

# Screening preliminare del germoplasma di olivo siciliano per l'identificazione di presunti genotipi resilienti a *Spilocaea oleaginea* mediante metodi di rilevamento classico e tecniche molecolari di diagnosi precoce

Daniela Antonina Trippa<sup>1</sup>, Francesco Paolo Marra<sup>2</sup>, Annalisa Marchese<sup>1\*</sup>, Floriana Bonanno<sup>3</sup>, Salvatore Davino<sup>1</sup>, Tiziano Caruso<sup>1</sup>, Valeria Imperiale<sup>1</sup>, Giuseppe Campisi<sup>1</sup>, Antonio Giovino<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Università di Palermo, Viale delle Scienze—Ed. 4, 90128 Palermo, Italia;

<sup>2</sup>Dipartimento di Architettura (DARCH), Università di Palermo, Viale delle Scienze—Ed. 8, 90128 Palermo, Italia;

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di Ricerca Difesa e Certificazione sede di Bagheria (CREA-DC), 90011, Italia.

Email: annalisa.marchese@unipa.it

## INTRODUZIONE

La *Spilocaea oleaginea* (Cast.) Hughes è l'agente eziologico dell'occhio di pavone, una malattia fungina dell'olivo che può provocare grave filloptosi, incidendo negativamente sulla quantità di fotosintetati disponibili per le attività metaboliche della pianta, causando significative perdite di produzione. L'incidenza della malattia è correlata alle condizioni climatiche (elevata umidità). Il parassita ha un periodo di incubazione di diversi mesi, non presentando sintomi visibili ad occhio nudo nei primi stadi successivi all'infezione. I sintomi si evidenziano sulla pagina superiore delle foglie quando il patogeno ha già concluso il suo ciclo, sottoforma di macchie concentriche più o meno necrotizzate, circondate da un alone clorotico. Le tecniche di diagnosi precoce risultano fondamentali nella difesa fitosanitaria dell'oliveto.

## SCOPO DEL LAVORO

Nel seguente lavoro, svolto nell'ambito del progetto "Applicazione di tecnologie intelligenti per il monitoraggio, la prevenzione e la diagnosi precoce delle malattie di interesse economico nell'olivo" (Gruppo ATS ProOlio, PSR Sicilia 2014-2020) è stato eseguito uno screening per il monitoraggio della malattia, utilizzando genotipi locali di olivo e cultivar di riferimento poco vigorose allevate in parete, con sestri di impianto a diverse densità. L'obiettivo del lavoro è stato quello di valutare la suscettibilità di ciascun genotipo e identificare i presunti resilienti, monitorando l'incidenza dell'infezione da *S. oleaginea* attraverso il metodo di diagnosi - NaOH test - ideato da Loprieno e Tenerini (1959) e impiegando strumentazioni di diagnostica precoce quali il termociclatore portatile bCUBE® della Hyris che permette di effettuare RT-PCR e LAMP.

## MATERIALI E METODI

**Materiale vegetale.** Lo screening preliminare è stato effettuato su tutti i genotipi presenti nei campi studio considerati (Tab. 1). N. 100 foglie sono state raccolte con campionamento casuale da più parti della chioma, in 3 momenti diversi dell'anno (agosto, dicembre, aprile).

**NaOH test.** Le foglie campionate con sintomi non visibili e visibili (Fig. 1) sono state immerse in NaOH al 5% per 2 minuti a 50-60°C. L'incidenza della malattia è stata valutata determinando la percentuale di foglie infette nei tre periodi. Ciò ha permesso di individuare 3 stadi: T0 (nessun segno della malattia), T1 (malattia allo stadio iniziale), T2 (malattia conclamata).

**Estrazione RNA.** Dai campioni prelevati nei 3 stadi considerati è stato estratto RNA totale utilizzando il kit "Spectrum Plant Total RNA" (Sigma).

I retrotrascritti ottenuti con il kit di sintesi del primo filamento di cDNA "iScript™ gDNA" (BioRad) sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'amplificazione.

**Amplificazione RT-PCR e Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) bCUBE® (Fig. 2).** Sono state utilizzate 4 coppie di primer (Olest08, Olest30, Olest34 e Olest72, Benitez *et al.*, 2005) che amplificano geni differenzialmente espressi in cultivar di olivo resistenti e suscettibili a *S. oleagina*. Il gene *housekeeping* Olest34 (GenBank CK087212) ha permesso di normalizzare le curve.

**Analisi del trascrittoma.** L'espressione dei geni è stata studiata con l'analisi degli RNA messaggeri mediante tecniche di sequenziamento di ultima generazione (Next Generation Sequencing) in due cultivar: Nocellara del Belice (altamente suscettibile - AS) e Koroneiki (scarsamente suscettibile - SS) nei due stadi T0 e T2. Nuovi primers di putativi biomarker sono stati disegnati.



Fig. 1



Fig. 2

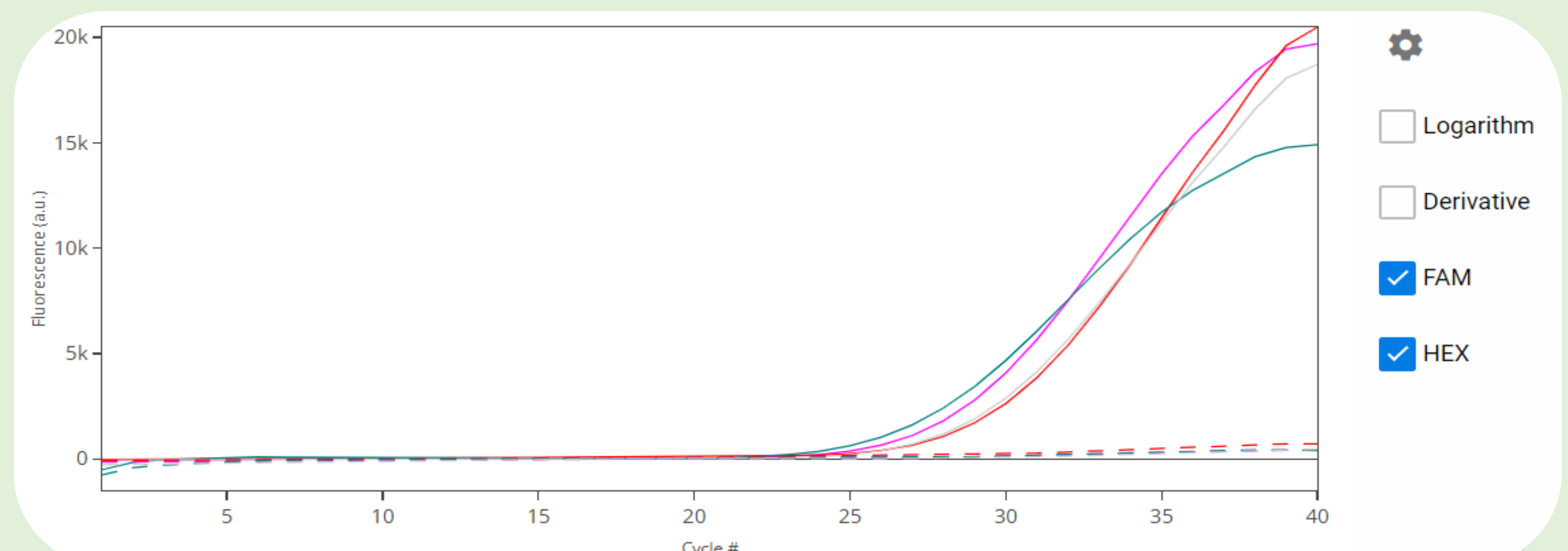
**Fig. 1, 2** – Confronto tra una foglia con sintomi non visibili e visibili (in alto); dispositivo portatile bCUBE® in campo (in basso).

**Tab. 1** - Screening della presenza dell'occhio di pavone su cultivar d'olivo (a destra) effettuato a dicembre.

Cultivar	% Foglie infette <i>S. oleaginea</i>
AITANA	0
ARBEQUINA	8
BARIDDARA	28
BIANCOLILLA CALTABELLOTTA	20
BIANCOLILLA NAPOLETANA 1	4
BIANCOLILLA PANTELLERIA	24
BOTTONE DI GALLO VASSALLO	0
BRANDOFINO ST	12
CALAMIGNARA	4
CAVALIERI	8
CERASUOLA CAPPUCCIA	4
CERASUOLA ST	12
GIARRAFFA	4
INDEMONIATA	8
KORONEIKI	0
LUNGA DI VASSALLO	0
MINNA DI VACCA P9 1	0
MINUTA	4
MONACA 1	16
MORESCA P6 (UO 95 SOAT 45)	8
MURTIDDARA VASSALLO	0
NASITANA	16
NOCELLARA BELICE	12
NOCELLARA MESSINESE RICC.	0
OLIVO DI MONACI	0
OPERA PIA	0
PIRICUDDARA	0
TUNNULIDDA	8
VADDARICA	0
VERDELLO ST	16
VETRANA	0

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del test NaOH hanno permesso di determinare gli stadi T0, T1, T2 e il monitoraggio ha permesso di individuare cv suscettibili e putative resilienti (Tab. 1). Nel complesso, la suscettibilità sembra essere genotipo dipendente e correlata alle distanze di impianto, poiché l'infezione è meno presente nei sistemi di impianto in parete a minore densità. Due dei biomarcatori utilizzati (Olest08 e Olest72, Benitez *et al.*, 2005) sono risultati utili nella segnalazione precoce dell'infezione mediante analisi real-time effettuata con il bCUBE® (Fig. 3). L'analisi trascrittomica di Nocellara del Belice (AS) e Koroneiki (SS) ha permesso di individuare geni differenzialmente espressi che possono essere utili per la scoperta di nuovi biomarcatori. Per alcuni di essi è in corso la validazione attraverso test semiquantitativi in tempo reale RT-PCR e LAMP effettuati con il bCUBE® per rilevare i primi segni della malattia (dati non mostrati). Finora le sequenze di questi bio-markers putativi non hanno trovato una corrispondenza con i geni depositati nella GenBank NCBI, del genoma di *Olea europaea* var. *sylvestris* (Unver *et al.*, 2017) e *Olea europaea* cv. "Arbequina" (Rao *et al.*, 2021) relativi.



**Fig. 3** - Curva di espressione gene Olest08 allo stadio T1 nelle cv Nocellara del Belice, Koroneiki, Arbequina.

I risultati preliminari sono promettenti per l'ulteriore sviluppo di una tecnica di rilevamento precoce della malattia attraverso l'uso di termociclatori portatili che possono essere utilizzati nei laboratori di fitopatologia e nel prossimo futuro anche direttamente in campo.

## BIBLIOGRAFIA

- Benitez *et al.* (2005). Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. *Molecular plant pathology*, 6(4), 425-438.
- Loprieno, N., & Tenerini, I. (1959). Metodo per la diagnosi precoce dell'«occhio di pavone» dell'olivo (*Cycloconium oleaginum* Cast.). *Journal of Phytopathology*, 34(4), 385-392.
- Rao, G., *et al.* (2021). De novo assembly of a new *Olea europaea* genome accession using nanopore sequencing. *Horticulture research*, 8.
- Unver, T., *et al.* (2017). Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(44), E9413-E9422.