

Xylella fastidiosa: biologia del patogeno

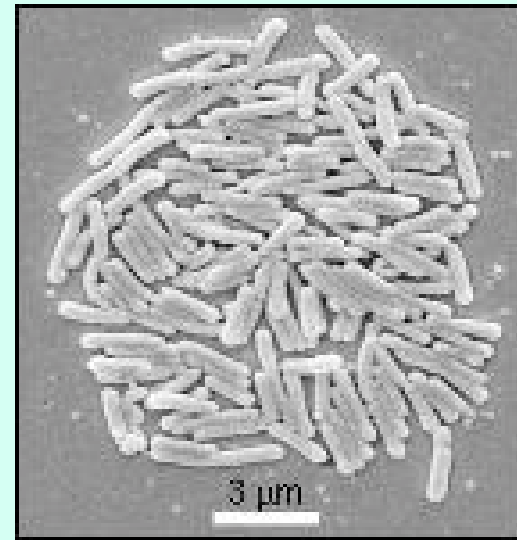
Maria SAPONARI & Donato BOSCIA



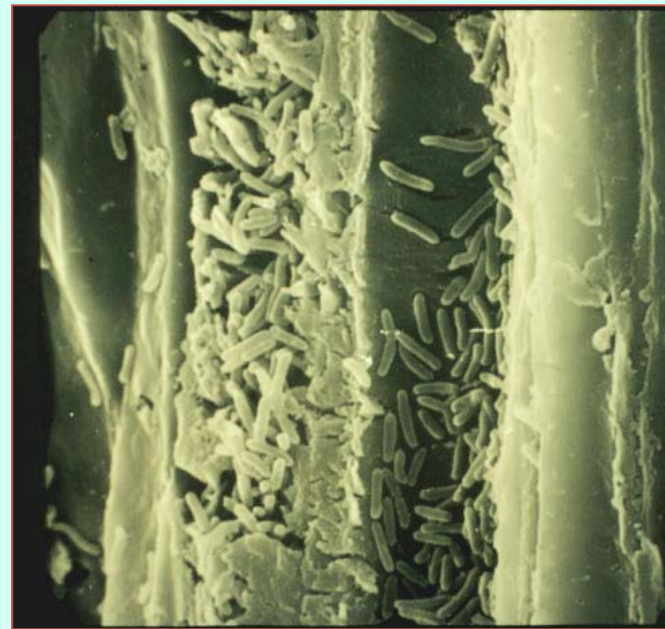
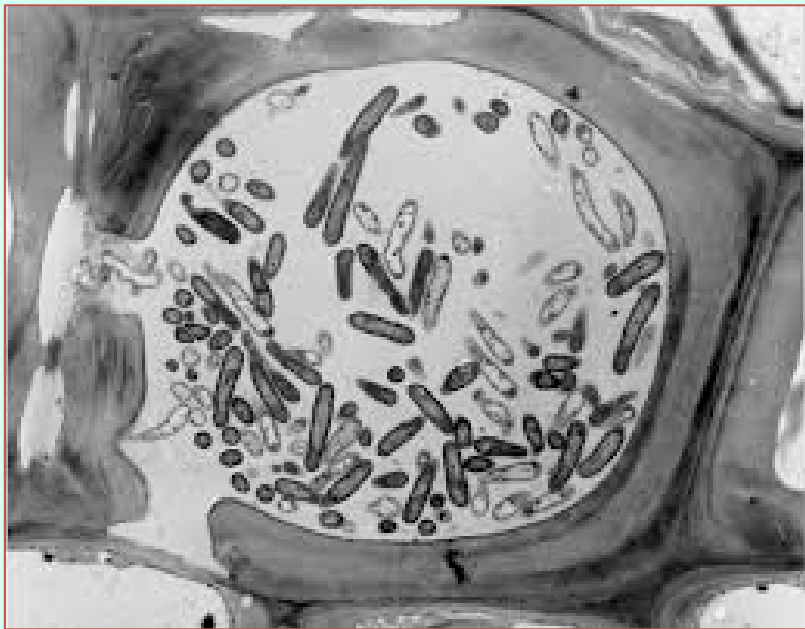
Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piant
Consiglio Nazionale delle Ricerche



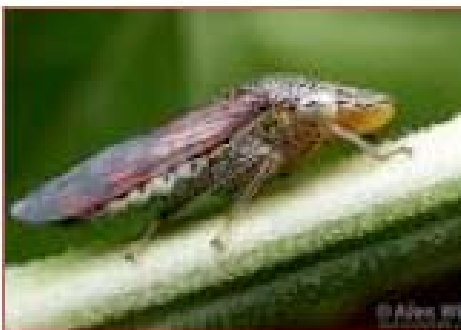
Xylella fastidiosa è un batterio Gram-negativo, asporigeno,
di difficile coltivazione in coltura



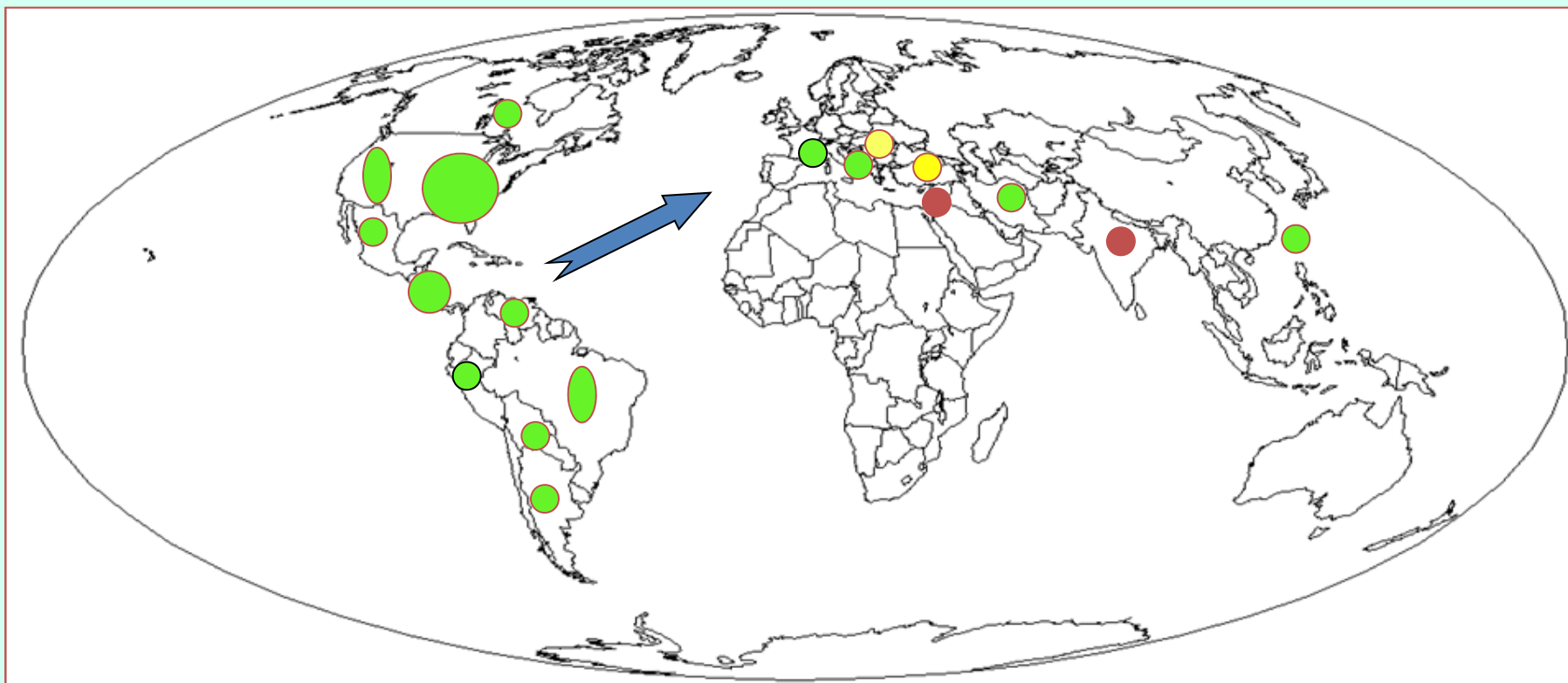
Si localizza nei vasi legnosi delle piante ospiti



Viene diffuso in natura da numerose specie di cicaline
(Homoptera:Cicadellidae)



Ha un'ampia distribuzione geografica



● Segnalazioni confermate

● Segnalazioni da confermare

● Segnalazioni inattendibili

Canada (4 Stati)
USA (30 Stati)
Messico
Taiwan

Costa Rica
Brasile
Equador

Argentina
Paraguay
Venezuela **Francia**

Italia
Iran

Turchia
Kosovo

Libano
India

Ha una gamma di ospiti naturali costituita da
75 famiglie, 204 generi, per un totale di 359 specie.
E' agente di gravi malattie di molte colture,
soprattutto arboree

Malattia di Pierce



È una malattia che uccide le viti e non ne permette
la coltivazione in vaste aree degli USA e del Golfo
del Messico

Clorosi variegata degli Agrumi (Brasile, Argentina, Centro America)



Riduzione della pezzatura

Phony peach (pesca fasulla) (Sud-est degli USA)



Frutti e ramo di una pianta infetta

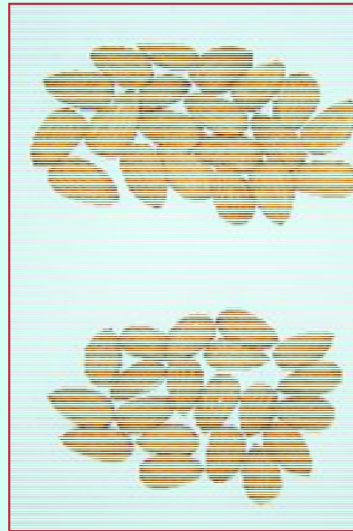
Frutti e ramo di una pianta sana



Brusca delle drupacee



Mandorlo



Ciliegio

Brusca fogliare di piante boschive e da ombra

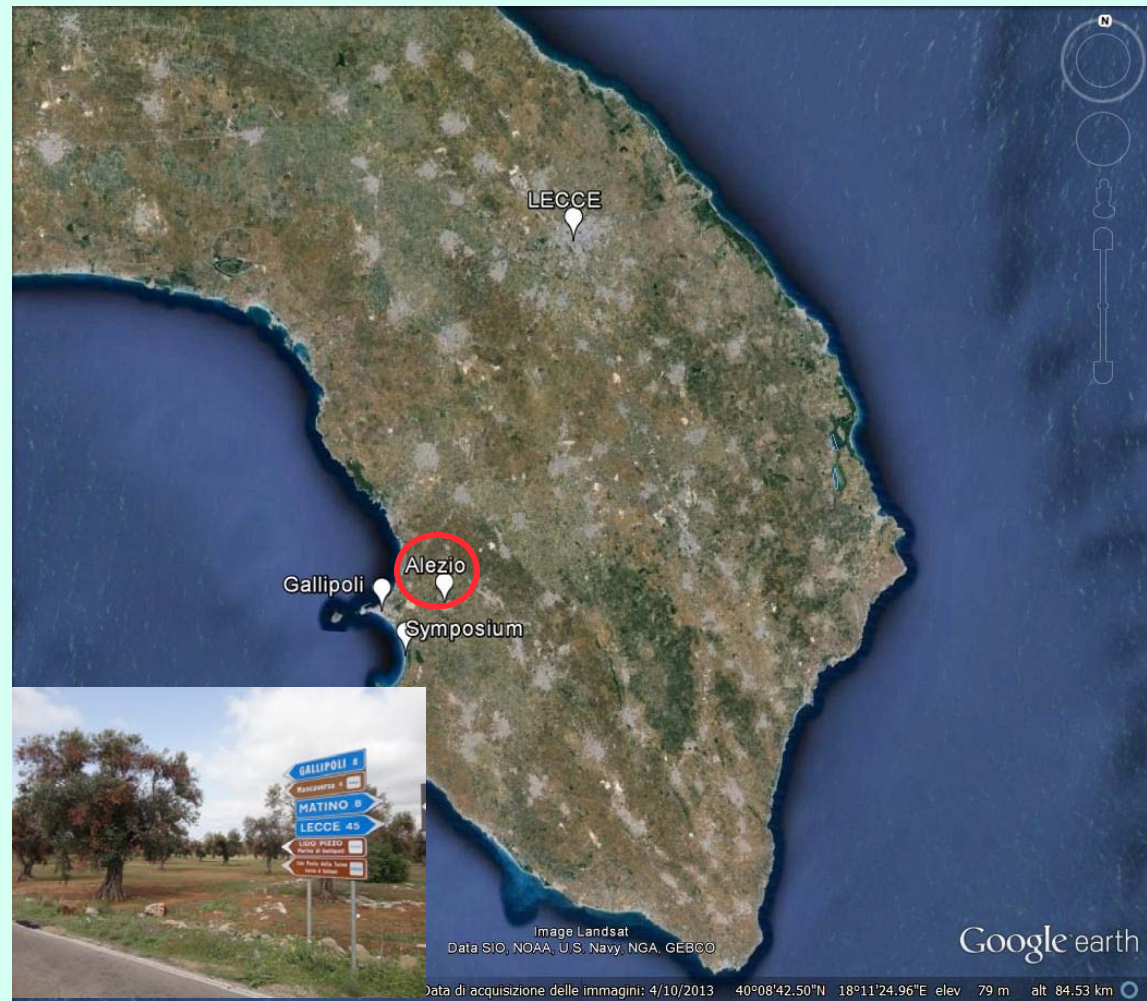


IL “DISSECCAMENTO RAPIDO” DELL’ OLIVO





Dove ha preso avvio la malattia?









Manifestazioni settoriali



**Negli oliveti colpiti dal “disseccamento rapido”
TUTTE le piante sono sintomatiche**







La malattia interessa anche piante giovani



2010



2013



2010



© 2013 Google
© 2013 Google

Google earth

2013





Esito finale di un attacco di "disseccamento rapido". Le piante sono state potate severamente nella speranza di farle rivegetare



La parte area è disseccata ma le piante non sono morte e ricacciano dalla base

Quando è iniziata?

Intorno al 2008-2010?

Prime ipotesi:

- (i) lebbra (*Colletotrichum* spp.)
- (ii) Rodilegno giallo (*Zeuzera pyrina*)
- (iii) Inquinamento della falda
- (iv) Uso eccessivo di diserbanti e pesticidi
- (v) Abbandono degli oliveti
- (vi) Marciumi radicali....

La sgradita sorpresa (Autunno 2013)

Identificazione di *Xylella fastidiosa* in piante sintomatiche

Journal of Plant Pathology (2013), 95 (3), 659-668

DISEASE NOTE

**IDENTIFICATION OF DNA SEQUENCES
RELATED TO *XYLELLA FASTIDIOSA* IN
OLEANDER, ALMOND AND OLIVE TREES
EXHIBITING LEAF SCORCH SYMPTOMS
IN APULIA (SOUTHERN ITALY)**

M. Saponari¹, D. Boscia¹, F. Nigro² and G.P. Martelli^{1,2}

Nuova ipotesi (2013)

La malattia, chiamata

“Complesso del disseccamento rapido dell’olivo (CoDiRO)”

potrebbe essere causata dall'azione concomitante di tre fattori

1

Rodilegno giallo (*Zeuzera pyrina*)



Adult



Larva



Entrance of the galleries drilled in the branches



Galleries in a trunk

2

Diverse specie di funghi lignicoli

Journal of Plant Pathology (2013), 95 (3), 659-668

DISEASE NOTE

FUNGAL SPECIES ASSOCIATED WITH A SEVERE DECLINE OF OLIVE IN SOUTHERN ITALY

F. Nigro¹, D. Boscia², I. Antelmi¹ and A. Ippolito¹

Phaeoacremonium parasiticum in olive

Cross-sectioned olive branch
showing necrotic sapwood
colonized by *P. parasiticum*



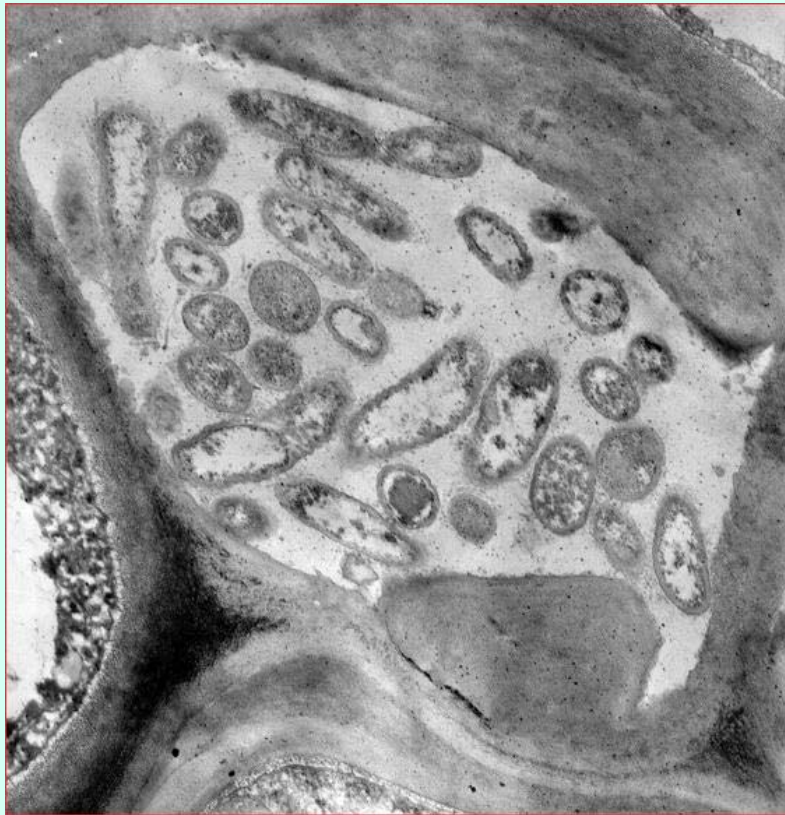
Necroses start from the
moth galleries



3

Xylella fastidiosa

Cellule batteriche all'interno
Di un vaso xilematico di olivo



Parete cellulare rugosa tipica
Di cellule di *X. fastidiosa*



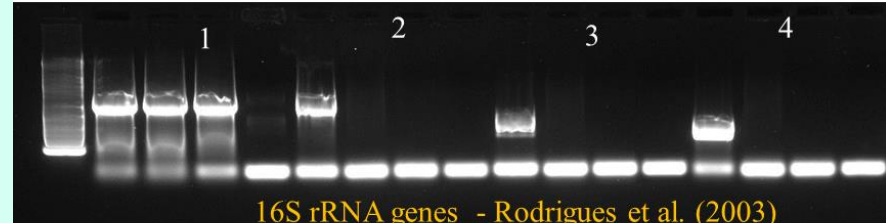
Identificazione di *Xylella fastidiosa* in olivo

Osservazioni dirette al microscopio elettronico e tecniche di diagnosi sierologiche e molecolari hanno consentito di identificare nei tessuti di olivo (picciolo e nervature fogliari) *X. fastidiosa*.

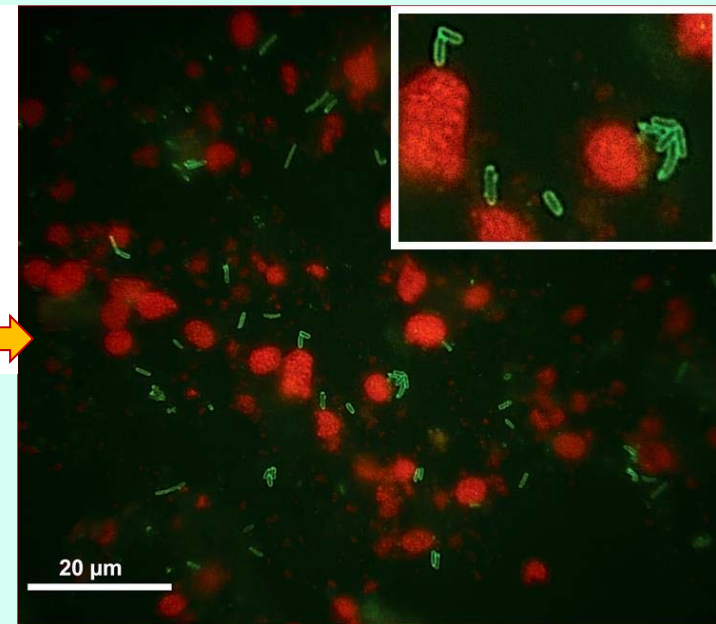


Cellule batteriche all'interno di vasi xilematici

Visualizzazione in immunofluorescenza di cellule batteriche estratte da picciolo



1. 16S Universal for bacteria
2. 16S Xylella-specific (0067-1439)
3. 16S Xylella-specific (0067-0838A)
4. 16S Xylella-specific (08385-1439)

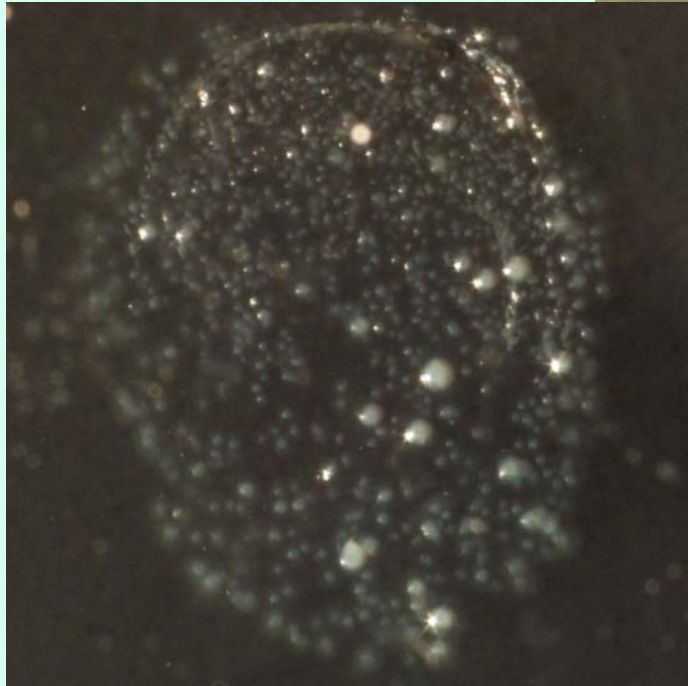
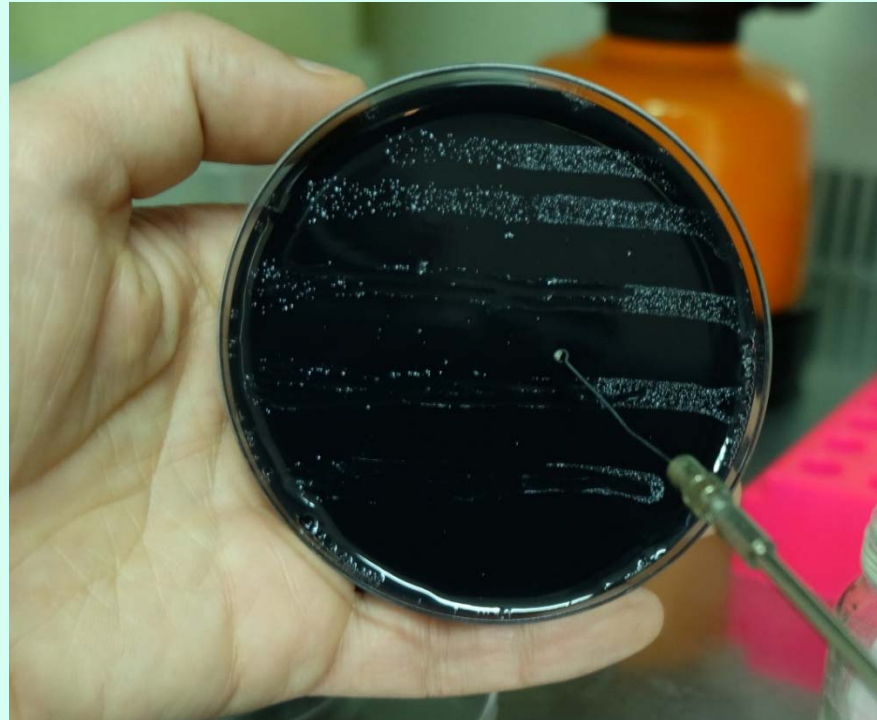


Lo studio della patogenicità

2014

- Isolamento e coltura del ceppo CoDiRO da piante infette (olivo, oleandro, etc.)

Collaborazione con ricercatori USA e Brasiliani



Lo studio della patogenicità

- Procedura sperimentale
 - Inoculazione con l'ago
 - Moltiplicazione iniziale
 - Movimento sistemico
 - Isolamento di cellule vive
 - Sviluppo dei sintomi



Piante inoculate (fine 2014)

Host plants

Olivo (Coratina, Frantoio, Leccino, Cellina di Nardo',
semenzali)

Oleandro

Vitis vinifera (Cabernet Sauvignon)

Prunus spp (12 cultivars)

Polygala myrtifolia

Citrus spp.

Quercus ilex

**EFSA Pilot project on *Xylella fastidiosa* to reduce
risk assessment uncertainties-
NP/EFSA/ALPHA/2014/07)**

Grandezza delle piante inoculate



Grandezza delle piante inoculate



Quercus ilex



Polygala myrtifolia



Drupacee

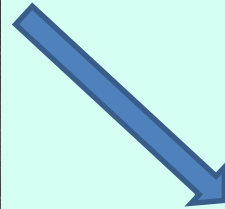




Prink inoculations: procedure

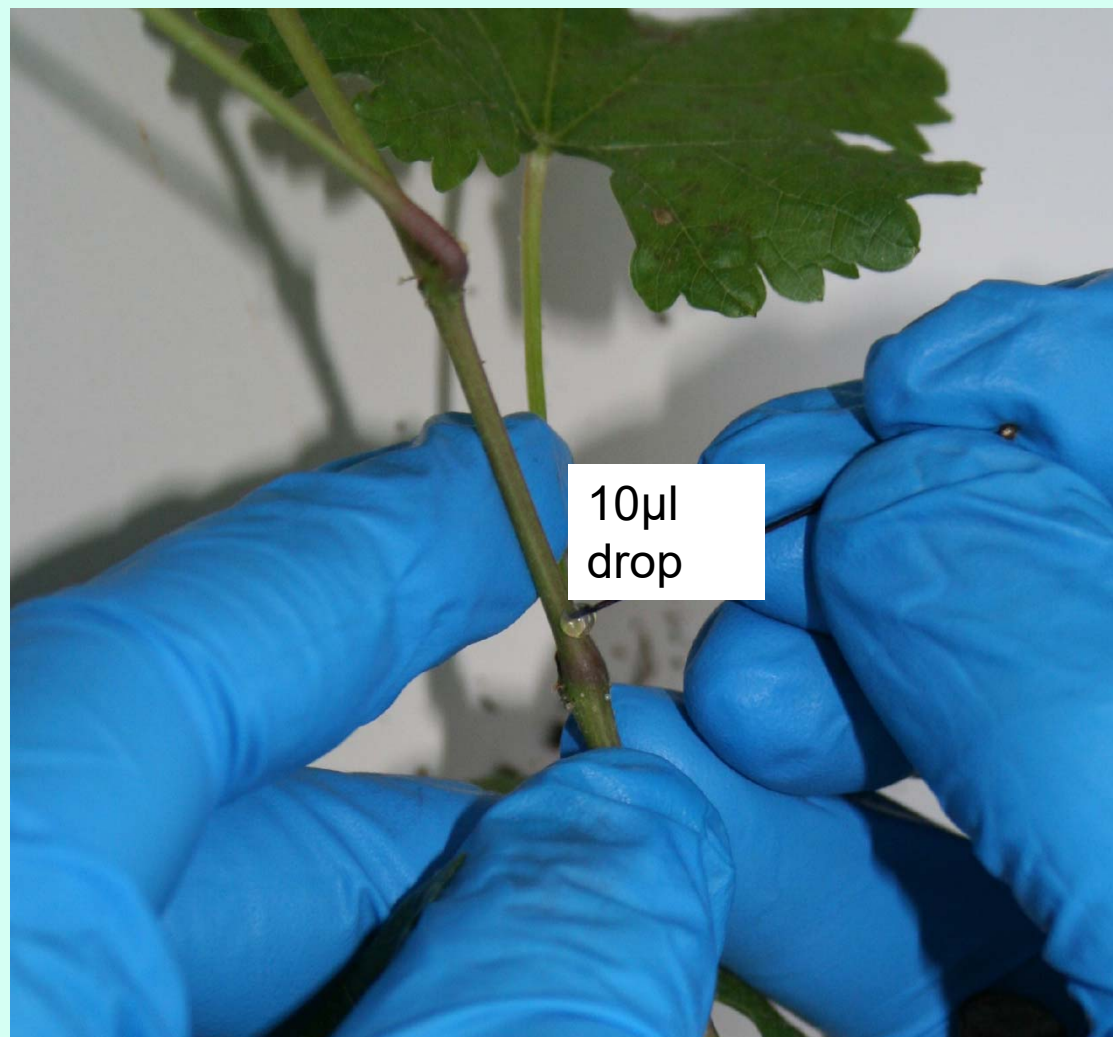
Xf reference isolate used for all inoculation
«De Donno»

- 1) Isolation
- 2) Triple cloning
(no more than 3 passages)
- 1) Bacterial suspension for
inoculations (OD_{600} 1-1,5 milky-like
solution)



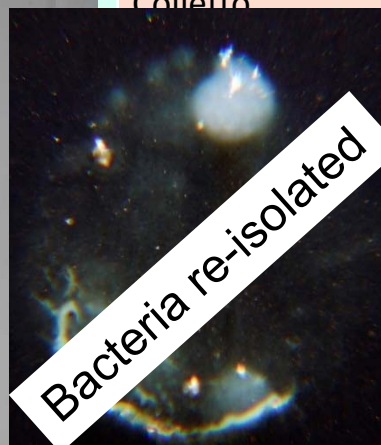
**Bacterial suspension
in PBS/Glycerol for
storage**

- 10 reps inoculated and 5 mock-inoculated plants
- 3 points of inoculation on each rep

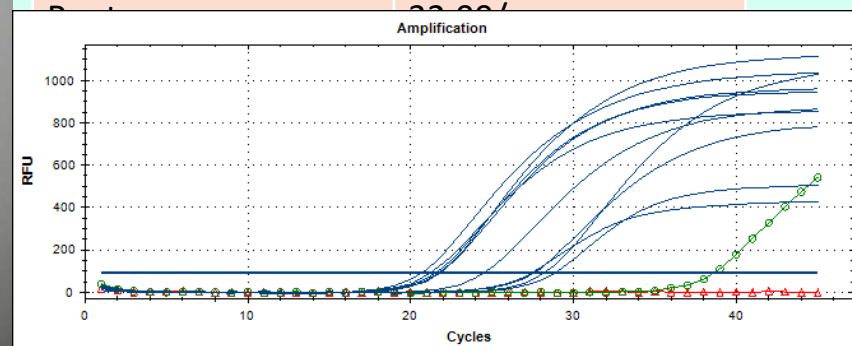


**Points of inoculation
marked for the follow
up**

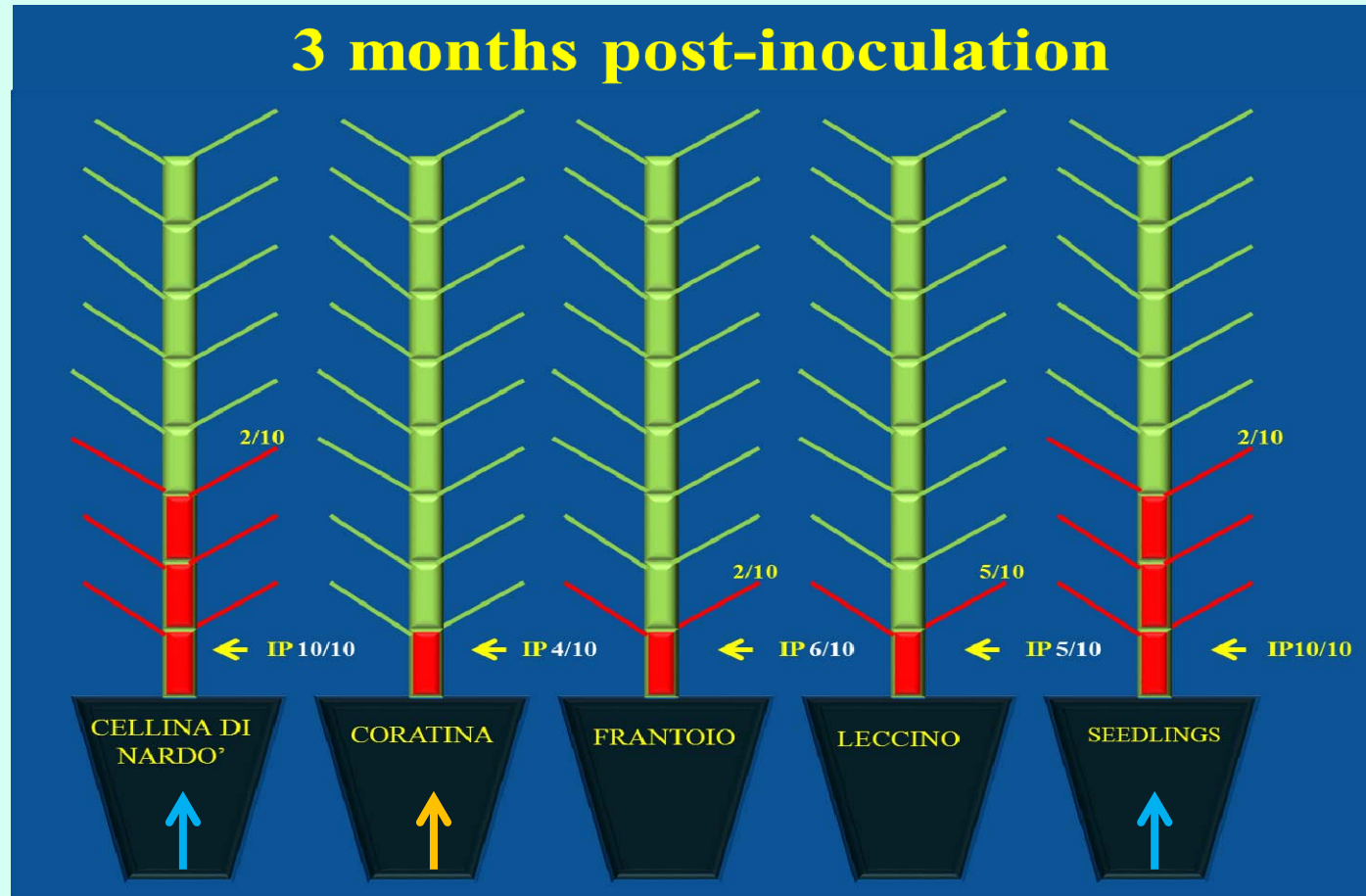




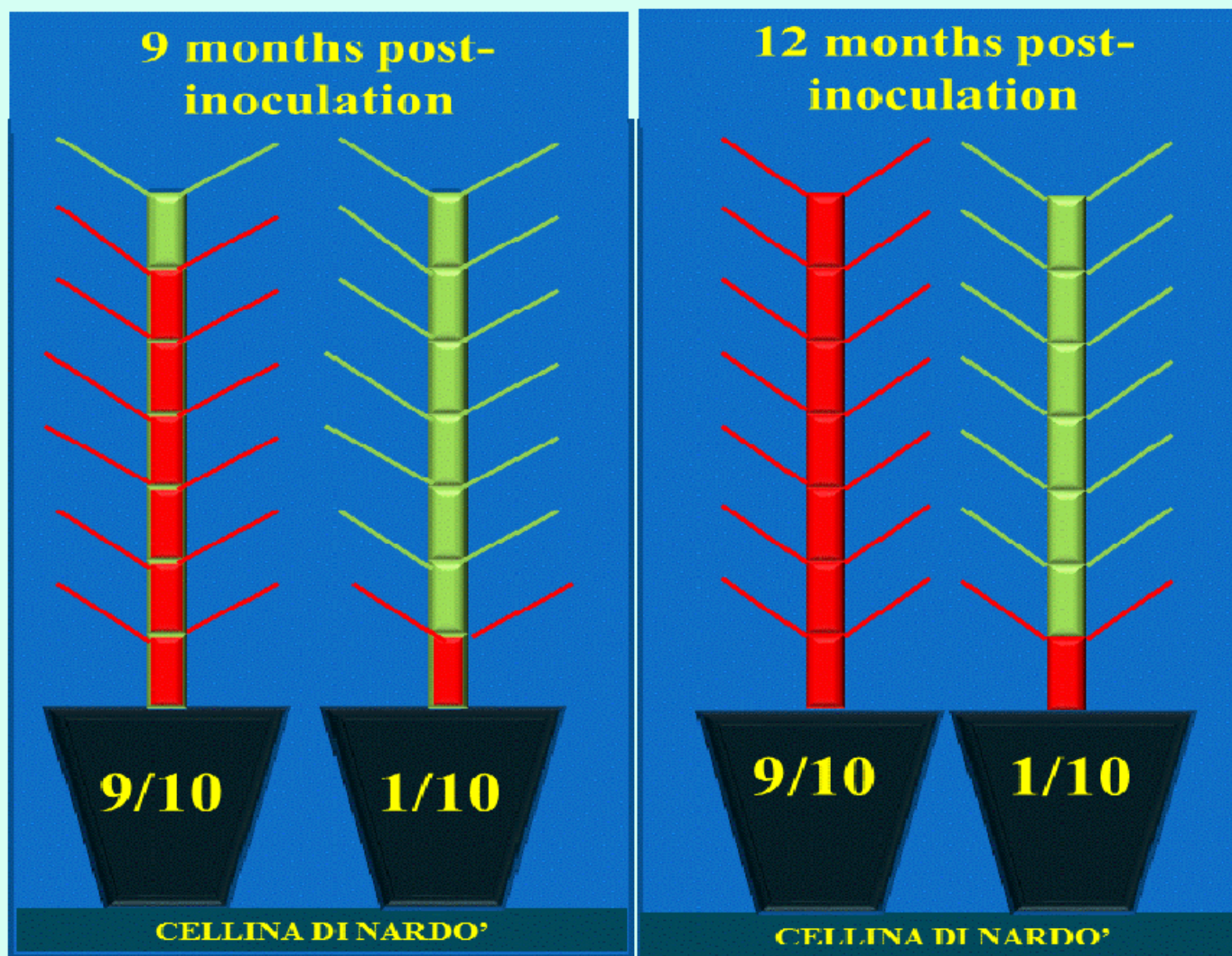
Olive seedling	qPCR Harper (STEM/PETIOLES)
8cm below p.i.	28.00/-
4cm below p.i.	27.00/29.00
Colletto	27.60/-
	20.00/21.00
	28.00/29.60
	21.00/21.90
	24.00/26.00
	21.00/22.30
	21.00/23.40
	21.00/23.00



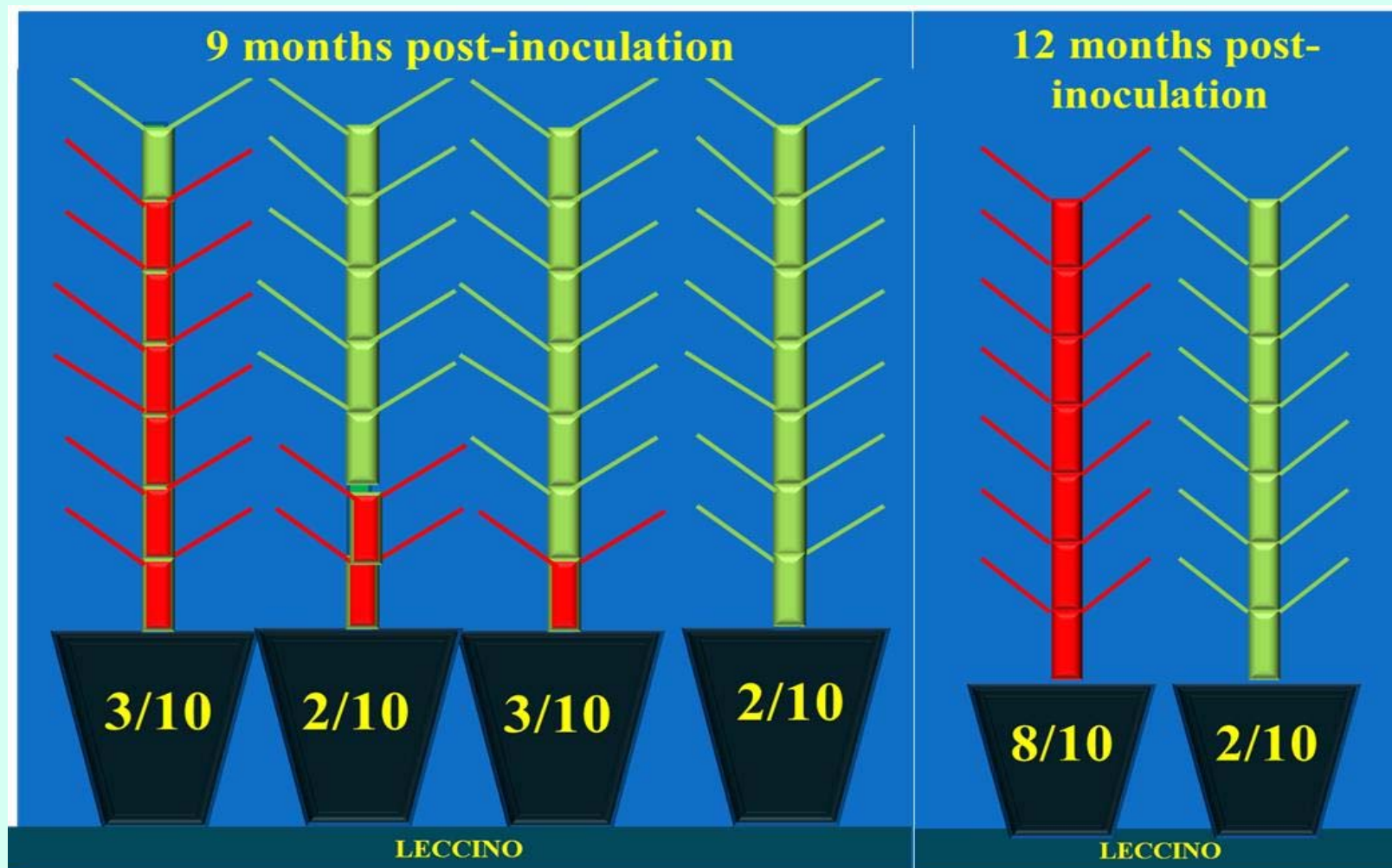
Olivo:



Needle-inoculation proved to be an efficient procedure to deliver the bacterium in the plants (40%-100% qPCR positive)



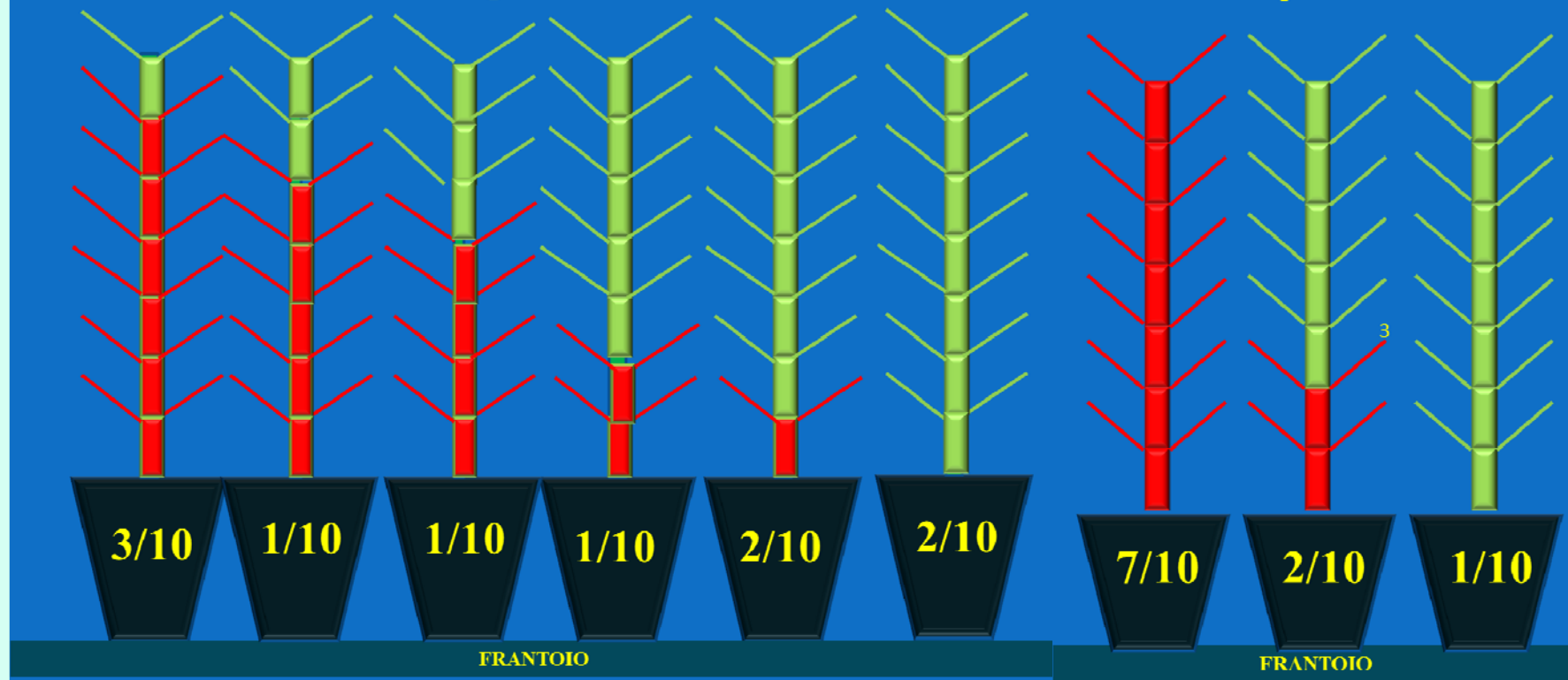
Infezioni sistemiche



Systemic infections

9 months post-inoculation

12 months post-inoculation



Systemic infections

Symptoms in the systemically infected plants (Cellina)



Symptoms in the systemically infected plants (Leccino)



Symptoms in the systemically infected plants (Leccino)



Symptoms started to appear in the distal portion of the inoculated shoot

(Frantoio)



**Symptoms started to appear in
the distal portion of the
inoculated shoot**

Symptoms in the systemically infected plants (Cellina)



Symptoms in the systemically infected plants

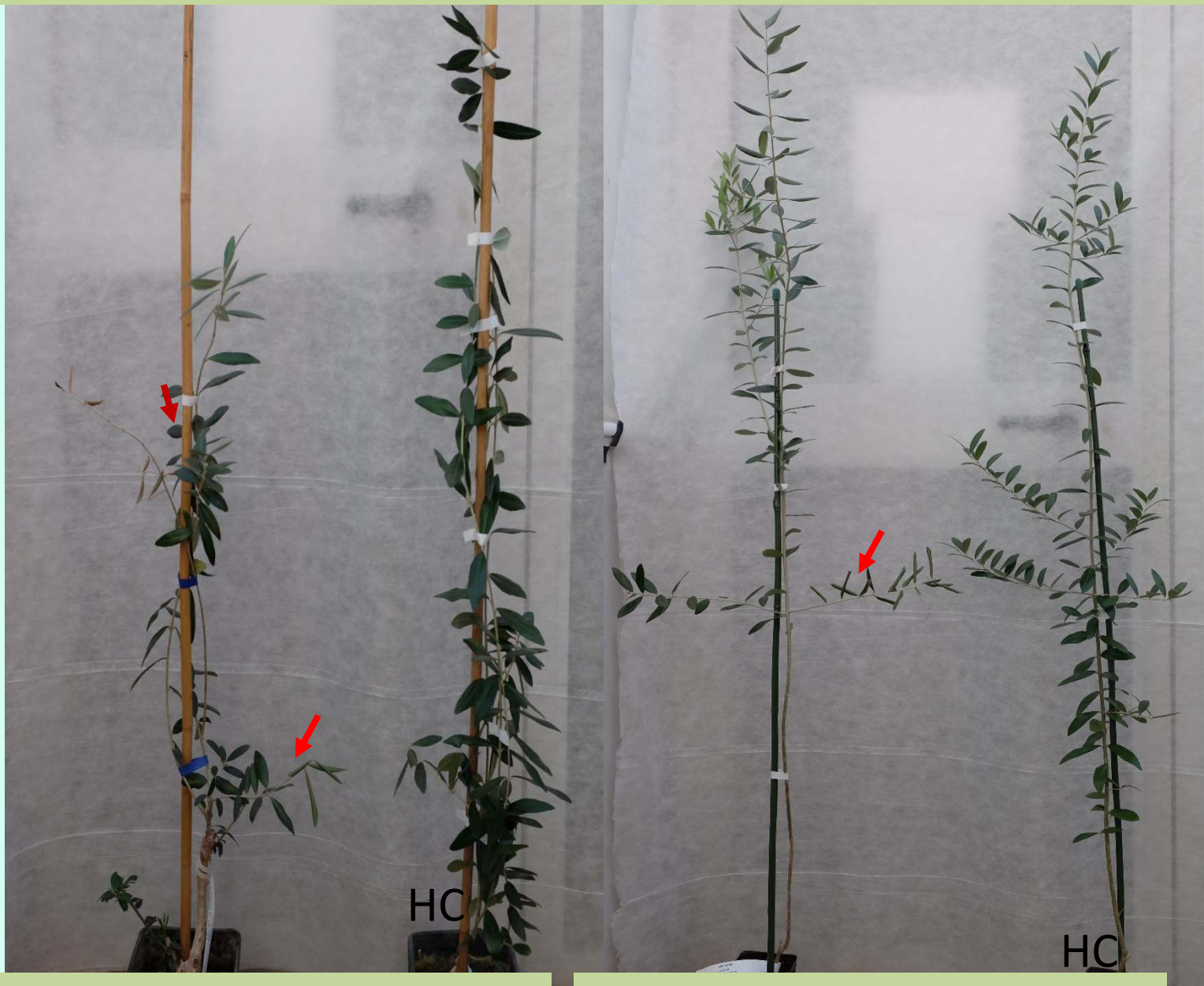


Cellina di Nardo'



Leccino

Symptoms in the systemically infected plants: difference in cultivar phenotype



Cellina di Nardo'

Leccino

Symptoms in 2-years old Cellina (8 mo. p.i)



Symptoms in 2-years old Cellina (8 mo. p.i)



Symptoms in 2-years old Cellina (8 mo. p.i)



Symptoms in oleander

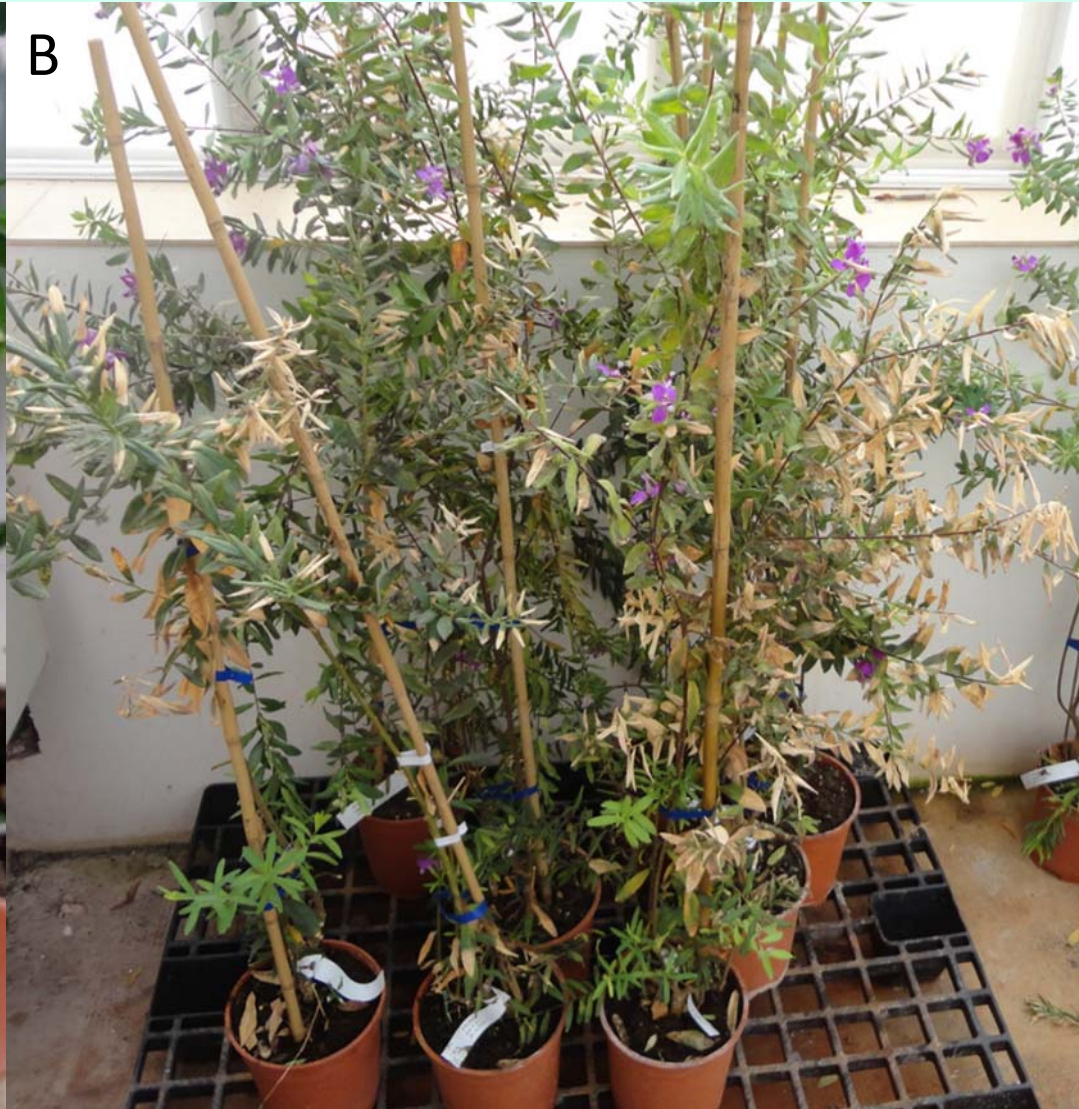


**10/10
plants
successfull
y infected**

Symptoms in systemically infected *Polygala myrtifolia*



5-6 mo.p.i



12-14 mo.p.i

Symptoms in systemically infected *Polygala myrtifolia*



Non-inoculated controls

A differenza delle specie precedenti, nessuna infezione sistemica è stata rilevata in piante di vite e agrumi

I risultati di questa sperimentazione sono riportati nei dettagli in una “supporting publication” dell’EFSA del 29 marzo 2016

EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT



APPROVED: 22 March 2016

PUBLISHED: 29 March 2016

Pilot project on *Xylella fastidiosa* to reduce risk assessment uncertainties

Institute for Sustainable Plant Protection, National Research Council of Italy, CNR

In collaboration with:

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro (Italy)

Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura – Basile Caramia, Locorotondo, Bari, Italy

Authors:

Maria Saponari, Donato Boscia, Giuseppe Altamura, Giusy D’Attoma, Vincenzo Cavalieri, Stefania Zicca, Massimiliano Morelli, Danilo Tavano

Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Unità Organizzativa di Bari (Italy)

Giuliana Loconsole, Leonardo Susca, Oriana Potere, Vito Savino, Giovanni P. Martelli

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro (Italy)

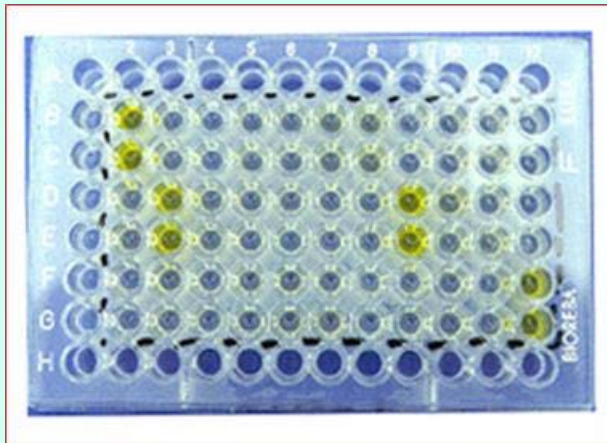
Francesco Palmisano, Crescenza Dongiovanni, Antonia Saponari, Giulio Fumarola, Michele Di Carolo

Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura – Basile Caramia, Locorotondo, Bari, Italy

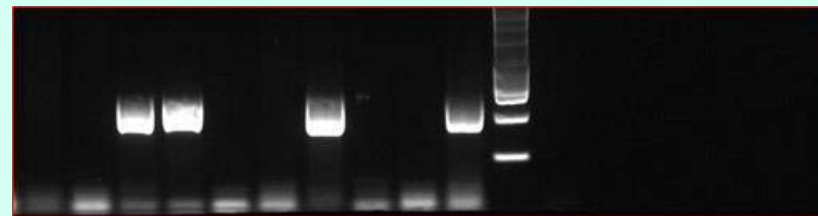
Diagnosi

Test diagnostici adottati ufficialmente a seguito di ring test
Tra laboratori accreditati

ELISA



PCR con *Xylella*-specific primers



Journal of Plant Pathology (2014), 96 (1), 1-8

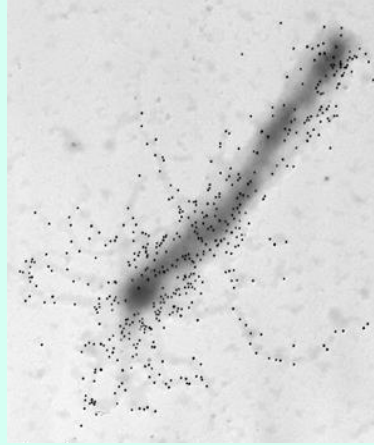
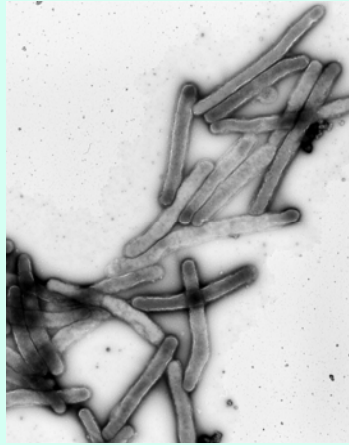
Edizioni ETS Pisa, 2014

LETTER TO THE EDITOR

DETECTION OF *XYLELLA FASTIDIOSA* IN OLIVE TREES BY MOLECULAR AND SEROLOGICAL METHODS

G. Loconsole¹, O. Potere², D. Boscia¹, G. Altamura³, K. Djelouah⁴, T. Elbeaino⁴, D. Frasheri⁴, D. Lorusso⁴,
F. Palmisano³, P. Pollastro³, M.R. Silletti³, N. Trisciuzzi³, F. Valentini⁴, V. Savino² and M. Saponari¹

Isolamento in coltura axenica del ceppo Salentino di *X. fastidiosa*



Isolamenti ottenuti da
circa 15 specie oltre l'olivo



Journal of Plant Pathology (2014), 96 (2), 425-429 Edizioni ETS Pisa, 2014

SHORT COMMUNICATION

ISOLATION OF A *XYLELLA FASTIDIOSA* STRAIN INFECTING OLIVE AND OLEANDER IN APULIA, ITALY

C. Cariddi¹, M. Saponari², D. Boscia², A. De Stradis², G. Loconsole², F. Nigro¹, F. Porcelli¹, O. Potere¹
and G.P. Martelli¹

Colonie di *Xylella fastidiosa* da un rametto di
olivo del diametro di circa 0,5 cm.



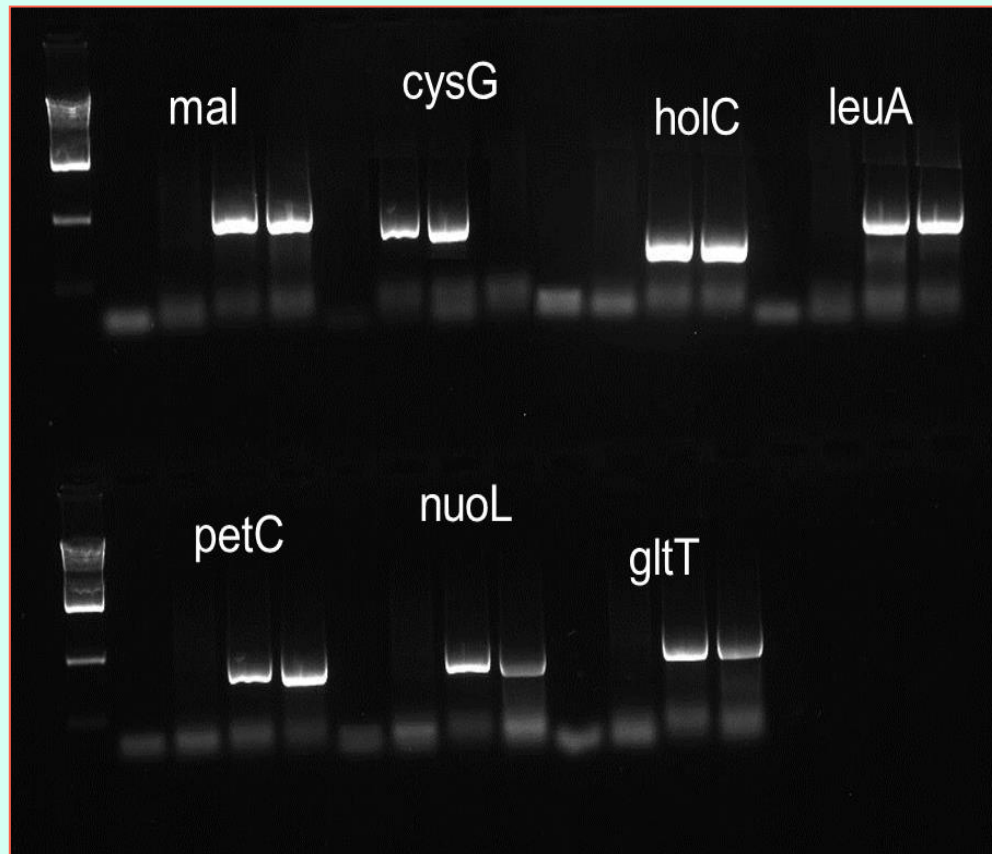
Allocazione tassonomica del ceppo Salentino
di *X. fastidiosa*

Xylella fastiosa (Xf) è classificato in almeno 4 sottospecie
Con origini geografiche diverse e patogenicità differenziale

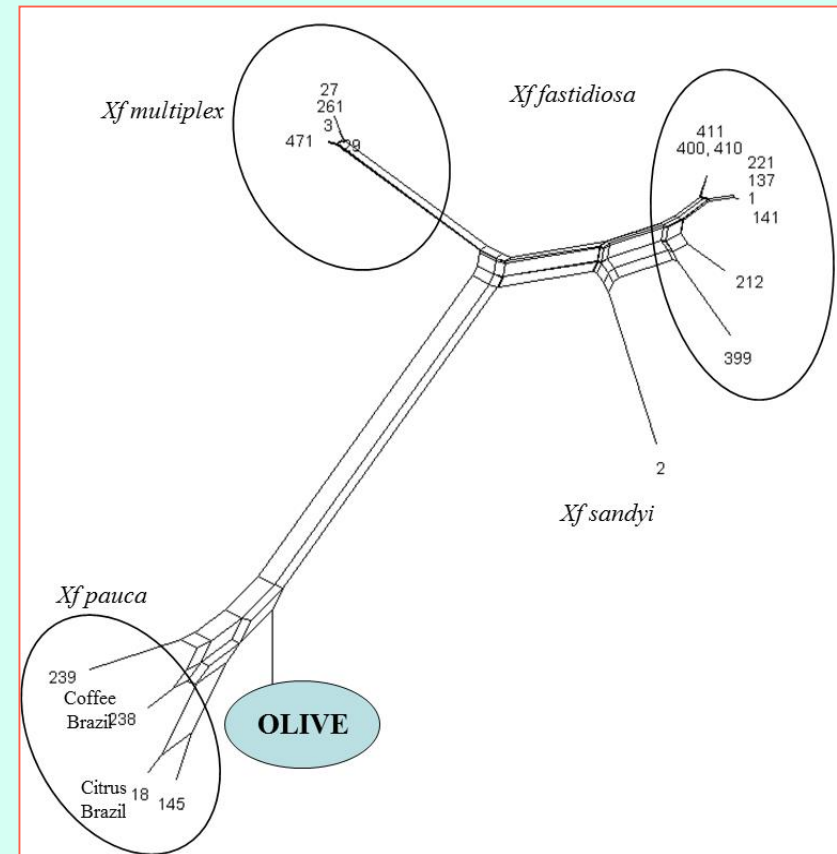
SOTTOSPECIE	ORIGINE	PRINCIPALI OSPITI
<i>Xf fastidiosa</i>	America Centrale	Vite
<i>Xf multiplex</i>	USA meridionali	Oleandro, drupacee, querce, olivi (USA)
<i>Xf sandyi</i>	Indeterminata	Oleandro, magnolia
<i>Xf pauca</i>	Sud America	Agrumi, caffè

E' *Xf multiplex* la sottospecie che infetta
gli olivi Salentini?

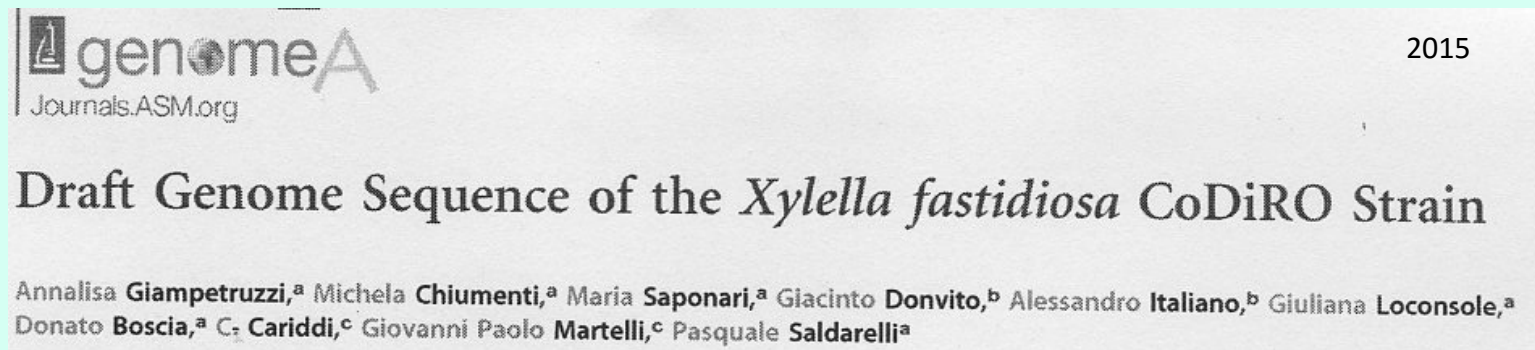
Il ceppo Salentino di *Xylella fastidiosa* è una variante molecolare della sottospecie *pauca*



Multilocus sequence typing



Identificazione confermata dal sequenziamento
Del ceppo Salentino (CoDiRO) di *X. fastidiosa*,



DNA con 2.507.614 paia di basi

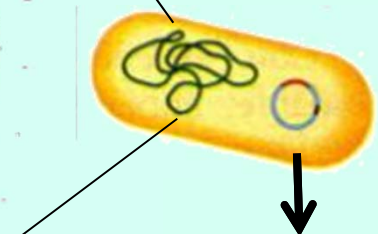
Genotyping: Draft genome

By softwares:

**PROKKA and
myRAST**

Function:	Chromosomal replication initiator protein DnaA
Contig:	160492.1:NC_002488
Start:	143
Stop:	1462
Length:	1319 bp 439 aa
CoDiRO	
Xylella fastidiosa 9a5c	

The **first ORF** of CoDiRO chromosome is a DnaA protein, as in the 9a5c strain.



**Plasmid was also
reconstructed
and annotated**

CoDiRO draft genome	
Length (Mb)	2,46
G+C %	51.8
ORFs	<u>2343</u>
ORFs with functions	1575
hypothetical proteins	1298
rRNA operons	1
tRNAs	47
tmRNA	1

Number of features is consistent with others X. fastidiosa genome assemblies at scaffolds level

9a5c

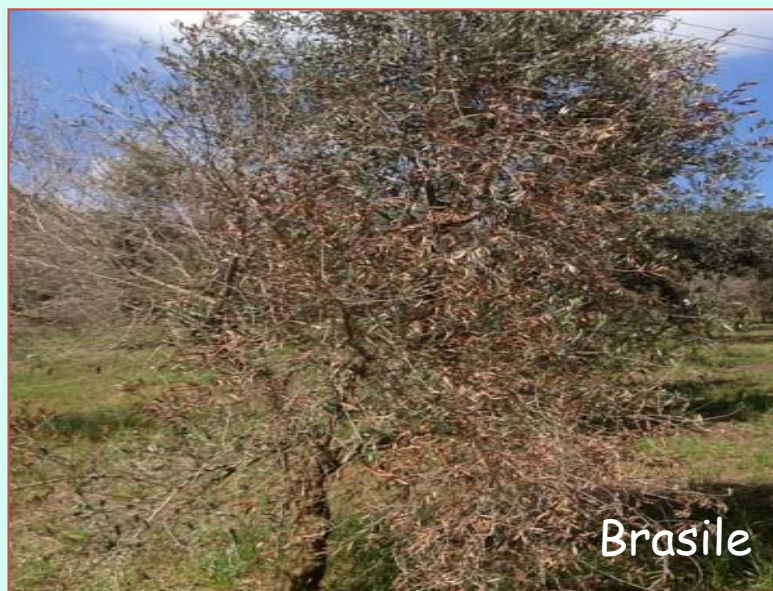
-  100% identity
-  70% identity
-  50% identity
- GC skew
-  GC skew(-)
-  GC skew(+)
-  GC content

BRIG Software

Plasmid pXF- CoDiRO	
Length (kb)	35
G+C %	49,5
ORFs	40

La tabella è quindi aggiornata in questo modo

SOTTOSPECIE	ORIGINE	PRINCIPALI OSPITI
<i>Xf fastidiosa</i>	America Centrale	Vite
<i>Xf multiplex</i>	USA meridionali	Oleandro, drupacee, querce, olivo (USA)
<i>Xf sandyi</i>	Indeterminato	Oleandro, magnolia
<i>Xf pauca</i>	Sud America	Agrumi, caffè, olive (Italia, Argentina, Brasile)



Da dove è arrivato il ceppo CoDiRO di *X.fastidiosa* subsp. *pauca* ?

Il ritrovamento in Costa Rica di un ceppo batterico con "sequence typing" (MLST) identico al ceppo CoDiRO (ST53), nonché le numerose intercettazioni Di piante ornamentali di caffè importate in Europa dall'America Centrale (Costa Rica e Honduras, in particolare), fa ritenere altamente probabile
Che il ceppo CoDiRO origini da quell'area geografica

La presenza di ST53 è frequente in Salento?

Sino ad oggi gli ormai numerosi (alcune decine) isolati di *Xylella* da siti diversi della penisola e da specie vegetali diverse risultano, a seguito di caratterizzazione MLST effettuata da diversi gruppi di ricercatori, avere tutti ST53. Questo risultato fa ipotizzare che l'epidemia sia originata da un unico evento di introduzione

Eur J Plant Pathol

Eur J Plant Pathol
DOI 10.1007/s10658-016-0894-x



Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity

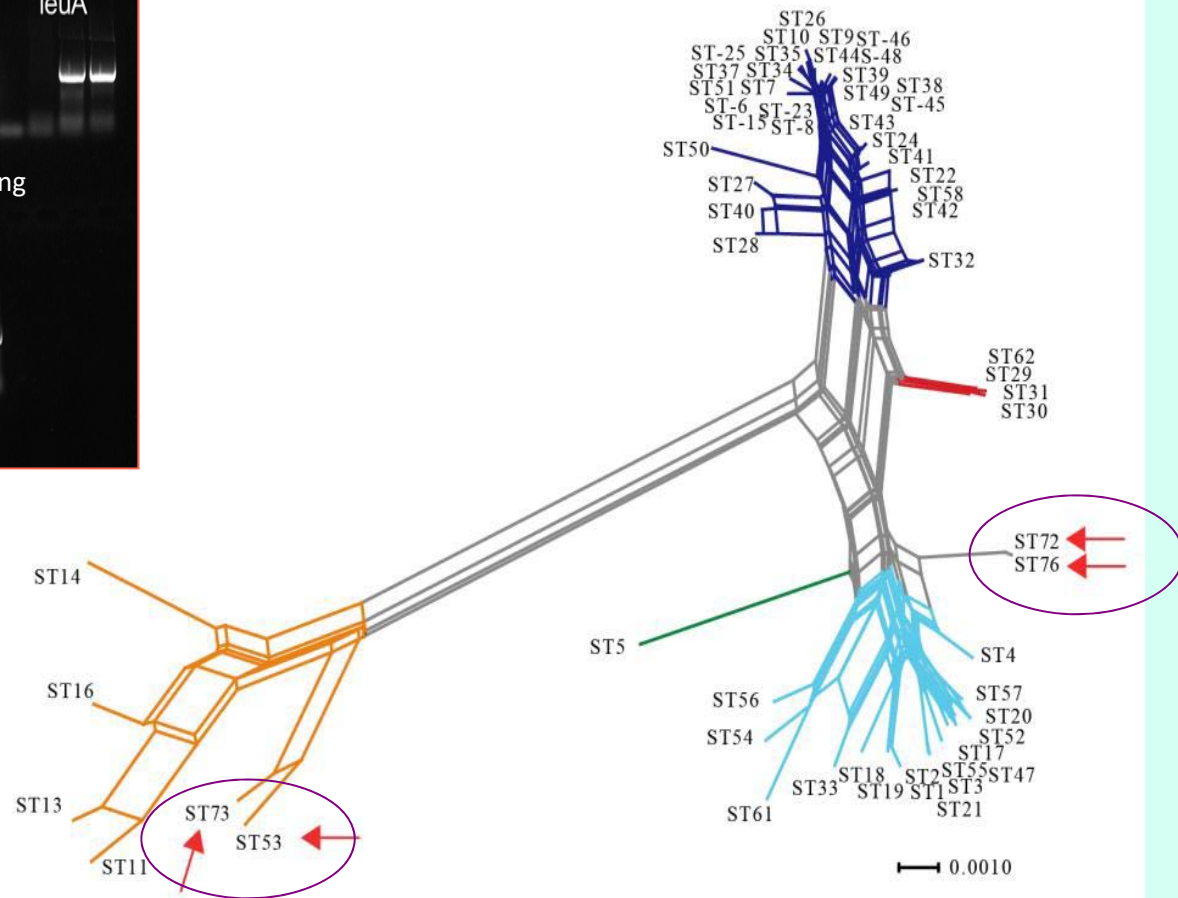
G. Loconsole • M. Saponari • D. Boscia • G. D'Attoma •
M. Morelli • G. P. Martelli • R. P. P. Almeida



Nuovi ceppi di *Xylella* intercettati in piante di caffè in Italia



- subsp. *fastidiosa*
- subsp. *sandyi*
- subsp. *morus*
- subsp. *multiplex*
- subsp. *pauca*



Epidemiologia

Gli studi di epidemiologia hanno seguito 4 principali direzioni:

- (i) Identificazione di fonti naturali d'infezione (flora nativa)
- (ii) Cattura di possibili vettori (Cicadellidae) sulla flora nativa
loro identificazione e analisi per la presenza di *Xylella*
- (iii) Posizionamento di gruppi di piante trappola (olivo, vite, mandorlo
oleander, agrumi) in un oliveto fortemente infestato
- (iv) Prove di trasmissione con insetti portatori di *Xylella*

Prove sperimentali di trasmissione

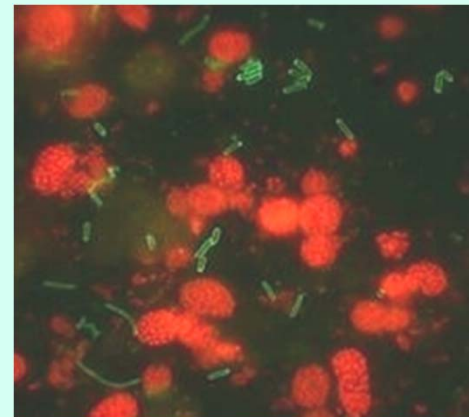
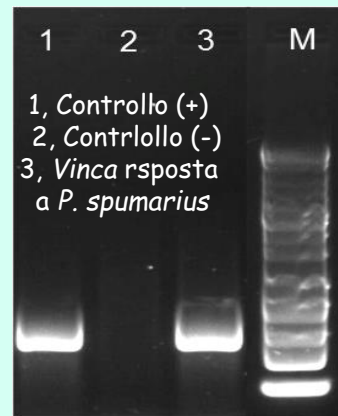
Adulti di *Philaenus spumarius* hanno trasmesso il batterio a olivo, pervinca e diversi altri ospiti

Infectivity and Transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy

MARIA SAPONARI,¹ GIULIANA LOCONSOLE,¹ DANIELE CORNARA,² RAYMOND K. YOKOMI,³
ANGELO DE STRADIS,¹ DONATO BOSCIA,¹ DOMENICO BOSCO,⁴ GIOVANNI P. MARTELLI,²
RODRIGO KRUGNER,³ AND FRANCESCO PORCELLI^{2,5}



J. Econ. Entomol. 107(4): 1316–1319 (2014); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC14142>





[Journal of Pest Science](#)

pp 1–10

Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy

Daniele Cornara, Maria Saponari, Adam R. Zeilinger, Angelo de Stradis, Donato Boscia, Giuliana Loconsole, Domenico Bosco, Giovanni P. Martelli, Rodrigo P. P. Almeida, Francesco Porcelli 

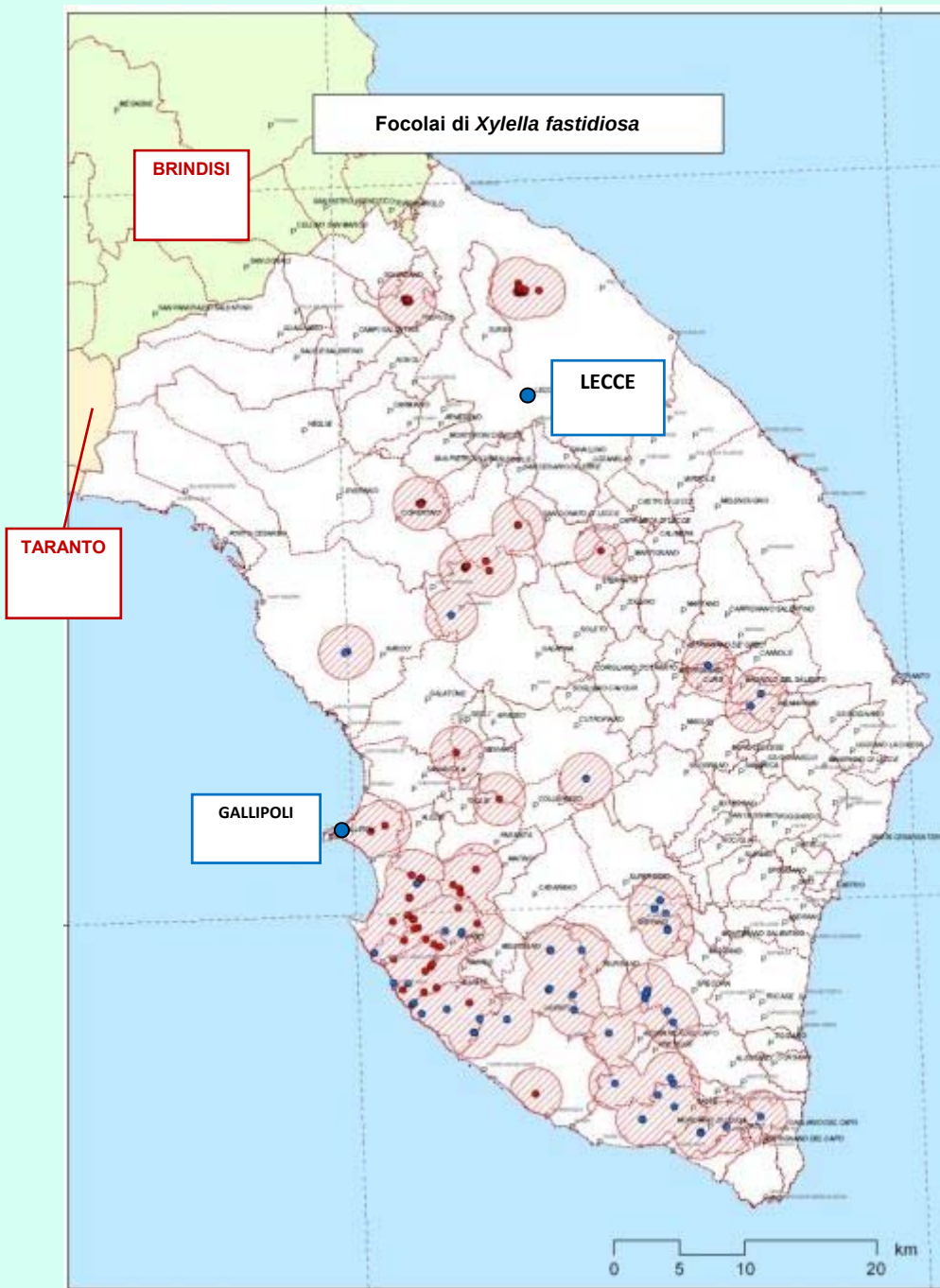


Trap plants

Several groups of trap plants, each made up of two small plants of olive, olander, grapevine, almond and citrus were planted in a severely infected olive grove in spring 2014



By late summer 2015, most of the olives and oleanders proved to be infected. Some exhibited initial leaf scorch. No symptoms nor *Xylella* were detected in grapevines and citrus



Distribution of *Xylella fastidiosa*
in the province of Lecce
in summer 2014



Febbraio 2016



**Differenza di suscettibilità a
X. fastidiosa tra diverse
cultivar di olivo?**

La tolleranza del LECCINO

Leccino

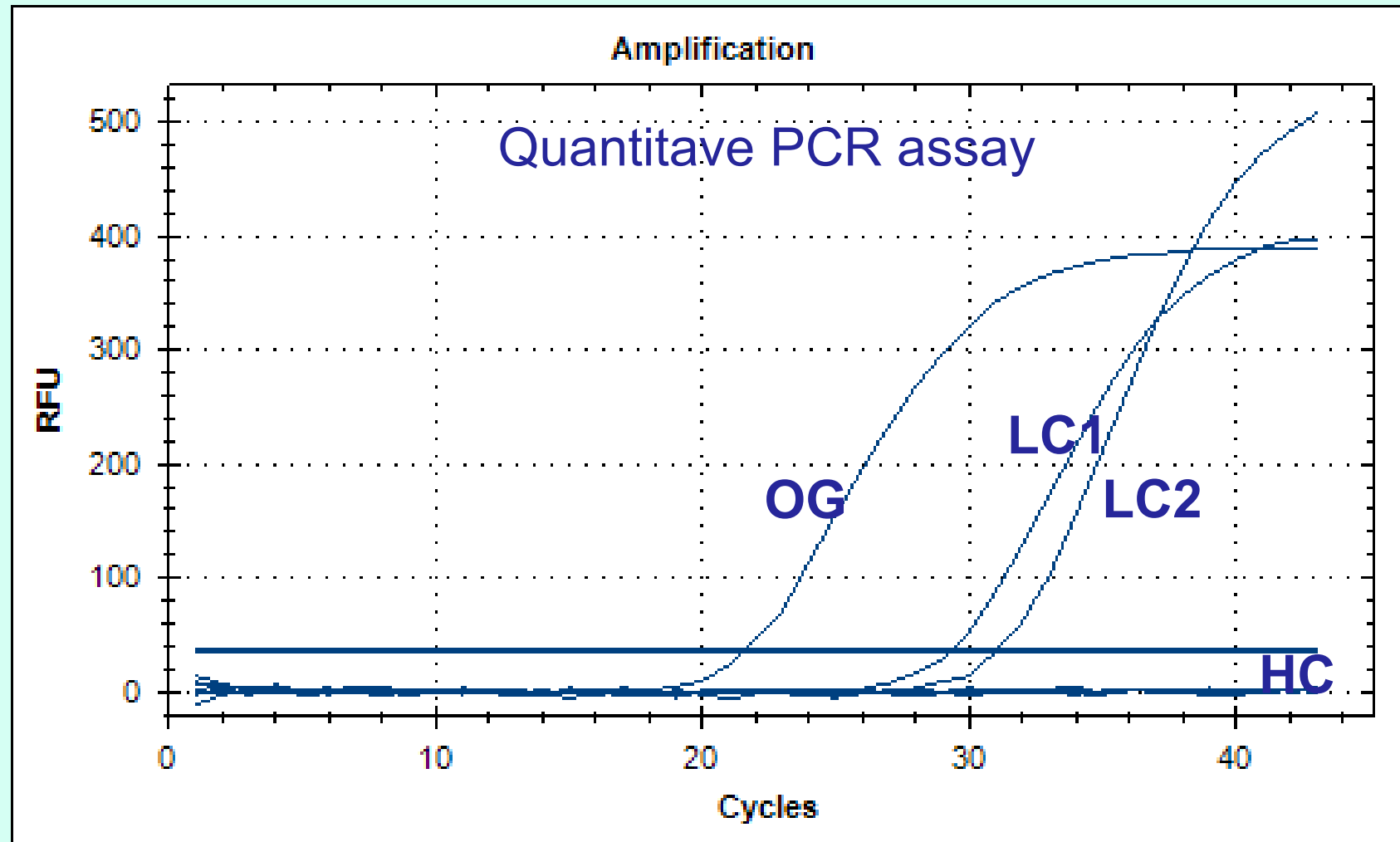
Ogliarola



Ogliarola

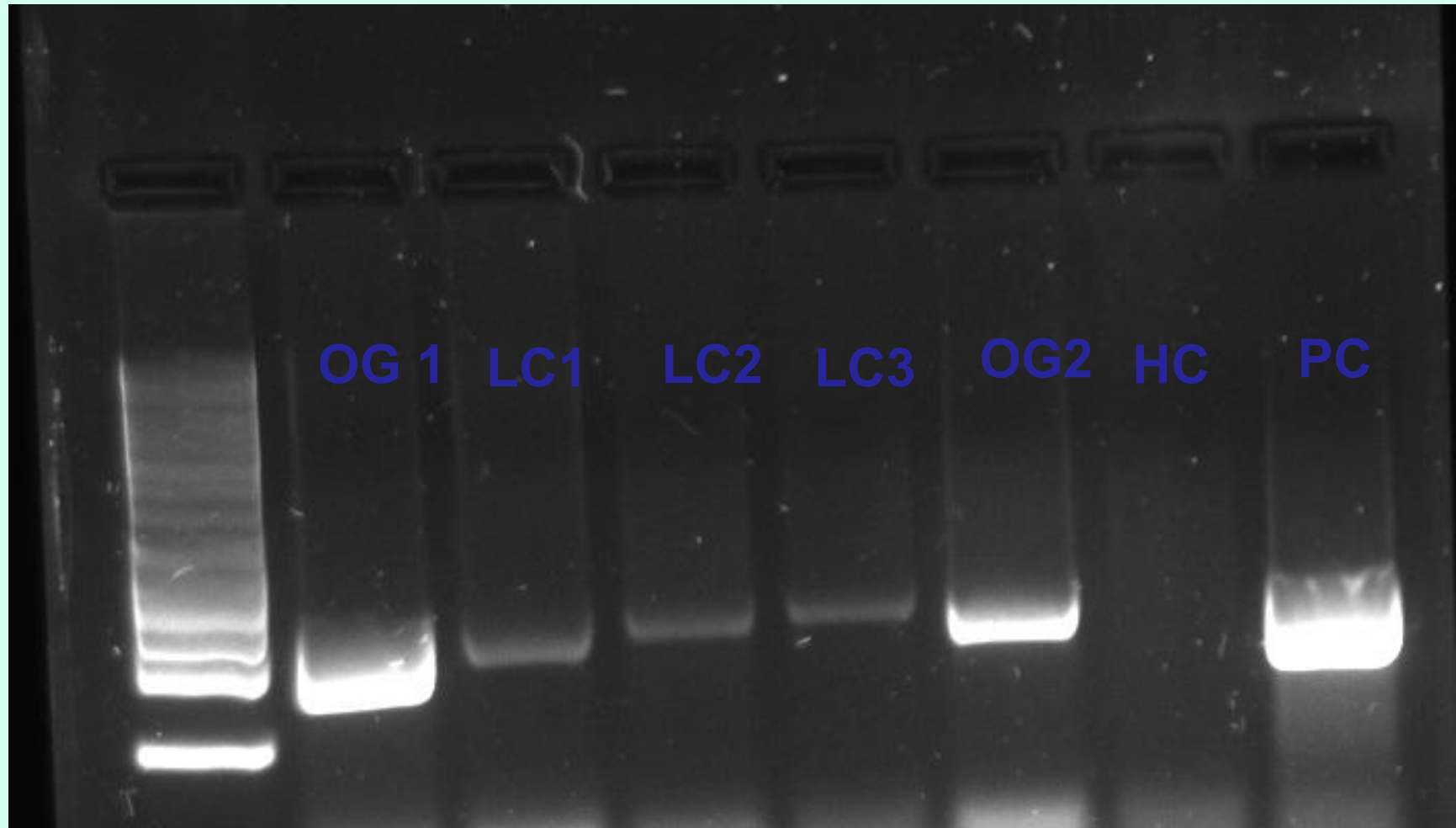
Leccino





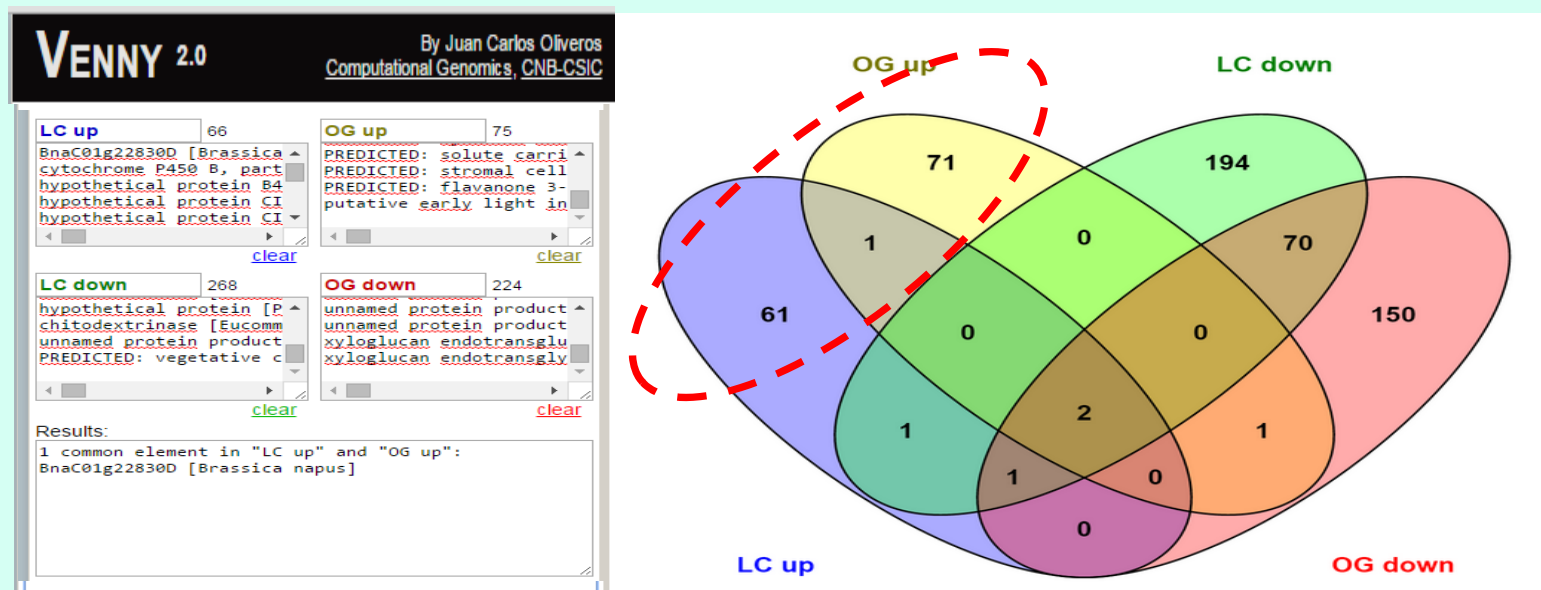
OG= ogliarola salentina; LC= Leccino, HC= healthy control

PCR assay with the primers *FXYgyrR499* e *RXYgyr907*



OG= ogliarola salentina; LC= Leccino, HC= healthy control;
PC= positive control

Venn diagram with annotation from BLASTX parsing



Geni sovraespressi nelle piante infette delle due cultivar sono completamente differenti tra le due cultivar

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Transcriptome profiling of two olive cultivars in response to infection by the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*

Annalisa Giampetruzzi, Massimiliano Morelli, Maria Saponari, Giuliana Loconsole, Michela Chiumenti, Donato Boscia, Vito N. Savino, Giovanni P. Martelli and Pasquale Saldarelli 

BMC Genomics 2016 17:475 | DOI: 10.1186/s12864-016-2833-9 | © The Author(s). 2016

Received: 26 January 2016 | Accepted: 13 June 2016 | Published: 27 June 2016

OLIVES

1. Coratina,
2. Frantoio,
3. Leccino,
4. Cellina di Nardò,
5. Cima di Melfi,
6. Don Carlo,
7. Arbequina,
8. Arbosana,
9. Koroneiki,
10. FS17



Necessità di cercare altro germoplasma resistente:

Avviato con 10 cultivar nell'ambito del progetto pilota EFSA si sta ampliando un campo sperimentale che a fine 2016 vedrà a confronto oltre 60 diverse cultivar

Ottobre 2013

*Grazie per
l'attenzione*

Luglio 2016

