marangi, P., Laddomada, F., Di Cesare, M., Cesari, G., ... Loreti, S. (2018). A zinc, copper and citric acid biocomplex shows promise for control of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* in olive trees in Apulia region (southern Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, *57*(1), 48–72. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-21985](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-21985)
- Scortichini, M., Migoni, D., Angilè, F., Del Coco, L., Girelli, C. R., Zampella, L., Mastrobuoni, F., & Fanizzi, F. P. (2019). *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* on olive in Salento (Southern Italy): Infected trees have low in planta micronutrient content. *Phytopathologia Mediterranea*, *58*(1), 39–48. [https://doi.org/10.13128/Phytopathol\\_Mediterr-24212](https://doi.org/10.13128/Phytopathol_Mediterr-24212)
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, *12*(6). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Seguí EM, G. M. (1996). Métodos de control de las bacteriosis. In Phytoma-España (Ed.), *Patología vegetal* (pp. 653–678). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=309036>
- Sequi, P., Picci, G., Nannipieri, P., & Angeli, F. (2002). *Metodi di Analisi Microbiologica del Suolo*. 1–125.
- Servizio Agricoltura Reg. Puglia. (2011). *Indicazioni delle strategie di controllo da adottare per contenere le infezioni della “lebbra delle olive”*.
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E. A., Salles, J. F., Van Elsas, J. D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B. R., Wang-Pruski, G., & Nowak, J. (2005). *Burkholderia phytotumescens* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>

- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessaraki, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shi, S., Nuccio, E. E., Zhou, †, Shi, J., He, Z., Zhou, J., & Firestone, M. K. (2016). *The interconnected rhizosphere: High network complexity dominates rhizosphere assemblages*. <https://doi.org/10.1111/ele.12630>
- Sicard, A., Zeilinger, A. R., Vanhove, M., Schartel, T. E., Beal, D. J., Daugherty, M. P., & Almeida, R. P. P. (2018). *Xylella fastidiosa*: Insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 56(June), 181–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045849>
- Silva-Stenico, M. E., Pacheco, F. T. H., Pereira-Filho, E. R., Rodrigues, J. L. M., Souza, A. N., Etcheagaray, A., Gomes, J. E., & Tsai, S. M. (2009). Nutritional deficiency in citrus with symptoms of citrus variegated chlorosis disease. *Brazilian Journal of Biology*, 69(3), 859–864. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000400013>
- Simon, U. K., Polanschütz, L. M., Koffler, B. E., & Zechmann, B. (2013). High Resolution Imaging of Temporal and Spatial Changes of Subcellular Ascorbate, Glutathione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Distribution during *Botrytis cinerea* Infection in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 8(6), e65811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065811>
- Sivakala, K. K., Jose, P. A., Anandham, R., Thinesh, T., Robinson, S., Jebakumar, D., Samaddar, S., Chatterjee, P., Sivakumar, N., & Sa, T. (2018). *Spatial Physicochemical and Metagenomic Analysis of Desert Environment*. 28(9), 1517–1526.
- Soares, C., Carvalho, M. E. A., Azevedo, R. A., & Fidalgo, F. (2019). Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 4–25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.009>
- Soltani, A.-A., Khavazi, K., Asadi-Rahmani, H., Omidvari, M., Abaszadeh Dahaji, P., & Mirhoseyni, H. (2010). Plant Growth Promoting Characteristics in Some Flavobacterium spp. Isolated from Soils of Iran. *Journal of Agricultural Science*. <https://doi.org/10.5539/jas.v2n4p106>
- Sosnowski, M. R., Fletcher, J. D., Daly, A. M., Rodoni, B. C., & Viljanen-Rollinson, S. L. H. (2009). Techniques for the treatment, removal and disposal of host material during programmes for plant pathogen eradication. In *Plant Pathology* (Vol. 58, Issue 4, pp. 621–635). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02042.x>
- Springer, U.; Kljkee, J., & Springer, U. and Kljkee, J. (1954). Prüfung der Leistungsfähigkeit von einigen wichtigen Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs mittels Chromschwefelsäure sowie Vorschlag einer neuen Schnellmethode. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 64, 1–26.
- Steenackers, J., Steenackers, M., Steenackers, V., & Stevens, M. (1996). Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass and Bioenergy*. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(95\)00121-2](https://doi.org/10.1016/0961-9534(95)00121-2)
- Stefani, E., & Boscia, D. (2019). *Xylella fastidiosa* : il patogeno , le malattie e l' attuale situazione fitosanitaria. *Natura e Montagna*, 56:2(2019), 12–25. <http://www.naturalisti-ubn.it/wp-content/uploads/2020/05/Indice-dei-fascicoli.pdf>

- Stefanouadaki, E., Chartzoulakis, K., Koutsaftakis, A., & Kotsifaki, F. (2007). *Effect of drought stress on qualitative characteristics of olive oil of c v Koroneiki*.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van den Bosch, R., & Hagen, K. S. (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: The integrated control concept. *Hilgardia*, 29(2), 81–101. <https://doi.org/10.3733/hilg.v29n02p081>
- Sun, Q., Sun, Y., Andrew Walker, M., & Labavitch, J. M. (2013). Vascular occlusions in grapevines with Pierce's disease make disease symptom development worse. *Plant Physiology*, 161(3), 1529–1541. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208157>
- Sundström, J. F., Albiñ, A., Boqvist, S., Ljungvall, K., Marstorp, H., Martiin, C., Nyberg, K., Vågsholm, I., Yuen, J., & Magnusson, U. (2014). Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases - a risk analysis in three economic and climate settings. *Food Security*. <https://doi.org/10.1007/s12571-014-0331-y>
- Surico, G. (2015). *Xylella fastidiosa: il "batterio killer" degli olivi | Scienza in rete*. <https://www.scienzainrete.it/contenuto/articolo/giuseppe-surico/xylella-fastidiosa-batterio-killer-degli-olivi/maggio-2015>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. In *Plant Science* (Vol. 267, pp. 102–111). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Tagliavini M., Ronchi B., Grignani C., Corona P., Tognetti R., Dalla Rosa M., Sambo P., Gerbi V., Pezzotti M., Marangon F., M. M. (2019). *L'intensificazione sostenibile nell'agricoltura italiana - La posizione dell'Associazione Italiana delle Società Scientifiche Agrarie (AISSA)*.
- Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, G. M., TAKIKAWA, Y., SERIZAWA, S., ICHIKAWA, T., TSUYUMU, S., & GOTO, M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 55(4), 437–444. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.55.437>
- Teatro Naturale. (2017). *Il triplo stress che sta colpendo l'olivo: alte temperature, carenza d'acqua, elevata irradiazione luminosa*. <https://www.teatronaturale.it/strettamente-tecnico/l-arca-olearia/24823-il-triplo-stress-che-sta-colpendo-l-olivo-alte-temperature-carenza-d-acqua-elevata-irradiazione-luminosa.htm>
- Teviotdale, B. L., & Krueger, W. H. (2004). Effects of timing of copper sprays, defoliation, rainfall, and inoculum concentration on incidence of olive knot disease. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.131>
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. In *Current Opinion in Plant Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00063-3)
- Tioli, E. (2018). *Di veleni, prima che di Xylella, morirà il Salento*. 2018-05-16. <http://www.vivicomemangi.it/veleni-xylella-morira-salento/>
- Tittarelli F., Neri U., Poletti P., Lacertosa G., Raus R. (2002). Monitoraggio dello stato nutrizionale dell'olivo. *L'Informatore Agrario*, 44, 39–51.
- Tognetti, R., D'Andria, R., Sacchi, R., Lavini, A., Morelli, G., & Alvino, A. (2007). Deficit irrigation affects seasonal changes in leaf physiology and oil quality of *Olea europaea* (cultivars Frantoio

and Leccino). *Annals of Applied Biology*, 150(2), 169–186. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2007.00117.x>

- Tooke H.L., Vanetten C.H., Daxenbichler M.E. (1980). Glucosinolates. In *Toxic constituents of plant foodstuffs* (pp. 103–142). Academic Press.
- Torsvik, V., Øvreås, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. In *Science* (Vol. 296, Issue 5570, pp. 1064–1066). Science. <https://doi.org/10.1126/science.1071698>
- Triki, M., Hadj-Taieb, S., Mellouli, I., Rhouma, A., Gdoura, R., & Hassaïri, A. (2012). *Identification and screening of bacterial isolates from Saharan weeds for Verticillium dahliae control*. Journal of Plant Pathology. <https://www.jstor.org/stable/45156039?seq=1>
- Trivedi, P., Spann, T., & Wang, N. (2011). Isolation and Characterization of Beneficial Bacteria Associated with Citrus Roots in Florida. *Microbial Ecology*, 62(2), 324–336. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9822-y>
- Trumbore, S. E., & Czimczik, C. I. (2008). Geology: An uncertain future for soil carbon. In *Science* (Vol. 321, Issue 5895, pp. 1455–1456). <https://doi.org/10.1126/science.1160232>
- Tulipano L., F. M. D. (1989). Temperature of groundwaters in coastal aquifers: some aspects concerning salt-water intrusion. *Proc. 10th Salt-Water Intrusion Meeting, Ghent*, 308–316.
- University of California Agriculture and Natural Resources. (2019). *What Is Integrated Pest Management (IPM)? / UC Statewide IPM Program (UC IPM)*. <https://www2.ipm.ucanr.edu/What-is-IPM/>
- Uroz, S., Courty, P. E., & Oger, P. (2019). Plant Symbionts Are Engineers of the Plant-Associated Microbiome. In *Trends in Plant Science* (Vol. 24, Issue 10, pp. 905–916). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.008>
- Van der Ent, S., Van Wees, S. C. M., & Pieterse, C. M. J. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. In *Phytochemistry* (Vol. 70, Issues 13–14, pp. 1581–1588). Phytochemistry. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.009>
- Van Der Ent, S., Verhagen, B. W. M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M. G., Pel, M. J. C., Joosten, R. G., Proveniers, M. C. G., Van Loon, L. C., Ton, J., & Pieterse, C. M. J. (2008). MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1293–1304. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113829>
- Van Der Putten, W. H. (2017). Belowground drivers of plant diversity: Feedbacks between soil microbes and plants affect the diversity of plant communities. In *Science* (Vol. 355, Issue 6321, pp. 134–135). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aal4549>
- Van Oosten, V. R., Bodenhausen, N., Reymond, P., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., Dicke, M., & Pieterse, C. M. J. (2008). Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 919–930. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-7-0919>
- Van Os, G. J., & Van Ginkel, J. H. (2001). Suppression of Pythium root rot in bulbous iris in relation to biomass and activity of the soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1447–1454. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00053-0)

- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 11, Issue 4, pp. 443–448). Curr Opin Plant Biol. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. In *New Phytologist* (Vol. 206, Issue 4, pp. 1196–1206). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J. F., Jacques, M. A., Lebrun, M. H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M. A., Roumagnac, P., & Candresse, T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome new concepts in the light of meta-omics. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00029>
- Vergine, M., Meyer, J. B., Cardinale, M., Sabella, E., Hartmann, M., Cherubini, P., De Bellis, L., & Luvisi, A. (2020). The xylella fastidiosa-resistant olive cultivar “leccino” has stable endophytic microbiota during the olive quick decline syndrome (OQDS). *Pathogens*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010035>
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C. A., Cook, R. J., & Browse, J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7209–7214. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7209>
- Vizzarri, V. (2018). L’impatto del cambiamento climatico sulle malattie dell’olivo. In CREA-Agricoltura e Ambiente (Ed.), *Convegno: L’agricoltura italiana di fronte ai cambiamenti climatici: il caso dell’olivicoltura, Roma - 11 giugno 2018*. CREA, Roma.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of Streptomyces spp. as Endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 952. <https://doi.org/10.3390/ijms19040952>
- Vurukonda, S. S. K. P., Mandrioli, M., D’Apice, G., & Stefani, E. (2020). Draft Genome Sequence of Plant Growth-Promoting Streptomyces sp. Strain SA51, Isolated from Olive Trees. *Microbiology Resource Announcements*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mra.00768-19>
- Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., & Robinson, N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. In *Nature* (Vol. 460, Issue 7257, pp. 823–830). Nature. <https://doi.org/10.1038/nature08300>
- Wei, Z., & Jousset, A. (2017). Plant Breeding Goes Microbial. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Issue 7, pp. 555–558). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.009>
- Wick, B., Kühne, R. F., & Vlek, P. L. G. (1998). Soil microbiological parameters as indicators of soil quality under improved fallow management systems in south-western Nigeria. *Plant and Soil*, 202(1), 97–107. <https://doi.org/10.1023/A:1004305615397>
- Wimalajeewa, D. L. S., Cahill, R., Hepworth, G., Schneider, H. G., & Washbourne, J. W. (1991). Chemical control of bacterial canker (*Pseudomonas syringae* PV. *Syringae*) of apricot and cherry in victoria. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. <https://doi.org/10.1071/EA9910705>
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P.,

- Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*, 458(7238), 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature07840>
- Workneh, F., van Bruggen, A.H.C., Drinkwater, L.E., Shennan, C., & Workneh, F. (1993). Variables Associated with Corky Root and Phytophthora Root Rot of Tomatoes in Organic and Conventional Farms. *Phytopathology*, 83(5), 581. <https://doi.org/10.1094/phyto-83-581>
- Xiloyannis, C., Dichio, B., Sofò, A., Palese, A. M. (2004). Capacità di adattamento dell'olivo agli ambienti siccitosi. *Informatore Agrario 40/2004, Speciale O*, 43–45.
- Xiloyannis, C., Dichio, B., Nuzzo, V., & Celano, G. (1999). Defence strategies of olive against water stress. *Acta Horticulturae*, 474(474), 423–426. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.474.86>
- Xiloyannis, C., Lardo, E., Sofò, A., & Palese, A. M. (2015). Contro Xylella su olivo le buone pratiche agronomiche. *L'Informatore Agrario*, 19, 49–54. <http://www.trnews.it/wp-content/uploads/2015/05/articolo-Xiloyannis.pdf>
- Yakovchenko, V., Sikora, L. J., & Kaufman, D. D. (1996). A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 21(4), 245–251. <https://doi.org/10.1007/BF00334899>
- Yang, J. W., Yi, H.-S., Kim, H., Lee, B., Lee, S., Ghim, S.-Y., & Ryu, C.-M. (2011). Whitefly infestation of pepper plants elicits defence responses against bacterial pathogens in leaves and roots and changes the below-ground microflora. *Journal of Ecology*, 99(1), 46–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01756.x>
- Yuan, M., Wang, S., Chu, Z., Li, X., & Xu, C. (2010). The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell*, 22(9), 3164–3176. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078022>
- Yunis, H. (1980). Weather Dependence, Yield Losses, and Control of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas tomato*. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pd-64-937>
- Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. In *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 25, Issue 2, pp. 139–150). <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0179>
- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. A., Mills, D. A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D., & Gilbert, J. A. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>
- Zechmann, B., Zellnig, G., & Müller, M. (2005). Changes in the subcellular distribution of glutathione during virus infection in *Cucurbita pepo* (L.). *Plant Biology*, 7(1), 49–57. <https://doi.org/10.1055/s-2004-830477>
- Zechmann, B., Zellnig, G., Urbanek-Krajnc, A., & Müller, M. (2007). Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L. plants. *Archives of Virology*, 152(4), 747–762. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0880-2>
- Zechmann, Bernd, & Müller, M. (2008). Effects of zucchini yellow mosaic virus infection on the subcellular distribution of glutathione and its precursors in a highly tolerant *Cucurbita pepo* cultivar. In *Botany* (Vol. 86, Issue 9, pp. 1092–1100). <https://doi.org/10.1139/B08-048>

- Zelasco, S. (2018). Il cambiamento climatico e le nuove sfide dell'olivicoltura. In CREA - Agricoltura e Ambiente (Ed.), *Convegno: L'agricoltura italiana di fronte ai cambiamenti climatici: il caso dell'olivicoltura, Roma - 11 giugno 2018*. CREA, Roma.
- Zhang, H., Xue, Y., Wang, Z., Yang, J., & Zhang, J. (2009). Morphological and physiological traits of roots and their relationships with shoot growth in "super" rice. *Field Crops Research*. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.04.004>
- Zicca, S., De Bellis, P., Masiello, M., Saponari, M., Saldarelli, P., Boscia, D., & Sisto, A. (2020). Antagonistic activity of olive endophytic bacteria and of *Bacillus* spp. strains against *Xylella fastidiosa*. *Microbiological Research*, 236, 126467. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126467>
- Zito G., R. L. & Z. F. (1991). Zone climatiche omogenee della Puglia. *Atti 2° Colloquio Approcci Metodologici per La Definizione Dell'ambiente Fisico e Biologico Mediterraneo, Castro Marina, 19-22 Novembre 1988*.