

Varietà tolleranti/resistenti e prospettive per l'olivicoltura

Donato Boscia

CNR, Istituto per la Protezione Sostenibile delle
Piante, Bari (IT)

Le resistenze genetiche a patogeni e parassiti



Fillossera della vite



Tristeza degli agrumi

La storia della Patologia Vegetale riporta diversi esempi di successo contro epidemie e malattie delle piante

Esistono resistenze genetiche a batteri in parecchie specie agrarie (ad es. melo, pero, pioppo, patata, pomodoro, medica, mais, cotone, riso, etc.)

Dalla tolleranza all'immunità: diversi livelli di suscettibilità/resistenza

- **NOTE DIVERSE FONTI NATURALI DI RESISTENZA A *XYLELLA FASTIDIOSA* IN VITE E AGRUMI**

MA MANCAVANO INFORMAZIONI DI POSSIBILI FONTI DI RESISTENZA/TOLLERANZA NELL'AMPIO GERMOPLASMA DI OLIVO

Resistenza a *Xylella* in agrumi

High susceptible



Sweet oranges (*Citrus sinensis*)

Resistant



Lemons and
limes



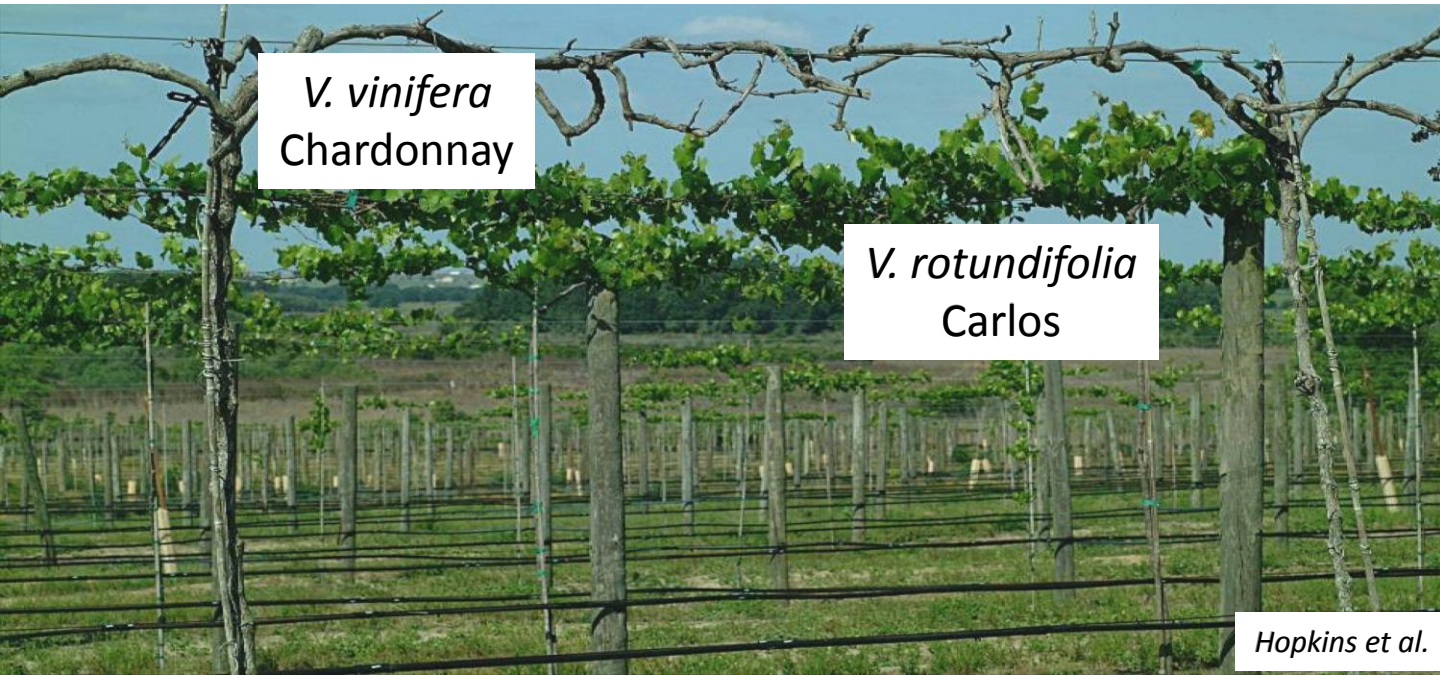
Mandarins
(*C. reticulata*)



Tangor and
tangelos

De Souza et al.

Resistenza a *Xylella* in vite



V. vinifera
Chardonnay

V. rotundifolia
Carlos

Hopkins et al.

Biodiversità in olivo: migliaia di cultivar in diverse collezioni internazionali

Variabilità tra cultivar diverse

Variabilità nell'ambito della stessa cultivar (Cloni)

**Necessità di
identificare cultivar o
cloni resistenti o
tolleranti**



**OSSERVAZIONI IN OLIVETO DELLE POCHE CULTIVAR
PRESENTI NELLA ZONA DISASTRATA MISERO SUBITO IN
EVIDENZA L'ESISTENZA DI **DIVERSA SENSIBILITA'**
ALL'INFEZIONE DI XF**





Leccino

Carolea



4 principali linee di ricerca:

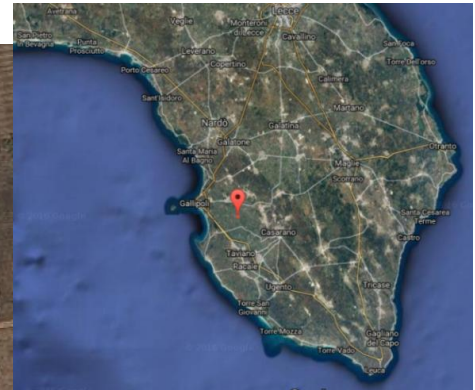
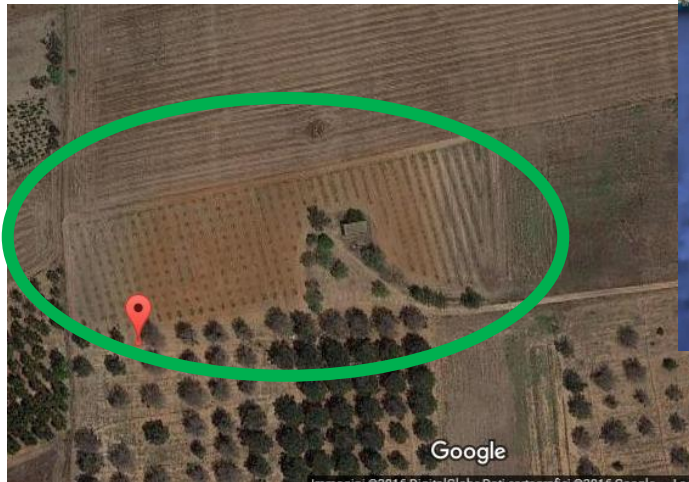
Osservazioni continue in area infetta per la ricerca di olivi asintomatici

Campi sperimentali per la valutazione della suscettibilità di cultivar diverse all'infezione di Xf

Sovrinnesto di alberi infetti per una più rapida identificazione di fonti di resistenza
(*Quick Tolerance test*)

Selezione e caratterizzazione di olivi spontanei asintomatici

Selezione di siti in area infetta idonei alla realizzazione di campi sperimentali



Primo campo sperimentale: 2015, nell'ambito di un progetto pilota dell'EFSA



Arbequina
Arbosana
Cellina di Nardò
Cima di Melfi
Coratina
Don Carlo
Frantoio
FS17
Koroneiki
Leccino

Questo campo è stato ampliato ad Aprile 2016



- ASCOLANA TENERA
- BELLA DI SPAGNA
- CELLINA DI NARDO'
- CIPRESSINO
- DOLCE DI CASSANO
- ITRANA
- LECCINO
- MAIATICA
- NOCELLARA ETNEA
- NOCELLARA MESSINESE
- NOCIARA
- OGLIAROLA
- OLIASTRO
- PENDOLINO
- PERANZANA
- PICHOLINE
- SIMONE
- TERMITE DI BITETTO
- TOSCANINA



E ulteriormente esteso a Novembre 2016



Xylella Fastidiosa Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy



Changlot x Dolce Agogia
Changlot x Dolce Agogia

Arbequina o.p.

Frantoio o.p.

Frantoio x Arbosana

Frantoio x Arbosana

Frantoio x Arbosana

Koroneiki o.p.

Koroneiki x Empeltre

Koroneiki x Empeltre

O. cerasiformis

O. cerasiformis

PicualxJec9

PicualxJec9

JA5 - subsp. europaea var. sylvestris

MSAC43 - subsp. europaea var. sylvestris

OLM28 - subsp. europaea var. sylvestris

OLM40 - subsp. europaea var. sylvestris

TN10 - subsp. guanchica

TN2 - subsp. guanchica

2017: 40 NUOVE SELEZIONI FORNITE DAI COLLEGHI DELL'IFAPA (CORDOBA)



Abou Kanani	Syria
Arbequina	Spain
Arbosana	Spain
Ascolana Tenera	Italy
Ayvalik	Turkey
Barnea	Israel
Barri	Syria
Canino/caninese	Italy
Changlot Real	Spain
Chemlal de Kabylie	Argelia
Chetoui	Tunisia
Chiquitita	Spain
Coratina	Italy
Empeltre	Spain
Frantoio	Italy
Galega	Portugal
Gordal Sevillana	Spain
Grappolo	Italy
Hojiblanca	Spain
Kalamon	Greece
Koroneiki	Greece
Lastovka	Croatia
Leccino	Italy
Maarri	Syria
Manzanilla de Sevilla	Spain
Mari	Iran
Mastoidis	Greece
Megaritiki	Greece
Memecik	Turkey
Meski	Tunisia
Moraiole	Italy
Morrut	Spain
Picholine	France
Picholine marrocaïne	Marocco
Picual	Spain
Picudo	Spain
Shengeh/Fishomi	Iran
Toffahi	Egypt
Uovo di Piccione	Italy
Uslu	Turkey

Per metà esposte ai vettori in area infetta prima del trapianto



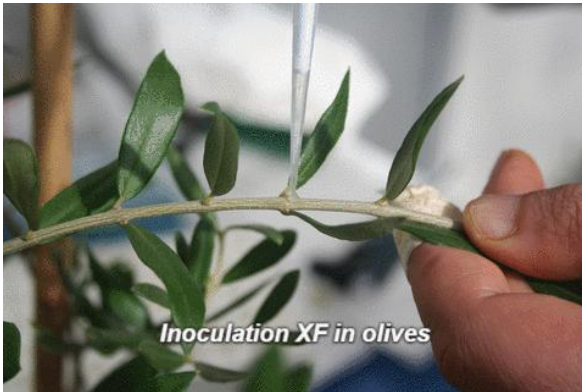
Per metà inoculate artificialmente con *Xylella* e mantenute in condizioni controllate (Bari)



Xylella fastidiosa Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy



Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante
Consiglio Nazionale delle Ricerche



2016: 2 campi sperimentali in area infetta



COLDIRETTI



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO**



**Centro di Ricerca
Sperimentazione e Formazione
in Agricoltura "Basile Caramia"**



**Istituto per la Protezione Sostenibile delle Pianta
Consiglio Nazionale delle Ricerche**



**VALUTAZIONE DEL GERMOPLASMA OLIVICOLO
PUGLIESE E MIGLIORAMENTO GENETICO
PER LA RESISTENZA A *XYLELLA FASTIDIOSA* - **RE.D.O.XY****



- **Tema di ricerca:** Suscettibilità varietale del germoplasma olivicolo e miglioramento genetico finalizzato alla resistenza al patogeno
- **Attività previste:** Valutazione, in campo e in laboratorio, della Suscettibilità di circa 100 cultivar della piattaforma varietale pugliese, in gran parte recuperate nell'ambito dei Progetti OLIVA e REGEROP

REALIZZAZIONE DEL CAMPO SPERIMENTALE (IN PROVINCIA DI LECCE)

**L'elenco completo delle cultivar sotto
valutazione è adesso consultabile alla
webpage del progetto XF-ACTORS:**

<http://www.xfactorsproject.eu>

SCREENING OF OLIVE CULTIVARS FOR SEARCHING SOURCES OF RESISTANCE TO XYLELLA FASTIDIOSA

09/11/2017



Alcuni risultati preliminari incoraggianti:

**Tratti di resistenza in
Leccino e FS-17 (Favolosa)**

Resistenza o Tolleranza?

“Resistenza” e “Tolleranza” rappresentano due condizioni di risposta della pianta all’infezione di un patogeno sistemico, ossia in grado di colonizzare l’intera pianta attraverso il sistema vascolare.

In generale la Resistenza attiene alla popolazione del patogeno ed alla sua distribuzione nella pianta, mentre la Tolleranza attiene al fenotipo che l’infezione di un determinato patogeno induce in un ospite.

Secondo quanto riportato in G.N. Agrios - “Plant Pathology (5th edition)”, una specie/cultivar è definita “resistente” se impedisce lo sviluppo di un patogeno, proprietà che gli è conferita dal possedere dei cosiddetti “tratti” di resistenza (*Resistant: Possessing qualities that hinder the development of a given pathogen; infected little or not at all*). Al contrario la “tolleranza” è la capacità di una specie/cultivar di tollerare gli effetti di una malattia (*Tolerance - The ability of a plant to sustain the effects of a disease without dying or suffering serious injury or crop loss*).

Tai *et al.* (2013) in uno studio sulle infezioni di *Verticillium dahliae* in patata definiscono: (i) “Suscettibile” una cultivar caratterizzata da infezione estensiva (sistemica e ad elevata concentrazione) e sintomi severi, come osservato in Ogliarola salentina e Cellina di Nardò a seguito di infezione di *X. fastidiosa* sottospecie *pauca* ST53; (ii) “Tollerante” una cultivar con infezione estensiva e sintomi limitati; (iii) “Resistente” una cultivar che limita la crescita del patogeno e mostra sintomi limitati (*Susceptible plants are characterized by extensive infections and severe symptoms appearing within days of inoculation (Fradin and Thomma 2006; Kawchuk et al. 2001). Resistance is where pathogen growth is limited and few symptoms appear*).

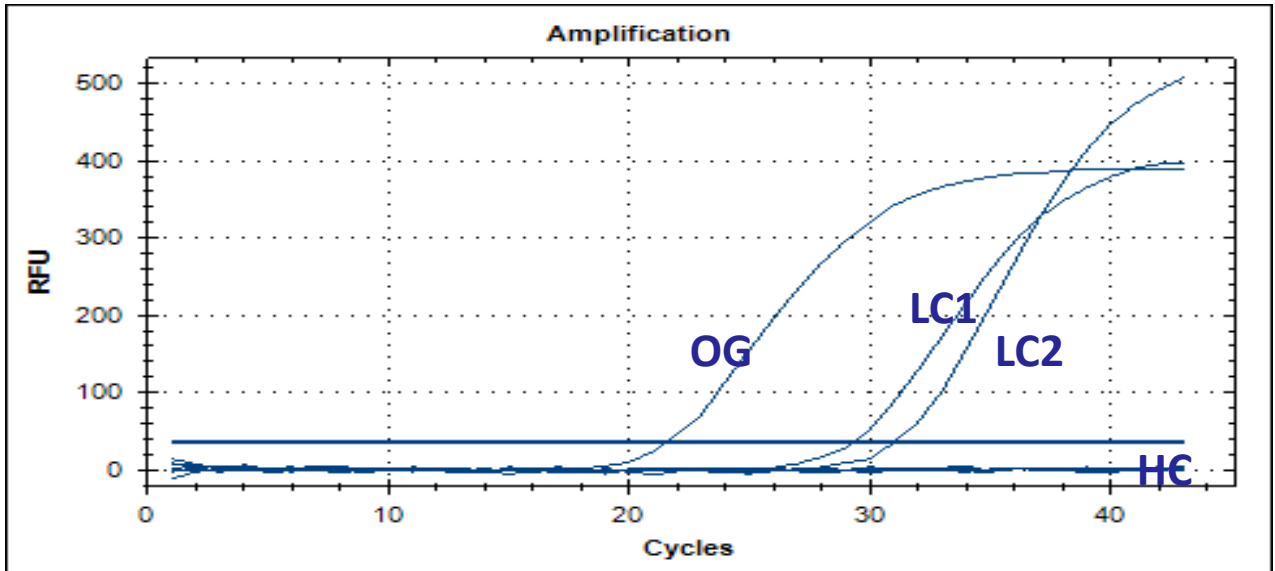
Sulla base di queste definizioni, la limitazione della crescita di *X. fastidiosa* sottospecie *pauca* ST53 rilevata con le analisi effettuate sino ad ora sia su Leccino che su FS-17 va classificata come fenomeno di “Resistenza” piuttosto che di “Tolleranza”.



Evidenze di resistenza:

XF IN LECCINO È **100X** MENO CONCENTRATA DI OGLIAROLA

Quantitative PCR assay



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

Analisi comparative del trascrittoma (**analisi dell'attività genetica**) di Leccino e Ogliarola mostrano che **in Ogliarola infetta si rileva, rispetto a Leccino, la sovraespressione di geni coinvolti nello stress indotto da *X. fastidiosa* già identificati in agrumi e vite suscettibili**

Giampetruzzi et al. *BMC Genomics* (2016) 17:475
DOI 10.1186/s12864-016-2833-9

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE

Open Access

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



Annalisa Giampetruzzi¹, Massimiliano Morelli², Maria Saponari², Giuliana Loconsole¹, Michela Chiumenti², Donato Boscia², Vito N. Savino¹, Giovanni P. Martelli¹ and Pasquale Saldarelli^{2*}

Leccino: trasmissione più contenuta

Evaluation of olive cultivar effect on the efficiency of the acquisition and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae)

V. Cavalleri¹, C. Dongiovanni², G. Altamura¹, D. Tauro², A. Ciniero², M. Morelli³, D. Bosco³, M. Saponari¹

¹CNR – Istituto per la Protezione Sostenibile delle Pianta, SS Bari, Italy; ²Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura “Basile Caramia”, Locorotondo, Italy; ³Università degli Studi di Torino, DISAFA, Grugliasco (Torino), Italy

INTRODUCTION. The meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (L.) has been identified as vector of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* strain CoDiRO infecting several host plants in Apulia (Southern Italy), and causing a major bacterial disease on olive trees, the predominant crop in the currently contaminated area (Saponari et al., 2014; Comara et al., 2017a; Comara et al., 2017b). Evidences of differential olive cultivar susceptibility to the bacterial infections were obtained from phenotypic characterization and molecular investigations. A higher bacterial population (up to 100 times) was consistently detected in the trees of the most susceptible cultivars (i.e. Ogliarola and Cellina di Nardò, showing severe symptoms), compared to the trees of the cultivar Leccino showing milder symptoms and erratic distribution of the bacterium within the canopy. In order to determine the epidemiological impact of olive trees harboring low bacterial population, transmission experiments were set under semi-field conditions, by caging *Xy*-free specimens of *P. spumarius* on branches of field-infected trees of the above mentioned cultivars.

Table 1. Results of three transmission experiments: percentage (%) of olive plants using insects from susceptible and tolerant source plants.

Source Plant (cultivar)	Acquisition (positive insects/total)	Transmission (positive plants/total)
A) JUNE 2016		
Ogliarola - field 1	8,7% (2/23)	20% (1/5)
Cellina - field 2	36,0% (10/28)	38,4% (5/13)
Leccino - field 1	12,9% (4/31)	25 (2/8)
Leccino - field 2	6,7% (2/30)	0 (0/7)
B) JULY 2016		
Ogliarola - field 1	57,1% (4/7)	0 (0/2)
Cellina - field 2	15,0% (1/7)	40% (2/5)
Leccino - field 1	6,0 (0/5)	0 (0/3)
Leccino - field 2	14,7% (4/24)	0 (0/6)
C) SEPTEMBER 2016		
Ogliarola - field 1	50,0% (21/42)	55,5% (5/9)
Cellina - field 2	27,1% (16/59)	26,6% (4/15)
Leccino - field 1	7,0% (3/40)	0 (0/11)
Leccino - field 2	2,4% (1/41)	0 (0/11)

Figure 2: Caged recipient olive plants during the inoculation access period.



Figure 1: Infected olive trees used for the transmission experiments. From the left to the right: Field 1 with the 30-years old Leccino (A) without severe dessication and decline; and in the same field 1 the severely affected trees of the cv Ogliarola salentina (B). Field 2 with the young plants (C) and showing the caged branches (D).

Leccino ospita una popolazione di *Xylella* più erratica e 100 volte più bassa di Ogliarola. Prove sperimentali mostrano una sensibile riduzione dell'efficienza di trasmissione rispetto ad Ogliarola



OLIVICOLTURA

STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE FUTURE

Resistenza a *Xylella fastidiosa* in diverse cultivar di olive

RUOLO STRATEGICO DEGLI OPERATORI

IN
breve

OSSERVAZIONI E RILEVAMENTI

da saggi diagnostici
un'area di quarantena

batterio.
suscettibilità
gliarola salentina

macchina
nessuna
qualsiasi speranza di eradi-
cazione, facendo concentrare gli sforzi
su azioni di contenimento e sulla ri-
cerca di soluzioni che consentano una
convivenza sostenibile con il batterio.

Individuare cv resistenti a *Xylella fastidiosa*

L'attuale indisponibilità di cure atte a eliminare *X. fastidiosa* dalle piante infette indirizza verso più concrete strategie di convivenza, rappresentate dalla ricerca di fonti di resistenza nell'olivo e incoraggiate dalle promettenti risultanze delle analisi effettuate su soggetti della cv Leccino. Peraltro, l'individuazione di germoplasma resistente a *Xylella* è contemplata negli Stati Uniti tra le strategie di gestione della malattia di Pierce

di D. Boscia, G. Altamura, A. Ciniero, M. Di Carolo, C. Dongiovanni, G. Fumarola, A. Giampetruzzi, P. Greco, P. La Notte, G. Loconsole, F. Manni, G. Melcarne, V. Montilon, M. Morelli, N. Murrone, F. Palmisano, P. Pollastro, O. Potere, V. Roseti, P. Saldarelli, A. Saponari, M. Saponari, V. Savino, M.R. Silletti, F. Specchia, L. Susca, D. Tauro, D. Tavano, P. Venerito, S. Zicca, G.P. Martelli

La Puglia meridionale è da qualche anno alle prese con una epidemia di un ceppo di *Xylella fastidiosa*, batterio da quaran-

mente tra il 2008 e il 2010.

Dal focolaio, che tre anni e mezzo fa era confinato in un'area del diametro di una decina di chilometri, si è passa-



LECCINO ED FS-17:

UN INCORAGGIANTE PUNTO DI PARTENZA NELLA RICERCA DI MATERIALE RESISTENTE

Che ha consentito di alleggerire il divieto d'impianto
in zona infetta in vigore con le Decisioni comunitarie:

***Determinazione del Dirigente della Sezione Osservatorio
Fitosanitario 17 maggio 2018, n. 280***

DAL REPORT SULLE EVIDENZE SCIENTIFICHE DI RESISTENZA (12 MARZO 2018):

- in considerazione del recente ritrovamento delle infezioni in Salento, mancano osservazioni di lungo periodo che confermino la tenuta della resistenza nel tempo
- mancano dati comparativi di produttività tra piante sane ed infette di “Leccino” ed “FS-17”.

- Restano da investigare e comprendere i meccanismi che regolano la risposta alle infezioni delle diverse varietà e quindi i determinanti genetici della resistenza in olivo.

Sulla base delle predette considerazioni conclusive, in caso di autorizzazione di nuovi impianti delle piante ospiti sopramenzionate, in deroga al divieto di impianto, è importante evidenziare come l'utilizzo delle varietà o delle specie ospiti ad oggi note come resistenti/meno suscettibili alle infezioni, non escluda dal rischio di evoluzione negativa nel lungo periodo delle infezioni da *X. fastidiosa*, con possibili danni economici alla produzione.

3 - Sovrinnesto per un «Quick tolerance test»



I numeri
(30/04/2018):
12,2 ettari
5000 innesti
260 cultivars!

La nascita dell'idea dei sovrainnesti

Scommessa sperimentale



Uso sovrainnesto a pezza (esperienza su larga scala nel nord barese-BAT per la sostituzione della cv Ogliarola barese con Coratina)

Vantaggi del sovrainnesto

- Totalmente **REVERSIBILE**
- Senza controindicazioni per la salute della pianta e per l'ambiente
- Relativamente rapido per la ricostituzione della chioma
- Compatibile con altri metodi alternativi di cura e sperimentazioni
- Semplice ed effettuabile con manodopera formata in zona
- Poco costoso (meno di una polizza di assicurazione)
- Da effettuare una tantum

Le basi dell'idea

Praticamente tutte le piante di leccino coltivate nelle aree infette del Salento sono innestate su semenzali provenienti prevalentemente dalla varietà sensibile Ogliarola salentina.

Tutte le piante di olivo esistenti nelle prime aree focolaio di Gallipoli e comuni limitrofi sono state esposte a fortissima pressione d'inoculo per almeno 4 anni.

Alcuni sovrainnesti di leccino di svariati anni (> 10 anni) sopravvivono e tollerano bene la malattia seppur sovrainnestati su tronchi delle varietà sensibili locali. I tronchi evidentemente continuano a mantenere la funzionalità vascolare.

L'IDEA PROGETTUALE E GLI OBIETTIVI

- 1) Valutazione e ottimizzazione della pratica del sovrainnesto in campo**
- 2) Valutazione economica delle operazioni complessive per il sovrainnesto
- 3) Messa a punto di una procedura rapida per la valutazione della sensibilità varietale in condizioni di pieno campo**
- 4) Verifica del grado di fragilità e rischio potenziale (produttivo/paesaggistico) dell'epidemia per altre aree olivicole
- 5) Individuazione di ulteriori varietà tolleranti/resistenti al Disseccamento Rapido dell'Olivo nel germoplasma mediterraneo



La tecnica

L'innesto a pezza:



24 Aprile 2016
Avvio della prova



I numeri ed il germoplasma in prova

3 oliveti per oltre **12,2 ettari**

Schema randomizzato con 5 repliche e 4-5
innesti/pianta

3 Controlli interni (cvs tolleranti/suscettibili) per ogni
pianta

260 tra varietà e cloni innestati

Campi ufficializzati con comunicazione al Servizio
Fitosanitario Nazionale e della Regione Puglia
(Osservatorio)

Materiali provenienti da zone indenni (poche eccezioni
per genotipi unici del Salento)

Le collaborazioni per reperire il germoplasma

- Università di Bari Az. Martucci (Valenzano)
- Nucleo di Premoltiplicazione Regionale e campi collezione dell'olivo a Palagiano (gestiti dal CRSFA)
- Libero Consorzio Comunale di Enna, Collezione germoplasma olivicolo di Zagaria (Dr. Andrea Scoto)
- Lazio (ARSIAL)
- Marche (ASSAM e Università Politecnica delle Marche)
- Abruzzo (Regione Abruzzo)
- Molise (Vivaio Verde Molise, Termoli)
- Campania (Parco Cilento e Università di Napoli)
- Liguria (CeRSAA e CCIAA Riviera di Liguria)
- Sardegna (Agris Sardegna, Servizio Ricerca)
- Umbria (Assoprol Umbria, Angela Canale)
- Diversi Consorzi DOP italiani



...nel frattempo la pratica di un altro tipo di innesto
(a trapano) fa intravedere la possibilità di
estendere ulteriormente, sulle stesse piante
secolari già utilizzate, il numero di cultivar da
saggiare

Si prendono rapidamente accordi con i ricercatori che
gestiscono la *World olive germplasm collection* di Cordoba
(Spagna) e si organizza in pochi giorni una missione, per
scegliere le marze ottimali per gli innesti

CORDOBA, SPAGNA, 5 MAGGIO 2018

WORLD OLIVE GERmplasm COLLECTION (IFAPA)



PRESICCE, AZ. MELCARNE, 7 MAGGIO 2018



**INTEGRAZIONE
DALLA COLLEZIONE *EX SITU*
WORLD OLIVE GERMPLASM
COLLECTION DELL'IFAPA DI CORDOBA:**

- 129** varietà o cultivar originarie di 16 diversi Paesi.
- 41** selezioni avanzate, ovvero nuove potenziali cultivar, del programma di breeding dell'olivo dell'IFAPA.
- 10** genotipi di olivi selvatici wild scelti per caratteri di interesse per il breeding

PRESICCE, AZ. MELCARNE, 9 GIUGNO 2018
32 GIORNI DOPO L'INNESTO!



PRESICCE, AZ. MELCARNE, 9 GIUGNO 2018

*Mentre sulle stesse piante...
Innesti di 2 anni (Maggio 2016)*



AGGIORNAMENTO "QUICK TOLERANCE TEST"

**Nella sperimentazione con gli innesti
avviata nell'azienda "Melcarne" dalle
260 cultivar iniziali (primavera 2016)
si è ora passati a**

440 cultivar!

**A cui vanno aggiunte le cultivar delle altre prove
sperimentali**

Un patrimonio inestimabile...

4 – INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI OLIVI SPONTANEI ASINTOMATICI (sperimentazione promossa dal Dr. G. MELCARNE)

Osservazione e selezione su base sintomatologica di SEMENZALI
SPONTANEI nelle principali aree focolaio della malattia



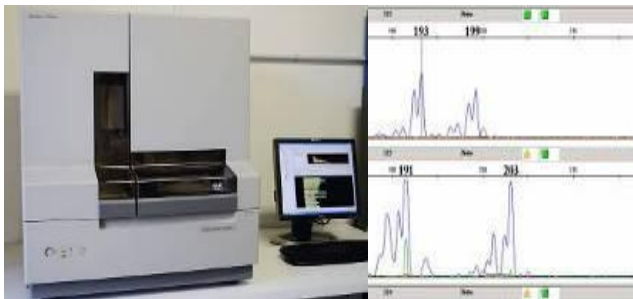
Circa 10.000 semenzali ispezionati

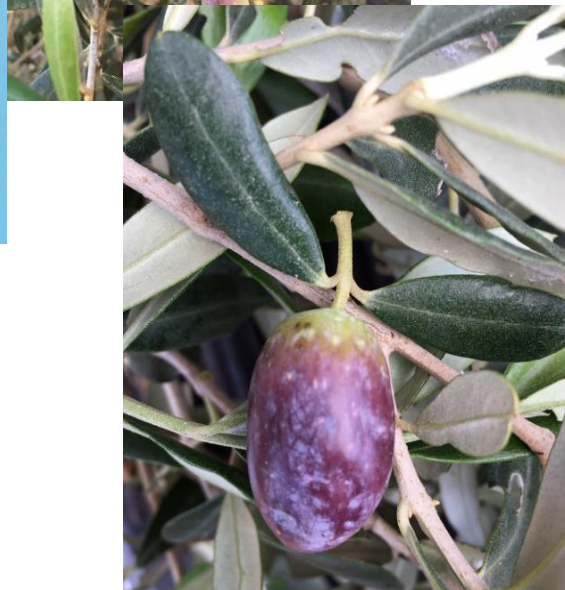
I semenzali asintomatici sono sottoposti ad analisi (PCR quantitativa) per selezionare quelli risultati negativi

Ad oggi (13 giugno 2018) sono 24 i semenzali risultati negativi al batterio dopo almeno 3 (in molti casi 5) analisi in periodi diversi e con caratteristiche pomologiche promettenti

Programma delle attività (in parte già avviate):

- Moltiplicazione
- Avvio della caratterizzazione genetica e ricerca dei parentali attraverso analisi microsatellite
- Avvio della caratterizzazione pomologica per alcuni dei semenzali
- Verifica della resistenza mediante test di patogenicità (inoculazione meccanica con batterio da coltura pura)
- Avvio della valutazione morfologica/produttiva/tecnologica





Grazie per l'attenzione