

La batteriosi del mais: risultati del monitoraggio realizzato in Friuli Venezia Giulia nel 2017

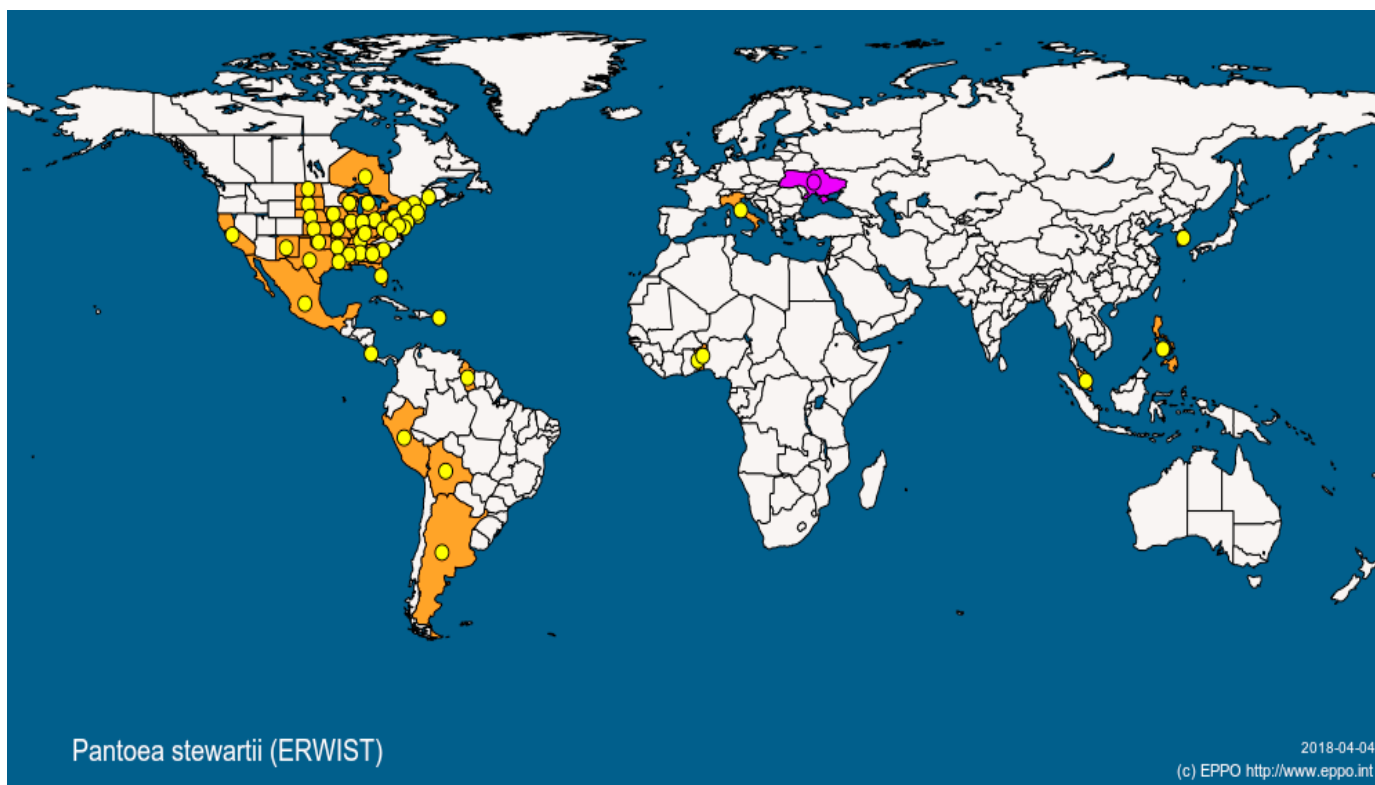
Iris Bernardinelli, Giorgio Malossini, Luca Benvenuto, Penelope Zanolli,
Gian Luca Bianchi, Nicoletta Di Bernardo, Andrea Lenardon, Simone Saro
Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica

Nel 2017, oltre agli ordinari accertamenti svolti sui campi da seme di mais, il Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica dell'ERSA ha svolto uno specifico monitoraggio per valutare la presenza in Friuli Venezia Giulia della malattia di Stewart, batteriosi causata da *Pantoea stewartii* (nota anche con il nome di *Erwinia stewartii*).

Le indagini sono state condotte nell'ambito di uno specifico programma di potenziamento della sorveglianza del territorio relativamente a organismi nocivi alieni di cui si teme l'introduzione in Regione, cofinanziato dall'Unione Europea (Reg. UE. 652/2014).

Pantoea stewartii è un batterio, originario del Nord America, e con ogni probabilità è stato introdotto in altre parti del mondo con il commercio delle sementi di mais. La sua attuale distribuzione (Fig. 1) comprende diverse zone di insediamento nel continente americano, alcune zone dell'Asia e recenti segnalazioni in Africa e in diversi Stati europei, tra i quali l'Italia (Eppo, 2018).

Figura 1: Distribuzione nel mondo di *Pantoea stewartii* (Eppo 20 marzo 2018).



Biologia

P. stewartii subsp. *stewartii* è un batterio che può arrecare danni principalmente alla coltura del mais (prediligendo il mais dolce), ma anche ad altre specie di *Poaceae* coltivate per il foraggio, come osservato negli USA. Il batterio è in grado di colonizzare il sistema vascolare delle piante ospiti, provocando alterazioni del flusso linfatico con conseguente manifestazione di giallumi e deperimento delle piante stesse. *P. stewartii* sverna occasionalmente nel suolo, nel concime organico o nel culmo del mais e la sua diffusione a livello locale avviene principalmente tramite insetti vettori che ospitano il parassita durante l'ibernazione e infettano le piante durante la stagione vegetativa. Negli Stati Uniti *P. stewartii* è trasmessa da *Chaetocnema pulicaria*, coleottero crisomelide non segnalato per l'Europa. Altri insetti vettori, anch'essi non ancora rinvenuti in Europa, possono trasmettere il batterio sia negli stadi di sviluppo di adulto che di larva; attualmente sono in fase di valutazione eventuali possibilità di trasmissione da parte della cimice marmorata asiatica *Halyomorpha halys*. Il batterio può essere trasmesso anche attraverso la semente proveniente da una pianta infetta e quindi trasportato anche a lunga distanza con la commercializzazione dei semi.

Sintomi e danni

I sintomi della batteriosi causata da *P. stewartii* si manifestano in maniera più evidente sulle foglie che presentano una colorazione che va dal verde pallido al giallo, con striature longitudinali che rineschiscono e diventano marroni (Fig. 2); i margini divengono irregolari e ondulati e possono estendersi per l'intera lunghezza



della foglia. Le piantine di mais possono rinsecchire nei primi stadi di sviluppo o, se l'infezione avviene successivamente, possono anche proseguire nell'accrescimento. Le infiorescenze maschili si formano prematuramente, sono scolorite e muoiono dopo poco tempo, inoltre sulle foglie che avvolgono la pannocchia, il batterio può produrre un essudato in forma di piccolissime goccioline. Il batterio penetra profondamente nel seme, ma non nell'embrione. Quando l'infezione è in fase avanzata, alla base del fusto si possono formare delle cavità scure. La malattia può essere confusa con altre patologie che provocano il degrado delle foglie con striature longitudinali causate da altri batteri e funghi.

Figura 2: Sintomatologia tipica di pianta affetta da *P. stewartii*.

Materiali e metodi

Campionamento

Per effettuare il campionamento sul territorio regionale si è considerata l'intera area maidicola, distribuita su gran parte della pianura friulana. Sono state effettuate ispezioni casuali agli appezzamenti, rispettando per quanto possibile il criterio di un'ottimale distribuzione dei punti di rilievo e rappresentatività dell'area oggetto d'indagine. Il monitoraggio è stato eseguito senza approfondimenti preliminari sulla provenienza delle sementi e sulla destinazione d'uso delle produzioni, e potrebbe quindi aver riguardato in qualche caso anche materiale proveniente dagli stessi lotti, seminato in appezzamenti diversi. Per ovviare a questa eventualità i rilievi sono stati effettuati in appezzamenti sufficientemente distanti tra loro, e solo in evidenza di materiale proveniente da altri lotti (es. stadio fenologico differente) se gli appezzamenti erano contigui. Gli appezzamenti di mais sono stati percorsi (completamente o in parte) lungo le file e in caso di sintomatologia riconducibile a *P. stewartii* si è proceduto con la raccolta dei campioni. Ciascun campione, costituito da 5-10 foglie sintomatiche, è stato consegnato in laboratorio per le analisi.

Analisi di laboratorio

La diagnosi di *Pantoea stewartii* è stata effettuata secondo le linee guida definite dallo standard EPPO PM7/60 (2) (OEPP/EPPO Bulletin, 2016). L'EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization, è un'organizzazione intergovernativa a cui aderiscono 51 Stati europei e non, con lo scopo di armonizzare e coordinare strategie per la protezione delle

piante tra i Paesi aderenti. Nell'ambito delle sue finalità istituzionali l'EPPO predispone numerose pubblicazioni e standard, con attenzione anche per i metodi di diagnosi degli organismi nocivi alle piante che, in assenza di metodi ufficiali specificati da norme comunitarie o nazionali, diventano metodi di riferimento adottati dai laboratori per il riconoscimento di organismi nocivi.

Nel caso specifico è stato adottato lo schema di diagnosi dello standard EPPO PM 7/60 (2) adattato e modificato con i seguenti passaggi:

- Preparazione ed omogeneizzazione del campione di foglie
- Estrazione del DNA totale con protocollo a base CTAB
- Screening mediante analisi molecolare real time PCR
- Isolamento dei campioni positivi su substrato King's B
- Identificazione delle colonie tipiche con analisi molecolare real time PCR

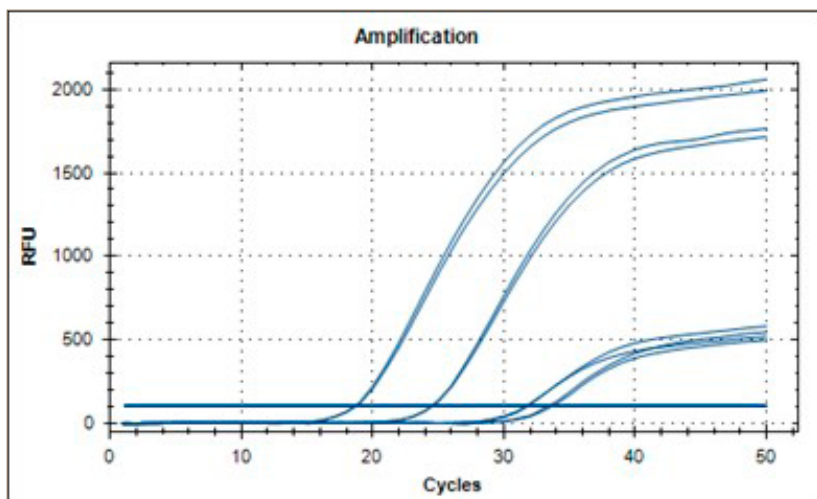
Rispetto allo schema tipo del protocollo EPPO PM 7/60 (2), che non prevede l'estrazione del DNA da foglie di mais, è stato adottato un metodo di estrazione a base CTAB (implementato secondo il metodo normato UNI EN ISO 21571:2013 Annex A3), in quanto già utilizzato correntemente dal laboratorio e citato anche da un'altra pubblicazione scientifica per la diagnosi di *Pantoea stewartii* (Thapa et al., 2012). Per lo screening e l'identificazione di *Pantoea stewartii* è stato adottato, previa verifica iniziale per confronto con il protocollo PCR qualitativo definito dallo Standard EPPO PM 7/60 (2) Appendix 3, unicamente il protocollo real time PCR (standard EPPO PM 7/60 (2) Appendix 5) che consente una maggiore rapidità e semplicità operativa affiancate ad una maggiore sensibilità analitica.

A differenza sempre del protocollo EPPO adottato, non è stato effettuato nessun test di patogenicità dopo gli isolamenti in quanto la presenza di sintomi e la positività ai test eseguiti è stata ritenuta sufficiente alla diagnosi.

Risultati e discussione

Il monitoraggio di *P. stewartii* ha interessato 135 ha di mais, pari a circa lo 0,25% della sua superficie coltivata in regione nel 2017, distribuiti in tutta la zona maidicola della

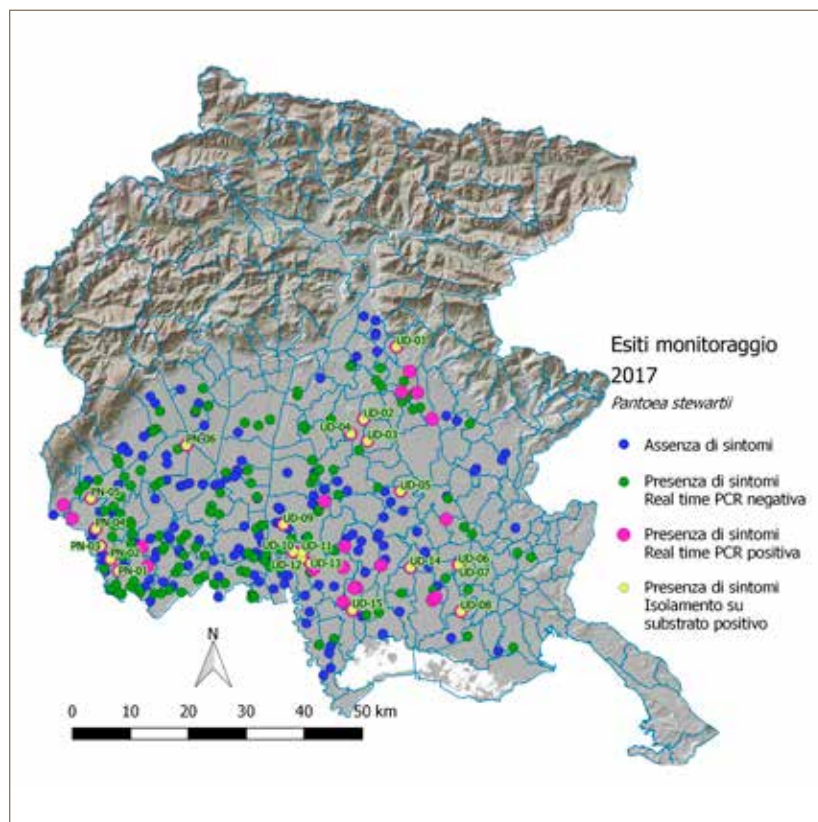
Figura 3: Curve di amplificazione mediante real time PCR di alcuni campioni positivi a *Pantoea stewartii*. Le curve evidenziano diversi livelli di concentrazione del batterio estratto dai tessuti delle piante di mais.



pianura del Friuli Venezia Giulia. In totale sono state effettuate 361 ispezioni visive di cui 202 evidenziavano una sintomatologia che poteva essere riconducibile a *P. stewartii* e tale da richiedere il prelievo di campioni per successivi approfondimenti analitici (Fig. 4).

Sul totale dei campioni raccolti 45 sono risultati positivi alla real time PCR e di questi solo 21 hanno dato esito positivo anche all'isolamento in piastra Petri e sono quindi stati considerati infetti da *P. stewartii*. La maggior parte dei campioni sintomatici raccolti non ha dato esito positivo all'analisi PCR, questo può dipendere dal fatto che la sintomatologia non è univoca per *P. stewartii* e può infatti essere confusa con altre batteriosi e patologie presenti anche in Italia quali *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Burkholderia andropogonis*, *Setosphaeria turcica*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Cochliobolus carbonum* (Eppo, 2016).

I sintomi maggiormente associati ai campioni risultati positivi alla presenza del batterio erano la presenza delle striature giallo/verdi longitudinali lungo le nervature e la crescita stentata delle piantine, che in genere si sono presentate più piccole delle altre), mentre in nessun caso sono stati notati essudati batterici sulle piante. In alcuni



casi si sono osservate anche morie localizzate di alcune piante (Fig. 5-7).

Nella maggior parte dei casi i sintomi sono stati osservati su poche piante, in genere abbastanza vicine tra loro, localizzate prevalentemente sui bordi degli appezzamenti e comunque in numero molto basso con perdite di produzione del tutto trascurabili.

Gli appezzamenti dove sono state prelevate le piante sintomatiche sono diffusi in tutto il territorio regionale (Fig. 4) come anche quelli dove l'esito delle analisi è stato positivo.

La diffusione di *P. stewartii*, rilevata in tutta l'area maidicola regionale, potrebbe essere ricondotta all'utilizzo di seme infetto, benché la differente origine di produzione delle sementi impiegate sul territorio e la provenienza del materiale sementiero, di tutti i casi accertati, da Paesi in cui non è nota la presenza del batterio, lascia qualche dubbio a riguardo. Un'altra ipotesi è quella che il batterio sia già ampiamente diffuso sul territorio regionale e che, in considerazione dell'esiguità dei danni prodotti su mais ibridi, non ci si sia mai accorti del problema. Il 2017 è stato infatti il primo anno in cui si è condotta un'indagine territoriale anche su mais non da seme.

Figura 4: Analisi visive e di laboratorio effettuate su campioni di mais durante la stagione 2017.

Figura 5: Crescita stentata di alcune piantine.

Conclusioni

Vista la presunta assenza in Friuli Venezia Giulia del principale vettore e ospite per lo svernamento non si ritiene che questo batterio possa essere un problema di elevata entità. Sono però necessari ulteriori studi per approfondire e valutare la possibile presenza di vettori anche tra quelli non noti per il continente americano. Le piante di mais infette trovate in aree anche molto distanti del territorio regionale e concentrate principalmente sul bordo degli appezzamenti, potrebbero far supporre la presenza del batterio in altre piante ospiti, spontanee e coltivate, di *P. stewartii* quali ad esempio *Agrostis gigantea*, *Cucumis sativus*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Triticum aestivum* (OEPP/EPPO Bulletin, 2016; Pataky & Ikin, 2003).

Nel 2018 oltre a proseguire il monitoraggio sul territorio regionale, in particolare su mais da seme (qualora presente), sarà necessario ritornare negli appezzamenti risultati positivi a *P. stewartii* per escludere un eventuale insediamento del batterio nell'ambiente, campionando anche eventuali piante ospiti alternative, così da verificare se la presenza rinvenuta nel 2017 sia da considerarsi occasionale in quanto dipendente dall'impiego di semente infetta.



Figura 6: Moria localizzata di alcune piante.

Figura 7: Foglie con striature giallo/verdi longitudinali lungo le nervature.



Bibliografia

- EPPO, 2016. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 46 (2), 226–236.
- EPPO, 2018. EPPO GlobalDatabase, <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIST/>
- Pataky Jerald & Ikin Robert, 2003. The risk of introducing *Erwinia stewartii* in maize seed; Pest Risk Analysis for The International Seed Federation.
- Thapa Shree Prasad, Duck Hwan Park, Calum Wilson & Jang Hyun Hur & Chun Keun Lim, 2012. Multiplex PCR assay for the detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* using species-specific genetic markers. Australasian Plant Pathol.