

Innovazioni per la certificazione delle produzioni vivaistiche di olivo: il contributo del progetto OLVIVA

Savino V.¹, Baldoni L.², Faggioli F.³, Loconsole G.¹ e Saponari M.⁴

¹ Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università di Bari

² CNR, Istituto di Genetica Vegetale, Perugia

³ CRA, PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

⁴ CNR, Istituto di Virologia Vegetale, Bari

New tools for the certification of olive nursery productions: the contribution of the research project "OLVIVA"

Abstract. The project "OLVIVA", supported by the Italian law 499/99, involves 25 different Scientific Institutions placed in 12 Italian regions. The aim of the project is to develop tools to improve protocols for clonal and phytosanitary certification of olive propagation material. Specific actions are (i) the assessment of cultivar genetic identity based on SSR markers for 200 main cultivars; (ii) the production of nuclear stocks (Primary Sources) for 70 olive cultivars and application for their registration in the certification system. The goal of the project is the definition of advanced, common and harmonized methodologies to perform reliable controls in all steps of the certification system.

Key words: olive, characterization, certification, common methodologies, Primary Sources.

Normative per la certificazione

L'esigenza di certificare le produzioni vivaistiche olivicole è stata recepita sin dagli anni '90 sia a livello locale e nazionale che comunitario, attraverso un pacchetto di normative e disciplinari a carattere volontario (DM 16/06/1993 recentemente sostituito dal DM 20/11/2006) ed obbligatorio (DM 14/04/1997). Le suddette normative forniscono le indicazioni generali relativamente ai protocolli per i controlli di certificazione varietale e sanitaria e alle modalità di gestione e conservazione dei materiali di propagazione nelle diverse fasi della filiera di certificazione.

Obiettivi e traguardi del progetto

Nell'ampio panorama di iniziative di promozione e valorizzazione delle produzioni oleicole che interessano diverse realtà regionali, il progetto di ricerca OLVIVA (2006-2009) si contraddistingue per: 1) l'in-

terregionalità dell'iniziativa; 2) il programma di ricerca scientifica finalizzato allo sviluppo di innovazioni tecnologiche per la qualificazione della filiera olivicola sin dal suo primo stadio: la pianta di olivo.

Il Progetto finanziato nell'ambito della L. 499/99 - Programmi Interregionali-Programma "Sviluppo Rurale" Sottoprogramma "Innovazione e Ricerca" D.M. n.25279 del 23/12/03, vede coinvolte 25 Istituzioni di Ricerca (Università, centri di ricerca del CNR e del CRA) che operano in dodici regioni italiane (Liguria, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Campania, Molise, Basilicata, Puglia, Calabria, Sicilia, Sardegna).

Obiettivi del progetto sono il riordino del patrimonio varietale olivicolo nazionale ed il miglioramento degli standard qualitativi del vivaismo nazionale, attraverso l'applicazione e il trasferimento di innovazioni tecnologiche e metodologie comuni, al fine di valorizzare e qualificare l'intera filiera.

In particolare il progetto ha quattro linee di intervento: a) caratterizzazione delle principali cultivar mediante la definizione e validazione di un set di marcatori molecolari e di descrittori morfologici comuni, con particolare riferimento alla messa a punto di sistemi validati ed univoci per la certificazione varietale dei materiali di propagazione; b) la verifica dello stato sanitario del materiale oggetto degli studi attraverso l'applicazione di tecniche innovative e standardizzate di diagnosi fitopatologica; c) la costituzione di 70 Fonti Primarie (anche attraverso l'applicazione di tecniche di risanamento da agenti virali) da immettere nel sistema nazionale di certificazione (D.M. 20/11/2006); d) il miglioramento degli schemi di produzione e di difesa fitosanitaria in vivaio mediante la sperimentazione e validazione di sistemi innovativi di propagazione (utilizzo della micorizzazione, della micropropagazione e dell'innesto in verde) e di sistemi eco-compatibili di gestione della produzione vivaistica.

Tra i traguardi che il progetto si propone di raggiungere, assume fondamentale importanza la definizione di metodologie innovative, univoche e comuni per la caratterizzazione varietale e sanitaria dei mate-

riali di propagazione in ogni fase della filiera di certificazione delle produzioni vivaistiche di olivo (fig. 1).

Infatti un sistema di certificazione non può prescindere dall'impiego di protocolli aggiornati, uniformi e validati, in grado di assicurare lo stesso livello di garanzia fitosanitaria e di corrispondenza varietale indipendentemente dalla realtà in cui si va ad operare. Le normative prima citate definiscono le tecniche diagnostiche, i periodi ottimali per il campionamento, gli organi della pianta da ispezionare e da utilizzare per i rilievi biometrici, le tecniche per la caratterizzazione genetica ecc. In base a questo ogni laboratorio esegue i saggi utilizzando reagenti, concentrazioni, cicli termici, etc. standardizzati sulla base delle proprie esperienze. Il progetto OLVIVA coinvolgendo i principali centri di ricerca impegnati su questi due fronti (certificazione varietale e sanitaria), rappresenta un'opportunità unica per definire ed utilizzare approcci di ricerca comuni nell'ambito di ciascuna tematica affrontata e per verificare la ripetibilità dei risultati nelle diverse situazioni operative. Pertanto la prima fase del progetto ha riguardato lo svolgimento di due ringtest specifici, rispettivamente per la selezione e l'impiego di marcatori SSR e per la selezione di pri-

mer virus-specifici e relativi protocolli di impiego ai fini della diagnostica virologica.

Caratterizzazione molecolare

È stato usato un pool comune di 18 marcatori microsatelliti (detti anche SSR, *Simple Sequence Repeats*) (Sefc *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002; de la Rosa *et al.*, 2002) preventivamente selezionati sulla base della loro capacità di discriminazione, chiarezza del segnale, a singolo locus, senza alleli nulli e non co-segreganti tra loro (Sarri *et al.*, 2006). Per la validazione dei risultati è stato eseguito un Ring-Test che consisteva nell'analisi di campioni sconosciuti da parte di tutti i laboratori e nella comparazione dei risultati ottenuti.

Una volta concordati i diversi profili molecolari, l'attività del Progetto prevede l'assemblaggio dei dati di tutte le varietà, per valutare il grado di similarità genetica fra tutte le cultivar in esame.

Questa iniziativa rappresenta il primo tentativo di comparazione complessiva dei dati prodotti da diversi laboratori su varietà delle diverse regioni e lo scopo è quello di poter finalmente disporre di informazioni



Fig. 1 - Esempio di cartellino-certificato per piante di olivo con stato sanitario virus-esente.
 Fig. 1 - Virus-free certified plants identified by the specific plant tags.

univoche sull'identità delle varietà e sugli eventuali casi di sinonimia ed omonimia.

Caratterizzazione morfologica

I rilievi bio-morfologici e pomologici sono stati eseguiti secondo una scheda di rilevazione dati che include i principali descrittori di pianta, foglia, infiorescenza, frutto ed endocarpo. L'insieme dei profili molecolari e dei parametri morfologici consentirà la definizione di una 'carta d'identità' per descrivere ciascuna cultivar sul piano genetico e fenotipico.

Verifica dello stato sanitario

Nella prima fase del progetto, per la diagnosi dei patogeni virali si è proceduto alla scelta e validazione di un protocollo diagnostico mediante ring test tra diversi laboratori. Sulla base di quanto emerso dai risultati, il protocollo di amplificazione genica in singolo tubo riportato in Faggioli *et al.*, 2005 è risultato quello più facilmente applicabile nei diversi laboratori e con un grado più elevato di efficacia e sensibilità nonché in grado di rilevare il maggior numero di isolati per ciascuno dei virus contemplati dalla normativa (tab. 1). Inoltre sono state definite e validate le coppie

di oligonucleotidi sintetici (Sabanadzovic *et al.*, 1999; Grieco *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2004; Faggioli *et al.*, 2005) in grado individuare il maggior numero di isolati per ciascun virus riportato in tabella 1. Anche per quanto riguarda la diagnosi di *Verticillium dahliae* e *Phytophthora* spp il progetto prevede lo sviluppo di nuove tecnologie diagnostiche e di metodi di controllo a basso impatto ambientale e, in particolare per il *Verticillium*, l'identificazione di germoplasma resistente o tollerante al patogeno. Infine, con la tecnica del risanamento, il progetto prevede di ottenere materiale sanitariamente valido ed idoneo all'immissione nei canali della certificazione, anche per quelle cultivar il cui stato sanitario risulta essere particolarmente compromesso dalla presenza di agenti virali invalidanti. E' questo il caso di diverse cultivar dell'Italia meridionale che risultano essere totalmente affette in particolare dal virus associato ingiallimento fogliare dell'olivo (OLYaV).

Conclusioni

Il Progetto OLVIVA ha non solo come principale obiettivo la costituzione di almeno 70 nuove accessioni di cultivar di olivo, appartenenti a tutte le Regioni facenti parte del progetto, da immettere nei canali

Tab. 1 - Indicazioni contenute nel DM 20/11/2006 relativamente agli agenti virali e ai protocolli di diagnosi da impiegare per la certificazione fitosanitaria dei materiali propagazione di olivo.

Tab. 1 - Guidelines reported in the DM 20/11/2006 about the viral agents and the relative detection protocol to certify the sanitary status of olive propagation material.

Malattia/Organismo nocivo	Virus controllato (VT)		Indicazioni per la diagnosi stabilite nel DM 20/11/06	Parametri oggetto di standardizzazione nell'ambito del ringtest OLVIVA
	Virus esente (VF)	Virus controllato (VT)		
Mosaico dell'Arabis (ArMV)	X	X	RT-PCR* o I.M.** utilizzando tessuto floematico ricavato da rami ben lignificati	<ul style="list-style-type: none"> - periodo di campionamento - numero di rami/campione - numero di campioni/pianta - protocollo per la preparazione dell'estratto vegetale - oligonucleotidi per le reazioni di RT-PCR - concentrazioni dei reagenti e cicli termici per le reazioni di RT-PCR - ribosonde per le reazioni di I.M. Reagenti e condizioni operative per le reazioni di I.M. - comparazione del livello di sensibilità e ripetibilità dei risultati ottenuti impiegando le diverse condizioni operative
Accartocciamento fogliare del ciliegio (CLRV)	X	X		
Maculatura anulare latente della fragola (SLRV)	X	X		
Mosaico del cetriolo (CMV)	X			
Latente 1 dell'olivo (OLV1)	X	X		
Latente 2 dell'olivo (OLV2)	X			
Associato all'ingiallimento fogliare dell'olivo (OLYaV)	X	X		
Necrosi del tabacco (TNV)	X			

* Reazioni di trascrizione inversa seguita da amplificazione genica; **Ibridazione molecolare

della certificazione, ma per la prima volta è previsto anche che l'accertamento dei requisiti genetici e sanitari sia ottenuto attraverso l'utilizzazione di protocolli comuni validati ed univoci. Ultimato il progetto, in tutti i laboratori nazionali si potrà ricorrere ad un identico sistema per ottenere: (i) un 'impronta genetica delle diverse varietà, passo indispensabile per risolvere casi di sinonimia e fornire strumenti analitici per la certificazione genetica del materiale di propagazione e per la tracciabilità varietale degli oli; (ii) una scheda varietale elaborata utilizzando descrittori bio-morfologici univoci e comuni; (iii) la definizione dello stato fitosanitario di una pianta di olivo utilizzando tecniche di campionamento e di diagnosi comuni.

Riassunto

Il progetto OLVIVA, finanziato nell'ambito della L. 499/99, rappresenta un'iniziativa interregionale che vede coinvolte 25 diverse Istituzioni scientifiche dislocate in 12 regioni italiane e che ha l'obiettivo di fornire gli strumenti operativi necessari per l'immediata applicazione dei nuovi protocolli di certificazione fitosanitaria e di corrispondenza varietale per le cultivar di olivo. Obiettivi specifici del progetto sono il riordino del patrimonio varietale nazionale mediante caratterizzazione molecolare e morfologica di 200 cultivar, la produzione di 70 Fonti Primarie da immettere nel sistema di certificazione ed il miglioramento degli standard qualitativi del vivaismo olivicolo nazionale. Uno dei traguardi che il progetto si propone di raggiungere è la definizione di metodologie innovative, univoche e comuni da applicare in tutta la filiera di certificazione nazionale per assicurare standard qualitativi elevati e garanzie fitosanitarie uniformi.

Parole chiave: olivo, caratterizzazione, certificazione, metodologie univoche, Fonti Primarie.

Bibliografia

- CARDOSO J.M.S., FELIX M.R., OLIVEIRA S., CLARA M.I.E., 2004. *A Tobacco necrosis virus D isolate from Olea europaea L.: viral characterization and coat protein sequence analysis*. Archives of Virology, 149: 1129-1138.
- CARRIERO F., FONTANAZZA G., CELLINI F., GIORIO G., 2002. *Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (Olea europaea L.)*. Theor. App. Gen., 104: 301-307.
- CIPRIANI G., MARRAZZO M.T., MARCONI R., CIMATO A., TESTOLIN R., 2002. *Microsatellite markers isolated in olive (Olea europaea L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars*. Theor. App. Gen., 104: 223-228.
- DE LA ROSA R., JAMES C.M., TOBUTT K.R., 2002. *Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (Olea europaea L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae*. Molecular Ecology Notes, 2: 265-267.
- FAGGIOLI F., FERETTI L., ALBANESE G., SCIARRONTI R., PASQUINI G., LUMIA V., BARBA M., 2005. *Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR*. J. Plant Pathology, 87 (1): 49-55.
- GRIECO F., ALKOWNI R., SAPONARI M., SAVINO V., MARTELLI G.P., 2000. *Molecular detection of olive viruses*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 30: 469-473.
- SABANADZOVIC S., ABOU-GHANEM N., LA NOTTE P., SAVINO V., SCARITO G., MARTELLI G.P., 1999. *Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing*. J. of Plant Pathology, 81: 37-45.
- SARRI V., BALDONI L., PORCEDDU A., CULTRERA N.G.M., CONTENTO A., FREDIANI M., BELAJ A., TRUJILLO I., CIONINI P.G., 2006. *Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations*. Genome, 49(12): 1606-1615.
- SEFC K.M., LOPES M.S., MENDONÇA D., RODRIGUES DOS SANTOS M., LAIMER DA CAMARA MACHADO M., DA CAMARA MACHADO A., 2000. *Identification of microsatellite loci in olive (Olea europaea) and their characterization in Italian and Iberian olive trees*. Molecular Ecology, 9: 1171-1173.