



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Corso di dottorato di ricerca in Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali

Dipartimento di SAAF

Sviluppo di una metodica su dispositivo portatile per la determinazione in situ di biomarcatori espressi in seguito a stress biotico provocato dall'infezione da *Spilocaea oleagina* in olivo (*Olea europaea* L.)

TESI DI DOTTORATO DI:

DANIELA ANTONINA TRIPPA

RELATORE:

PROF. FRANCESCO PAOLO MARRA

CORRELATORE:

PROF. ANNALISA MARCHESE

CICLO DI DOTTORATO XXXV

Sommario	
Introduzione	6
Parte generale	9
Stato dell'arte	10
L'olivo.....	10
Diffusione.....	10
Morfologia della specie.....	10
Rilevanza economica	11
Stress biotico e meccanismi di difesa delle piante	12
Patogeni invasivi dell'olivo e regolamentazione europea.....	17
<i>Spilocaea oleagina</i> : tra le malattie fungine che più colpiscono l'olivo	22
Diagnosi e controllo di <i>Spilocaea oleagina</i>	24
Tecniche diagnostiche.....	26
Loop mediated isothermal Amplification – LAMP	28
Rilevazione e interpretazione dei risultati LAMP.....	30
I vantaggi della tecnologia LAMP	31
Trascrittomica e applicazioni	33
Sequenziamento dell'RNA o RNA- seq	33
Controllo di qualità della preparazione dell'RNA (RIN)	35
Creazione della libreria	37
Sequenziamento	37
Profondità e copertura del sequenziamento	38
Disegno sperimentale di esperimenti in RNA-seq	38
Lecture di sequenza grezza dei dati	39
Controllo di qualità dei dati di sequenziamento grezzi.....	40
La mappatura.....	41
Genoma di riferimento e annotazione	41
Allineamento delle lecture	41
Analisi dell'espressione genica differenziale (DGE)	42
Heatmap (Mappe di calore).....	43
Lettura dei conteggi di singoli geni.....	44
Meccanismi di resistenza ai patogeni in olivo e metodi di rilevazione	44
Scopo della tesi	47
Parte Sperimentale	48

Materiali e metodi	49
Scelta del materiale vegetale	49
Determinazione dei polifenoli totali su genotipi resistenti e suscettibili	50
Valutazione della sintomatologia da <i>Spilocaea oleagina</i>	50
Estrazione dell'RNA totale e trascrizione inversa del cDNA per Real Time.....	51
Disegno di primer di possibili biomarcatori impiegabili per la tecnologia LAMP	51
Saggio RT-LAMP	52
Condizione di reazione RT-LAMP	53
Real-time quantitative RT-PCR	57
Condizione di reazione RT-PCR.....	57
Sequenziamento ad alto rendimento	60
Analisi bioinformatica.....	60
Individuazione di possibili biomarcatori ottenuti dai geni DE dati dalla trascrittomica e validazione mediante RealTime – PCR	61
Risultati	62
Valutazione della sintomatologia da <i>Spilocaea oleagina</i>	62
Polifenoli totali.....	66
RT-PCR quantitativa in tempo reale	69
Esperimenti di trascrittomica per individuare nuovi biomarkers di resilienza/suscettibilità	71
Analisi dei dati di sequenza dell'RNA	71
Analisi RNA- Seq e identificazione dell'espressione genica differenziale in 'Koroneiki ' e 'Nocellara del Belice'.....	72
Geni differenzialmente espressi (DEG) in Koroneiki (stadio sano vs. stadio infetto).....	74
Geni differenzialmente espressi (DEG) in Nocellara del Belice (stadio sano vs. stadio infetto) .	79
Koroneiki T3 vs. Nocellara T3 DEG	82
Individuazione e validazione dei primer disegnati sui DEG candidati a possibili biomarcatori ..	87
Discussione	91
Conclusioni e prospettive future	98
I risultati della presente tesi sono stati pubblicati in 3 lavori:.....	99
Indice delle figure	101
Indice delle tabelle	103
Bibliografia	104
Pubblicazioni scientifiche	127
Atti a Convegno	127

Introduzione

Negli ultimi anni, in Italia come in altri paesi, si è registrato un aumento delle emergenze fitosanitarie in gran parte dovute all'introduzione di sistemi colturali intensivi e all'ingresso involontario di specie patogene provenienti da parti del pianeta con caratteristiche ambientali simili a quelle della zona nuova di diffusione. Inoltre, il cambiamento climatico verificatosi negli ultimi decenni ha causato un incremento sia delle temperature medie annuali, sia della frequenza di eventi estremi, come l'eccesso di piovosità nei mesi invernali e la prolungata aridità nel periodo primaverile-estivo. Nell'insieme di queste condizioni le piante subiscono forti stress fisiologici che ne limitano il vigore vegetativo e lo sviluppo (Franceschini et al., 2008). Questa dinamica degli eventi ha condizionato negativamente sia i settori legati alla realtà forestale e al verde urbano, sia l'economia delle aziende agronomiche, nonché il settore vivaistico. Per queste ragioni, la Comunità Europea in collaborazione a diverse organizzazioni (IUCN - International Union for Conservation of Nature; WCN - Word Conservation Union; EPPO - European Plant Protection Organization) hanno condotto iniziative finalizzate all'individuazione dei patogeni e al monitoraggio di specie di recente o temuta introduzione, con la relativa predisposizione di liste di "Quarantena e misure sanitarie" (Liste EPPO, riconosciute da oltre 50 paesi: lista A1, specie di temuta introduzione; lista A2, specie presenti localmente) che disciplinano l'importazione di materiale vegetale attraverso vie ufficiali e commerci regolamentari (direttiva 2002/89/CE, concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali ed ai prodotti vegetali). Queste forme legislative di controllo sono necessarie per la conoscenza del rischio e per la corretta gestione di un'eventuale emergenza fitosanitaria. Per il rispetto delle norme lo Stato italiano si avvale del Servizio Fitosanitario Nazionale (SFN), che è costituito dal Servizio Fitosanitario Centrale (SFC) operante presso il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, che ha compiti di coordinamento e localmente dai servizi Fitosanitari Regionali (SFR). Il controllo sul territorio è attuato da agenzie regionali (Capretti and Ragazzi, 2009).

Nell'ambito di questa relativamente nuova ma soprattutto dinamica rete di monitoraggio e prevenzione sono stati intrapresi vari studi a livello nazionale e internazionale

riguardanti le specie patogene invasive, focalizzati spesso sulla ricerca di metodologie per mitigare i danni prima che si verifichino fasi di espansione delle malattie. Molto più incisivi risultano invece gli studi sulla messa a punto e l'ottimizzazione di tecniche diagnostiche di prevenzione che hanno lo scopo di individuare le potenziali specie aliene prima che possano propagarsi irreversibilmente in ecosistemi ancora inesplorati. Nell'interazione tra l'ospite e il patogeno, quest'ultimo agisce attraverso meccanismi che favoriscono la propria proliferazione inducendo nella pianta modificazioni che influenzano le attività fisiologiche e i processi metabolici di base, determinando, ad esempio, ridotta capacità di fotosintesi e di crescita, col risultato di ridurre la produzione sia sotto gli aspetti quantitativi che qualitativi. La pianta mette in atto meccanismi di resistenza o di tolleranza ai fattori di stress attivando specifiche vie di trasduzione del segnale, l'espressione di specifici geni e attuando modifiche a livello strutturale. Il sequenziamento di nuova generazione degli acidi nucleici consente l'esplorazione di cambiamenti in cellule o tessuti rispetto ad uno stato alterato. Nell'ultimo decennio le applicazioni di questa tecnica altamente innovativa sono state molteplici. In questa tesi di dottorato il metodo è stato impiegato per investigare l'espressione genica durante la manifestazione del fungo *Spilocaea oleagina* su piante di olivo (*Olea europaea* L.), individuare i meccanismi di difesa e identificare geni e biomarcatori di resistenza che consentano l'individuazione precoce della presenza della malattia. La pianta d'olivo è considerata una specie molto rustica e generalmente resistente alle avversità abiotiche e biotiche. Tuttavia, può essere attaccata da diversi agenti patogeni fungini e batterici che possono causare anche ingenti perdite di produzione. La difesa sanitaria dell'oliveto è un obiettivo importante per l'economia della coltura in quanto gli eventuali danni alle piante deprimono l'attività vegetativa e possono compromettere i frutti, con effetti negativi sulla qualità del prodotto finito e sui costi di produzione. Per le piante che provengono dall'estero la quarantena risulta essere il primo baluardo di prevenzione dall'importazione e la diffusione di malattie ed epidemie di insetti. Tra i principali patogeni dell'olivo si annoverano *Xylella fastidiosa*, le malattie crittogamiche quali l'antracnosi (*Gloeosporium olivae*), la rogna (*Pseudomonas savastanoi*), la cercosporiosi (*Cercospora cladosporioides*) e l'occhio di pavone (*Spilocaea oleaginea*). *Spilocaea oleagina*, in particolare, è temuto per i danni che provoca nell'area mediterranea e in particolare in Sicilia (Mekuria et al., 2001; Obanor et al., 2005a). La malattia può portare infatti a infezioni gravi con una perdita di resa di circa il 20% inoltre, può causare la perdita precoce dei frutti (Azeri, 1993; El-Salam et al., 2019; Graniti, 1993). Le ingenti perdite,

la possibilità di epidemie e la competitività dei mercati mondiali sono tutti fattori che comportano la necessità di avere a disposizione tecniche di diagnostica che risultino rapide e precise. La tecnica diagnostica attualmente più utilizzata per i patogeni vegetali a rilevamento rapido è la reazione a catena della polimerasi (PCR). Attraverso l'uso di specifici biomarcatori, è possibile conoscere i segnali che le piante danno a livello genetico prima che possano essere visibili i segni della malattia. Nella presente tesi vengono discussi i cambiamenti genici in risposta all'attacco di *Spilocaea oleagina* individuati grazie al sequenziamento del trascrittoma e la possibilità di rilevare precocemente lo stress biotico attraverso l'amplificazione di geni e marcatori di stress utilizzando termociclatori portatili per una diagnostica precoce.

Parte generale

Stato dell'arte

L'olivo

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una specie arborea sempreverde tipica del Mediterraneo che si adatta al clima temperato caldo con estati lunghe e secche (Lavee et al., 2007), diffuso in tutti i paesi del bacino del mediterraneo sin da tempi antichissimi. Mitologicamente conosciuto come dono della dea Atena agli ateniesi. La sua storia segue di passo quella dell'uomo come alimento principe della dieta mediterranea, ma anche per l'uso dell'olio come combustibile prima dell'avvento del petrolio.

Diffusione

La specie *Olea europaea* L. è ritenuta originaria dell'antico Iran e il Turkestan da cui probabilmente si è diffusa in 5-6 millenni in tutto il mediterraneo (Fabbri and Pedrazzini, 2001). Circa il 95% della superficie olivetata mondiale si trova nel bacino mediterraneo e nelle zone limitrofe.

Nei Paesi al di fuori del bacino del Mediterraneo (es. Australia e California), l'olivicoltura si è sviluppata solo di recente attraverso l'introduzione di varietà provenienti da altri Paesi, quindi su una base genetica non propria (Sebastiani et al., 2006).

Uno degli aspetti positivi di questa specie è quello di crescere e dare frutto anche in ambienti con scarse disponibilità idriche, sebbene sia dimostrato che esistono diversi vantaggi che l'irrigazione porta in fase produttiva, tra cui l'aumento della produzione di olive e di olio per albero, della pezzatura dei frutti e del rapporto polpa-nocciolo (Berenguer et al., 2006).

Morfologia della specie

Tra le circa 600 specie che compongono la famiglia delle Oleaceae, l'olivo è l'unico i cui frutti sono impiegati per l'alimentazione umana. Botanicamente sono stati identificati

cinquantasei diversi clorotipi nella famiglia delle *Oleaceae*, tra cui *Olea europaea* e altre specie e generi. L'evoluzione del genoma dei cloroplasti, all'interno della sottospecie *Olea europaea*, è probabilmente iniziata dalla subsp. *cuspidata*, che rappresenta probabilmente l'antenato di tutte le altre sottospecie e quindi di tipologie e cultivar selvatiche (Rugini et al., 2010). L'*Olea europaea* subsp. *europaea* è presente in due forme, quella selvatica (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) e quella coltivata (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*); è una specie diploide ($2n = 2x = 46$) e la dimensione del genoma varia tra 2,90 pg/2C e 3,07 pg/2C, con 1C = 1.400-1.500 Mbp (Loureiro et al., 2007).

La chioma di questo albero ha forma generalmente globosa o arrotondata. Questa specie mostra un'elevata adattabilità alle condizioni ambientali e colturali. Possiede foglie di colore grigio-verde (lunga sino a 5,6 cm, larga 1 - 1,5 cm) con bordi che possono essere sia arrotondati che lanceolati ed un breve peduncolo. L'albero è ben adattato alle condizioni ambientali estreme, ma richiede luce ad alta intensità e suolo aerato. Lo sviluppo del frutto inizia con la comparsa di gemme a fiore, seguita dall'impollinazione, fecondazione, sviluppo del frutto e maturazione. Di norma, questo ciclo produttivo inizia ad aprile e si conclude nel mese di novembre, quando i frutti raggiungono il loro peso ottimale e il loro colore varia dal verde al rosso bruno e nero (Ramirez-Tortosa et al., 2006).

Rilevanza economica

L'importanza dell'olivo è di tipo economico, storico, religioso, culturale e paesaggistico. L'olivicoltura svolge un ruolo importante nell'economia di diversi paesi. L'importanza del settore nell'UE è evidente in quanto la superficie olivicola si estende per circa 10 milioni di ettari a livello mondiale. Secondo gli ultimi dati disponibili su FAOSTAT, tra i paesi del Mediterraneo, la Spagna si classifica come primo produttore di olive nel 2020 (2.623.720 ha; 8.137.810 ton), seguita dall'Italia (1.145.520 ha; 2.207.150 ton), Marocco (1.068.895 ha; 1.409.266 ton), Grecia (906.020 ha; 2.790.442 tonnellate) e Turchia (887.077 ha; 1.316.626 tonnellate) (FAOSTAT 2021). Secondo i dati ISTAT, tra le regioni meridionali italiane, la Sicilia (161.661 ha; 255.798 tonnellate) ha un ruolo significativo nella produzione, industria ed esportazione di olive e olio d'oliva nel 2021, essendo il terzo produttore dopo la Puglia (379.960 ha; 708.400 ton) e Calabria (184.410 ha; 680.275 ton). Nell'ultimo decennio, purtroppo, la produzione olivicola ha subito un

enorme calo a causa dell'insorgere di agenti biotici che hanno minato in modo significativo l'economia mediterranea legata all'olivicoltura e all'industria olearia; un esempio drammatico è l'epidemia di *Xylella fastidiosa* nel 2013, che ha decimato gli ulivi in Puglia e ha creato enormi perdite per l'economia olivicola locale e per la produzione di olio, ponendo sfide critiche per la sua gestione, nonché cambiamenti drammatici nel paesaggio (Martinelli et al., 2019; Saponari et al., 2017).

Stress biotico e meccanismi di difesa delle piante

Lo stress nelle piante ha un grave effetto negativo sulla crescita, lo sviluppo e la riproduzione dell'organismo (Arnholdt-Schmitt, 2004). A seconda della loro tipologia, gli stress possono essere suddivisi in interni, come la produzione di radicali liberi durante il metabolismo cellulare, ed esterni, i quali possono essere ulteriormente suddivisi in due classi in base alla loro natura abiotica o biotica (Madlung and Comai, 2004); per far fronte agli stress, le piante hanno sviluppato un robusto sistema di meccanismi di difesa che possono essere specifici o ad ampio spettro. Le risposte delle piante allo stress biotico sono molto complesse e comportano la regolazione e l'espressione di un'ampia gamma di geni e cambiamenti correlati alla resistenza a livello fisiologico, biochimico e molecolare che culminano nella tolleranza e/o resistenza ai fattori di stress (Ahammed et al., 2020; Boyko and Kovalchuk, 2008).

Nelle piante sono numerosi i parassiti e gli agenti patogeni che provocano stadi di infezione e di stress biotico. I parassiti possono essere insetti, batteri, virus, funghi e nematodi. Tra questi, i parassiti fungini possono essere necrotrofi (uccidono la cellula ospite mediante la secrezione di tossine) o biotrofici (si nutrono di cellule ospiti viventi). I danni che producono alla pianta includono avvizzimenti vascolari, macchie fogliari e cancri nelle piante (Jadalla et al., 2018; Lazebnik et al., 2014). I nematodi si nutrono di parti di piante e causano principalmente malattie trasmesse dal suolo che portano a carenza di nutrienti, crescita stentata e avvizzimento (Ali et al., 2015; Bernard et al., 2017; El-Garhy et al., 2020). Allo stesso modo, i virus sono anche capaci di danni locali e sistemici con conseguenti clorosi e arresto della crescita (Pallas and García, 2011). Al contrario, gli acari e gli insetti danneggiano le piante nutrendosi di queste o deponendo uova. Spesso gli insetti agiscono come vettori di virus e batteri (Iqbal et al., 2021). Nei millenni le piante hanno sviluppato un elaborato 'sistema immunitario' per combattere gli agenti patogeni (Saijo and Loo, 2020; Taiz and Zeiger, 2006). Le piante posseggono

due tipi principali di barriere nei confronti dei patogeni: difese costitutive di tipo passivo e difese inducibili di tipo attivo. La prima linea di difesa è quella passiva e include barriere fisiche come cuticole, cera e tricomi per allontanare agenti patogeni e insetti. Inoltre, le piante sono anche in grado di produrre composti chimici per difendersi (Taiz and Zeiger, 2006). La seconda linea di difesa è costituita dalla massiccia attivazione di meccanismi di difesa a livello locale e sistemico. In particolare, la pianta mette in atto una risposta all'infezione, prima a livello locale e poi sistemico, mediante i seguenti meccanismi principali (Fig.1):

- generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS),
- risposta ipersensibile (HR) attraverso la morte programmata (apoptosi),
- attivazione di enzimi di difesa precostituiti,
- produzione di metaboliti secondari antimicrobici,
- espressione di geni correlati alla patogenesi (pathogenesis related, PR) e alla difesa,
- rafforzamento delle pareti cellulari attraverso la sintesi di callosio e lignina,
- produzione di molecole di segnale che inducono una risposta sistemica.

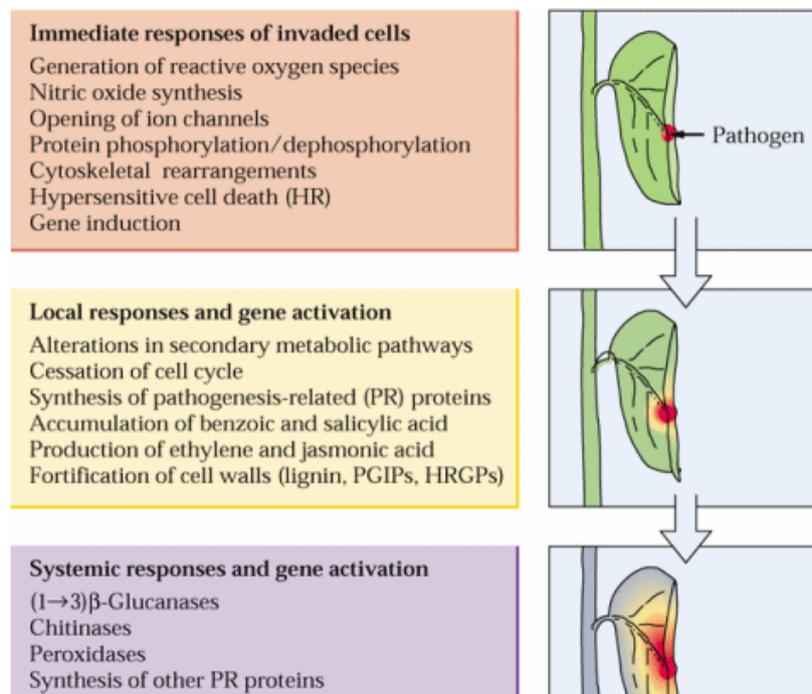


Figura 1.. Tratto da: Buchanan, B.B., Grissem, W. e Jones, R. eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p. 1104

In particolare, la difesa contro gli agenti biotici avviene mediante due modelli per il riconoscimento del patogeno (Dangl and McDowell, 2006).

Il primo livello di riconoscimento dei patogeni comprende i recettori per il riconoscimento dei pattern (PRR), che identificano i pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP). Questo tipo di immunità delle piante è classificata come immunità innescata da PAMP (Monaghan and Zipfel, 2012). I parassiti fitofagi rispondono identificando modelli molecolari associati agli erbivori (HAMP) o effettori erbivori PRR (Santamaria *et al.*, 2013). Il secondo livello di riconoscimento del patogeno usa le proteine di resistenza delle piante (R) che identificano recettori specifici da un patogeno (proteine AVR) (Abdul Malik *et al.*, 2020; Dangl and McDowell, 2006).

Le proteine codificate dalla maggior parte dei geni R hanno un dominio specifico con un sito di legame nucleotidico (NBS) conservativo. Nel secondo livello di riconoscimento è importante anche i geni che codificano le ripetizioni ricche di leucina (LRR). I patogeni vengono riconosciuti direttamente (associazione fisica) o indirettamente (associazione di una proteina accessoria) dai recettori NB-LRR (Dodds and Rathjen, 2010). A volte, la risposta delle piante mediata dai geni R nei confronti del patogeno invasore provoca un grado più elevato di difesa, definito come resistenza sistemica acquisita (SAR). La SAR genera una resistenza sistemica dell'intera pianta contro un ampio spettro di agenti patogeni (Fu and Dong, 2013). La SAR è una sorta d'immunità, simile negli effetti a quella degli animali, dovuta all'attivazione di meccanismi di protezione dormienti in seguito a un iniziale evento infettivo di bassa entità, si manifesta quando la pianta viene a contatto con lo stesso patogeno ed è associata in particolar modo con lo sviluppo della risposta ipersensibile (Balint-Kurti, 2019). Si verifica, quindi, una forma di "immunizzazione" (Fig. 2). L'attivazione di questa risposta è caratterizzata dall'accumulo locale e sistemico di acido salicilico (SA) e dall'induzione di specifici geni PR con attività antimicrobica (Fig. 2), che si correlano con una resistenza sistemica ad ampio spettro, particolarmente utile nel lungo periodo contro infezioni successive da parte di patogeni biotrofi ed emibiotrofi (Mastouri *et al.*, 2012; Van der Ent *et al.*, 2009).

La via di segnalazione di difesa mediata da JA/Et (acido jasmonico/etilene) è in genere associata alla protezione contro patogeni necrotrofi e alla risposta da ferita, efficace contro insetti erbivori (Pieterse *et al.*, 2001). Inoltre, l'attivazione sistemica della via di segnalazione mediata da JA/Et se viene innescata da microrganismi benefici come i PGPR che instaurano una simbiosi a livello radicale, può conferire alla pianta una protezione ad ampio spettro nei confronti di stress biotici attraverso il meccanismo noto

come ISR, che non richiede l'attivazione dei geni PR (Fig. 2) (Mastouri et al., 2012; Pieterse et al., 2001; Van der Ent et al., 2009).

Generalmente, entrambe le categorie di risposte immunitarie delle piante inducono la stessa reazione, ma il meccanismo di immunità attivata dagli effettori (ETI) è considerato più efficace nei confronti dell'infezione da patogeni (Tao et al., 2003). L'ETI coinvolge le proteine di resistenza delle piante (R) e identificano gli AVR (Dangl and McDowell, 2006; Gouveia et al., 2017; Kaloshian, 2004; Mur et al., 2008; Spoel and Dong, 2012), innescando risposte ipersensibili (HR) e la morte cellulare programmata (PCD) delle cellule infette e di quelle circostanti (Mur et al., 2008).

Sono le prime variazioni nelle concentrazioni di calcio citosolico (Ca^{2+}) i primi eventi di segnalazione e queste si verificano in seguito all'esposizione delle piante ad un generico stress biotico.

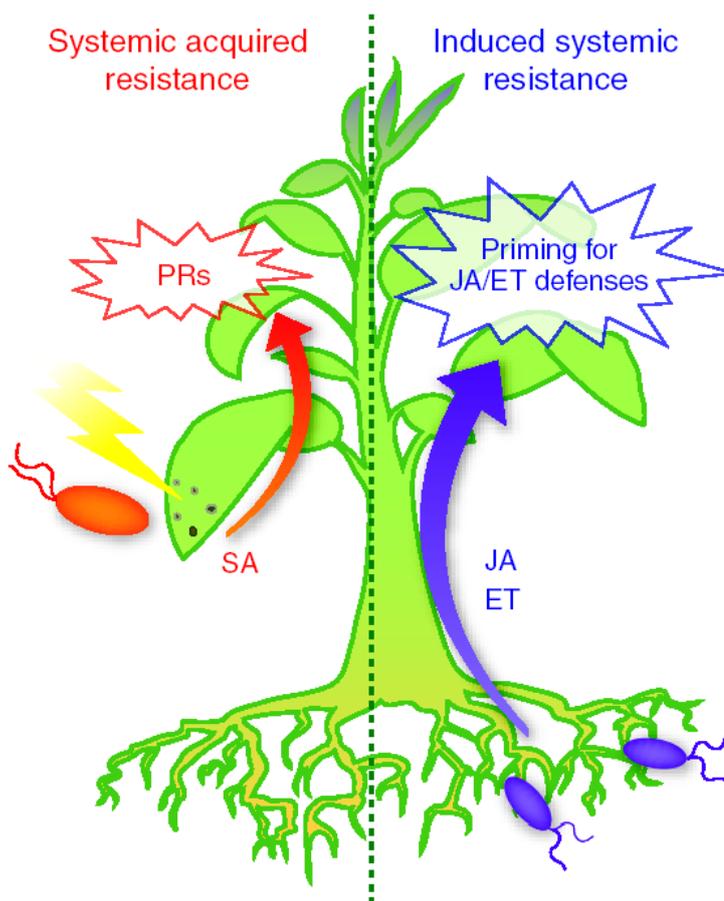


Figura 2. Le principali risposte di resistenza della pianta indotte a livello sistemico. La SAR è attivata in tessuti sani, distanti dal sito d'infezione, ed è mediata da SA (acido salicilico). L'ISR è attivata nell'intera pianta ed è mediata da JA/ET (acido jasmonico/etilene) (tratta da: [The Rhizosphere: Molecular Interactions Between Microorganisms and Roots / SpringerLink](#))

In risposta a patogeni fungini e batterici, i canali permeabili al Ca^{2+} CNGC2, CNGC4, CNGC11 e CNGC12 svolgono ruoli critici nell'ingresso di ioni Ca^{2+} all'interno della

cellula vegetale (Ahn et al., 2007; Yoshioka et al., 2011). Gli altri canali permeabili al Ca^{2+} localizzati nella membrana plasmatica (Fig. 3) regolano l'immunità stomatica delle piante (Thor et al., 2020).

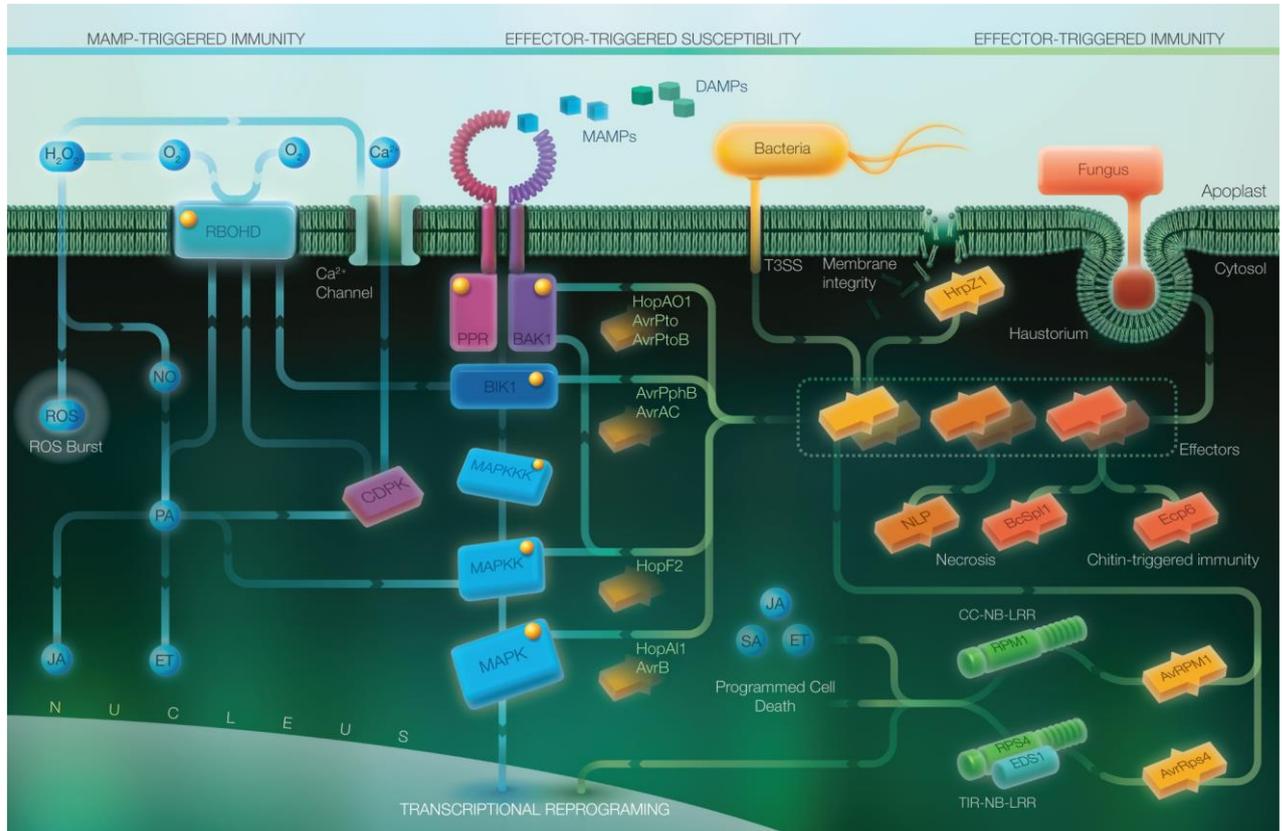


Figura 3. Rappresentazione schematica della percezione dello stress biotico e della segnalazione del Ca^{2+} per la regolazione delle risposte immunitarie delle piante; tratta da: 'Alhoraibi, H., Bigeard, J., Rayapuram, N., Colcombet, J., & Hirt, H. (2019). Plant immunity: the MTI-ETI model and beyond. *Current issues in molecular biology*, 30(1), 39-5'.

Le altre risposte iniziali all'attacco del patogeno includono la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'attivazione di proteine chinasi (MAPK) (Muthamilarasan and Prasad, 2013). ROS e MAPK si aggiungono ad altri percorsi di segnalazione, compresi percorsi di biosintesi che si avviano grazie a stimoli luminosi (Goldsmith and Bell-Pedersen, 2013). Ad esempio, in piantine di pero infette da ceppi asintomatici di *Erwinia amylovora* è stato dimostrato che l'accumulo di acido salicilico e l'aumento dei geni PR sono anche sotto influenza della luce (Sgamma et al., 2021). Inoltre, l'attacco dei parassiti alle piante attiva le risposte di difesa locali o sistemiche che coinvolgono le vie di segnalazione degli oligogalatturonoidi (OGA), dell'acido jasmonico (JA) e del perossido di idrogeno (H_2O_2) (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Le piante sono anche in grado di produrre composti volatili che fungono da repellente per i parassiti. Questi

composti fanno parte delle vie di segnalazione della lipossigenasi (LOX) e dei terpenoidi (Pichersky, 2023). Un altro fondamentale meccanismo di difesa a valle delle piante include la generazione di proteine difensive e proteine di stress universali. Tra queste proteine sono compresi: inibitori proteici, lectine, chitinasi, inibitori dell' α -amilasi e polifenolossidasi (Balint-Kurti, 2019; Fürstenberg-Hägg et al., 2013). I geni correlati alla patogenesi si traducono in proteine che sono indotte nelle piante solo in condizioni patologiche o simili (condizioni di origine non patogena) (Jain e Khurana, 2018). Inoltre, sono considerati una componente importante della risposta immunitaria innata delle piante e sono implicati nelle risposte ipersensibili (HR) e sistemiche (SAR) (Jain and Khurana, 2018). Le proteine correlate alla patogenesi vengono raggruppate in 17 famiglie, a seconda delle loro proprietà biochimiche e molecolari (van Loon et al., 2006).

Un aspetto importante associato alle proteine PR è la loro reattività simultanea allo stress sia biotico che abiotico (Ali et al., 2018). Le vie biosintetiche SA, JA e ET sono attivate in risposta ad agenti necrotrofici e alla masticazione da parte dei parassiti (Bari and Jones, 2009; De Vleeschauwer et al., 2014). SA stimola il percorso SAR promuovendo l'espressione di geni PR, che a loro volta rendono resistenti contro un'ampia gamma di agenti patogeni (Grant and Lamb, 2006; Jadalla et al., 2018). Tra tutti i fitormoni, JA è fondamentale per l'attivazione del sistema di difesa delle piante e dell'interazione con altre vie fitoormonali per stimolare le difese immunitarie della pianta (Yang et al., 2019). Le vie biosintetiche di difesa mediate da SA, JA e ET tendono a innescarsi contemporaneamente (Glazebrook, 2005; Ku et al., 2018). Inoltre, anche altri ormoni quali ABA, auxina, brassinosteroidi (BR), citochinina (CK), acido gibberellinico (GA) e ormoni peptidici hanno un ruolo vitale nella regolazione delle risposte immunitarie delle piante (Ali et al., 2018; Bari and Jones, 2009; Ku et al., 2018; Zhang et al., 2010).

Patogeni invasivi dell'olivo e regolamentazione europea

La diffusione dei patogeni nelle piante spesso compromette l'aspetto quali-quantativo dei prodotti, oltre che, in molte occasioni, la vita della pianta stessa.

A livello legislativo, per quanto riguarda l'olivo, lo standard si è notevolmente innalzato con l'emanazione da parte dell'Unione Europea di alcune direttive relative alla commercializzazione dei materiali di propagazione di cui vengono indicati gli standard sanitari e qualitativi minimi che le piante devono avere per essere commercializzate. La

normativa vigente riguardante alberi da frutto, compreso l'olivo prevede che le piante siano etichettate come 'Coformitas Agraria Communitas'. Questo marchio di garanzia prevede che i materiali di propagazione siano controllati secondo gli standard EPPO dal punto di vista fitosanitario. Oltre a questa esiste una certificazione nazionale su base volontaria che garantisce qualità igienico sanitarie e genetiche elevate. Fra i patogeni che sono in grado di recargli danni si annoverano due specie batteriche (*P. savastanoi*, *Xylella fastidiosa*) e 4 specie fungine (*S. oleagina*, *V. dahliae*, *C. gloeosporioides*, *M. cladosporioides*). Queste possono assumere incidenze e diffusioni tali da compromettere l'assetto vegetativo, la produzione e la vitalità dell'olivo stesso. Si segnalano, inoltre, altre malattie come marciumi radicale, carie e fumaggine dovute all'azione multipla di agenti fungini appartenenti a generi diversi. Per quanto riguarda i virus, invece, sebbene isolati in cospicuo numero, non sono ancora del tutto definiti i danni che possono provocare alla produzione (Iannotta et al., 2012). Negli ultimi anni nel bacino del Mediterraneo l'agente patogeno *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ha letteralmente flagellato gli olivi pugliesi e ha apportato notevoli danni al settore olivicolo. *Xylella fastidiosa* (Fig. 4) è un batterio Gram-negativo non flagellato, aerobico, non sporigeno, che si insedia e si moltiplica esclusivamente nei tessuti xilematici attivi (alburno e xilema secondario attivo) delle piante, causando l'ostruzione dello xilema da parte degli aggregati batterici (Purcell and Hopkins, 1996), provocando nell'olivo il disseccamento rapido (CoDiRO). Il batterio, oltre all'olivo, ha diverse specie ospite, tra cui la vite, il pesco, il mandorlo, gli agrumi e il caffè (Carlucci et al., 2013). La diffusione di *Xylella* può avvenire con il materiale di propagazione, ma in natura si trasmette principalmente tramite insetti xilematici, come *Philaenus spumarius* L. (sputacchina) (Cariddi et al., 2014; Martelli, 2016; Purcell and Hopkins, 1996). I sintomi tipici e più frequenti sono la brusatura fogliare, con disseccamenti nella parte apicale e/o marginale della lamina, disseccamenti a carico della chioma inizialmente di rami isolati e poi di intere branche e/o dell'intera pianta e imbrunimenti interni del legno a diversi livelli dei rami più giovani, delle branche e del fusto (Janse and Obradovic, 2010). Il batterio *Xylella fastidiosa* è stato incluso nella lista degli organismi da quarantena dell'Unione europea (allegato I AI della Direttiva del Consiglio 2000/29/CE). Ad oggi, a parte l'olio essenziale di arancia (contenente il principio attivo limonene), nessun prodotto fitosanitario è autorizzato in deroga sull'olivo contro il vettore *Philaenus spumarius* L. e tantomeno contro *Xylella* (Reg. 1107/2009, art. 53).



Figura 4. Gli effetti devastanti di *X. fastidiosa* su un campo della Puglia

L'altro batterio che attacca l'olivo è *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, il responsabile della rogna o tubercolosi, malattia nota e diffusa in tutte le zone di coltivazione dell'olivo. Il batterio prima di invadere l'olivo insieme ad altri microrganismi colonizza la superficie fogliare e in relazione all'entità dell'attacco e all'organo vegetativo colpito provoca danni che assumono una rilevanza economica diversa e quindi non quantificabile: la pianta, seppur indebolita, sopravvive all'aggressione del batterio (Ercolani, 1978) (Fig. 5). La principale fonte di inoculo è rappresentata dalle stesse piante ospiti, i cui organi aerei ospitano il microrganismo (Bertolini et al., 2003). Il patogeno, veicolato dall'acqua, invade l'olivo attraverso soluzioni di continuità causate da vari fattori, tra cui eventi climatici (come freddo e grandine) ed eventi colturali (potatura, raccolta con battitura). Le condizioni climatiche hanno una notevole influenza nella promozione delle infezioni, che le favoriscono in caso di elevata umidità atmosferica, prolungata bagnatura degli organi e temperature intorno ai 20-25°C. Fonte di maggiore diffusione dell'inoculo sono i tubercoli stessi, soprattutto quelli non ancora completamente lignificati, nei quali il batterio vive riproducendosi abbondantemente. Le nuove infezioni si verificano attraverso lesioni o ferite causate da tagli di potatura, danni da gelo o grandine, pratiche colturali e soprattutto durante la raccolta, specialmente se meccanica. In questa situazione, per tenere sotto controllo la malattia, è necessario ricorrere a misure preventive: agronomiche, come l'utilizzo di cultivar meno sensibili e pratiche colturali equilibrate; la disinfezione da adottare subito dopo le operazioni di potatura e in occasione di eventi climatici avversi (freddo e grandine).



Figura 5. Tumori dovuti a *Pseudomonas savastanoi*

Tabella 1. Le principali malattie crittogamiche dell'olivo.

BATTERI	
Rogna	<i>Pseudomonas savastanoi pv.savastanoi (Smith)</i>
<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xylella fastidiosa subsp. pauca</i>
FUNGI	
Occhio di pavone	<i>Spilocaea oleagina (Cast.) Hughes</i>
Verticilliosi	<i>Verticillium dahliae Kleb.</i>
Piombatura	<i>Mycocentrospora cladosporioides (Sacc.) Braun</i>
Lebbra	<i>Colletotrichum gloeosporioides (Penzig)</i>
Marciume dei frutti	<i>Camarosporium dalmatica (Thüm) Zachose Tzav.</i>
Brusca parassitaria	<i>Stictis panizzei DeNot.</i>
Marciume radicale	<i>Gen. Armillariella</i>
	<i>Gen. Rosellinia</i>
Fumaggine	<i>Gen. Capnodium</i>
	<i>Gen. Limacinia</i>
	<i>Gen. Alternaria</i>
Carie del legno	<i>Gen. Fomes</i>
	<i>Gen. Poria</i>
	<i>Gen. Polyporus</i>

Relativamente ai virus, la presenza di infezioni virali sugli olivi è stata ipotizzata già alla fine degli anni Trenta in relazione ad alcuni casi di malformazioni a carico delle foglie, dei rami e dei rami (Barba, 1993). Il tipo di alterazioni che sono state evidenziate erano presenti in misura maggiore sulle foglie, in particolare vi erano alterazioni dimensionali (macrofillia e microfillia),

deformazione del margine fogliare (ondulato, lobato, talvolta quercino, con apice appuntito, aspetto a falce delle foglie) (Martelli, 1999). Tali sindromi sono state più volte segnalate nei decenni successivi, non solo in Italia, ma anche nel resto del mondo, con diverse ipotesi alternative all'eziologia virale o simil-virale (fisiopatie, fitotossicità, attacchi di insetti, acari, ecc.). Ulteriori segnalazioni di ingiallimenti fogliari di origine sconosciuta e ingiallimento perinervale a livello delle foglie erano da attribuire ad ipotesi di origine virale. La maggior parte di questi virus è stata isolata da alberi asintomatici e/o segnalata solo in uno o in un numero molto limitato di alberi. Le malattie virali sufficientemente documentate fino ad oggi sono solo due: Ringspot Latent Virus - SLRSV e Olive Leaf Yellowing associates Virus - OLYaV). Ad oggi, 14 specie virali sono state isolate dall'olivo (Tabella 2), di cui individuate esclusivamente su olivo: Olive Latent Ring Spot Virus (OLRV), Olive Latent Virus 2 (OLV-2), Olive Vein Yellowing associate Virus (OVYaV), Olive Semi-Latent Virus (OSLV), Olive Yellow Spot Associated Virus and Olive Dieback (OYMDaV), Virus associated Olive Leaf Yellowing (OLYaV), Olive Bland Mosaic Virus (OMMV) e Olive Latent Virus 3 (OLV-3).

Tabella 2. I principali virus presenti in olivo.

Virus comunemente trovati in olivo
Virus Ringspot latente dell'oliva (OLRSV)
Olive Latent Virus-2 (OLV-2)
Virus del mosaico delicato dell'oliva (OMMV)
Virus associato all'ingiallimento delle foglie di ulivo (OLYaV)
Virus semi-latente dell'oliva (OSLV)
Virus associato al giallo oliva e al declino (OYMDaV)
Virus associato all'ingiallimento delle vene d'oliva (OVYaV)
Virus latente dell'oliva-1 (OLV-1) Virus comune
Virus del mosaico del cetriolo (CMV)
Cherry Leaf Roll Virus (CLRV)
Strawberry Latent Ringspot Virus (SLRSV)
Tobacco Necrosis Virus (TNV)
Tobacco Mosaic Virus (TMV)
Arabis Mosaic Virus (ArMV)

***Spilocaea oleagina*: tra le malattie fungine che più colpiscono l'olivo**

La malattia fungina più diffusa ed economicamente importante che colpisce l'olivo nelle regioni mediterranee e in tutte le aree di coltivazione è conosciuta come “Occhio di pavone”, che può causare gravi perdite di resa (Scheda et al., 2011). L'agente eziologico è il fungo ascomicete *Venturia oleaginea* (descritto per la prima volta da Castagne nel 1845) (Rossman et al., 2015), di cui l'anamorfo: *Spilocaea oleaginea*, il quale può infettare i tessuti dell'olivo in un ampio intervallo di temperature (da 5 a 25°C). A temperatura ottimale di 20°C, si è scoperto che sono necessarie più di 24 ore di bagnatura fogliare per generare infezioni (Viruega and Trapero, 1997). Una volta penetrato nell'ospite, il patogeno rimane limitato allo strato cuticolare, dove il micelio cresce parallelamente alla superficie della foglia per formare colonie rotonde, piatte e monostratificate (Graniti, 1993; Lanza et al., 2017). Le infezioni, quindi, si verificano principalmente sulle foglie, ma possono essere infettati anche altri organi, inclusi germogli, gambi delle foglie, peduncoli dei frutti, frutti stessi e infiorescenze. Sulle cultivar suscettibili si può verificare una grave defogliazione, con conseguente perdita di vigore della specie, morte dei germogli e riduzione del numero di boccioli fiorali e, di conseguenza, perdite in termini di produzione di frutti (Scheda et al., 2011). La colonizzazione è seguita dalla comparsa dei sintomi tipici e dall'eruzione di conidi formati su brevi conidiofori unicellulari bulbosi. I conidi vengono dispersi principalmente dalla pioggia e talvolta dal vento (Frisullo et al., 1994; Lops et al., 1993; Viruega et al., 2013; Viruega and Trapero, 2000). Inoltre, i conidi vengono diffusi su distanze maggiori dallo psocottero *Ectopsocus briggsi*, che li trasporta sulla superficie del corpo o negli escrementi (De Marzo et al., 1993). La germinazione dei conidi di *S. oleaginea* è ottimale tra 16° e 21°C, ma può avvenire in un ampio intervallo di temperature (3-25°C) a condizione che vi sia acqua libera; i conidi iniziano a germinare dopo 6 ore in condizioni ottimali (Obanor et al., 2008; Scheda et al., 2011). *S. oleaginea* forma appressori e infetta i tessuti dell'olivo attraverso la penetrazione diretta della cuticola (Lanza et al., 2017; Obanor et al., 2008). La durata del periodo di incubazione dipende dalle condizioni ambientali, dall'età delle foglie e dalla suscettibilità varietale e, può variare da un minimo di 10 giorni a diversi mesi. In particolare, quando le infezioni si verificano poco prima di condizioni di freddo (inverno) o di caldo e siccità (estate), lo sviluppo dei sintomi e la sporulazione possono avvenire dopo un lungo periodo di latenza (Viruega et al., 2013).

La durata dei periodi di latenza dipende dalle condizioni ambientali delle varie aree geografiche. Il periodo di latenza, in seguito ad infezioni verificatesi durante la stagione estiva, prevale nella maggior parte delle aree olivicole mediterranee a causa delle tipiche estati calde e secche che impediscono lo sviluppo del patogeno all'interno dei tessuti fogliari. In ogni caso, le infezioni latenti sono estremamente importanti perché rappresentano la principale strategia di svernamento, e la comprensione di questa fase è essenziale per lo sviluppo di strategie di controllo efficaci (Graniti, 1993; Viruega et al., 2013). I sintomi tipici della malattia compaiono sul lato superiore delle foglie e molto meno frequentemente su quello inferiore (Fig.6) (Issa et al., 2019).



Figura 6. Danni dovuti a *S. oleagina*

Mentre, su germogli, piccioli delle foglie, pedicelli e peduncoli dei frutti, frutti stessi e infiorescenze sono rari. I primi sintomi sulla pagina superiore delle foglie sono caratterizzati da macchie circolari di colore verde-bruno (2-10 mm di diametro), poco visibili perché di colore simile a quello delle aree sane circostanti. Successivamente le macchie si sviluppano generalmente in anelli concentrici, di colore verde oliva, grigio, marrone scuro dal centro alla periferia dell'anello. Con l'eruzione dei conidiofori e dei conidi le macchie assumono un aspetto vellutato e nei casi più gravi, possono confluire

in un'unica macchia. Quando anche le drupe vengono attaccate, anche se questa è una condizione più rara, raggrinziscono e si deformano a causa della crescita bloccata dei tessuti infetti (Buonaurio et al., 2023). Attacchi gravi e ricorrenti del fungo provocano un'intensa defogliazione e una scarsa crescita e deperimento dei rami defogliati. L'incidenza della malattia e la conseguente defogliazione è più grave nella parte inferiore della chioma arborea (Issa et al., 2019). La defogliazione provocata dal fungo ha un impatto negativo diretto sulla lunghezza delle infiorescenze, sull'allegagione dei frutti e, di conseguenza, sulla crescita e sulla produttività delle piante (Agosteo and Zappia, 2007; Lanza et al., 2017). In generale, è stata stimata una perdita media di rendimento del 20-30% nelle aree in cui l'occhio di pavone è ricorrente (Scheda et al., 2011).

Diagnosi e controllo di *Spilocaea oleagina*

Quando sugli olivi sono presenti i classici sintomi e segni della malattia, la diagnosi è piuttosto immediata. Le difficoltà sorgono invece nel rilevamento di infezioni latenti asintomatiche (Graniti, 1993; Viruega et al., 2013). Loprieno e Tenerini (1959) svilupparono un metodo semplice basato sull'osservazione di macchie nere rotonde dopo l'immersione delle foglie in una soluzione di idrossido di sodio o di potassio. Questo metodo però non è molto sensibile in quanto rileva la malattia solo se l'agente patogeno è in uno stadio avanzato di colonizzazione. Inoltre, può essere utilizzato solo per l'analisi delle foglie adulte mentre non possono essere analizzate le foglie giovani e gli altri organi dell'olivo. Recentemente, un metodo molecolare basato su qPCR è stato sviluppato e utilizzato per rilevare *S. oleaginea* in foglie di olivo asintomatiche (Scibetta et al., 2020). Gli autori hanno dimostrato che le foglie molto giovani sono sensibili quanto quelle adulte e hanno evidenziato la necessità di trattamenti fungicidi tempestivi poiché le infezioni fogliari potrebbero iniziare prima del previsto. Questo metodo molecolare può essere facilmente implementato per quantificare il DNA patogeno in tutti gli organi dell'olivo, rappresentando un prezioso strumento per indagare importanti aspetti epidemiologici ancora controversi all'interno della comunità scientifica. Uno dei fattori che gioca un ruolo fondamentale nel controllo di questa malattia è proprio il monitoraggio dell'agente patogeno durante le fasi di latenza, ma questo risulta difficile in quanto la diagnosi si basa proprio sulla presenza di sintomi. Un monitoraggio accurato è essenziale per determinare

i tempi delle applicazioni dei fungicidi e il numero di trattamenti e sostanze chimiche appropriate. Il controllo chimico della malattia viene effettuato principalmente con composti di rame a contatto e, in misura minore, con fungicidi citotropici-translaminari (dodina e strobilurine) e sistemici (triazoli) (Obanor et al., 2005b; Roca et al., 2007). I composti del rame, come la miscela bordolese, l'ossicloruro di rame, l'idrossido di rame, l'ossido di rame e il solfato di rame tribasico, svolgono una duplice azione: prevenzione degli attacchi dei patogeni sulle foglie sane e riduzione dell'inoculo per le nuove infezioni (Iannotta et al., 2000; Obanor et al., 2008). Infatti, il rame può penetrare nelle foglie attraverso le ferite provocate dai conidi durante l'infezione ed essendo fitotossico, provoca la caduta prematura delle foglie (Graniti, 1993). Di conseguenza, si verifica una riduzione dell'inoculo disponibile per nuove infezioni (Schena et al., 2011). Poiché l'efficacia del rame è strettamente correlata al ciclo patologico del patogeno (eruzione dei conidi), sarebbe auspicabile l'uso di modelli predittivi per determinare la frequenza e i tempi delle applicazioni delle soluzioni rameiche (Thomidis et al., 2021). Tuttavia, l'uso del modello predittivo è ancora molto limitato e i trattamenti vengono effettuati empiricamente in autunno e/o primavera nella maggior parte dei paesi olivicoli (Schena et al., 2011). Oltre il controllo chimico, risultano efficaci anche alcune pratiche colturali quali gestione del suolo, evitando di far crescere erbe infestanti; l'equilibrata concimazione; l'adeguata potatura della chioma per favorire maggiore areazione e illuminazione, riducendo così l'umidità all'interno della chioma. Un altro fattore che riveste un importante ruolo nel controllo preventivo della malattia occhio di pavone è l'utilizzo di germoplasma resistente. La scelta della cultivar non è tuttavia semplice poiché i numerosi studi condotti in pieno campo per identificare cultivar resistenti hanno spesso prodotto risultati contraddittori. Più volte la stessa cultivar è classificata come resistente in uno studio e suscettibile in un altro (Bernaschina et al., 2020; Ouerghi et al., 2016; Sanei and Razavi, 2011). Queste contraddizioni sono causate principalmente dall'errata identificazione del materiale vegetale e da differenze di comportamento dei cloni della stessa cultivar. Tuttavia, altri fattori come la variabilità nella virulenza dei ceppi di *S. oleaginea* e le diverse condizioni climatiche nelle aree geografiche oggetto di studio possono svolgere un ruolo importante (Agosteo and Zappia, 2007; Bernaschina et al., 2020; Hernández et al., 1998). Nell'ultimo decennio, le indagini molecolari, basate principalmente sull'analisi dei microsatelliti, hanno contribuito a identificare e caratterizzare meglio le cultivar di olivo e dovrebbero facilitare notevolmente la futura selezione delle cultivar resistenti all'occhio di pavone (Gómez-Rodríguez et al., 2021;

Muzzalupo et al., 2014). Le cultivar tradizionalmente conosciute come maggiormente suscettibili sono Nocellara del Belice, Calatina, Pendolino, Moraiolo e Frantoio; e tra le più resistenti si annoverano Leccino e Koroneiki.

Tecniche diagnostiche

Funghi, oomiceti, batteri, fitoplasmi, virus e viroidi patogeni sono agenti di malattie in una vasta gamma di piante ospiti, con importanti perdite di produzione in termini qualitativi e quantitativi. Una diagnosi specifica e precoce degli agenti delle malattie rappresenta uno strumento essenziale per aumentare l'efficienza delle misure preventive e curative. Per realizzare questo obiettivo, sono in corso di sviluppo nuove tecniche diagnostiche molecolari che si affiancano alle tecniche tradizionali basate sull'analisi dei sintomi e della morfologia e possono sostituire quelle molecolari a minore specificità e sensibilità. Recentemente sono state sviluppate varie tecniche molecolari, sierologiche e analitiche per l'identificazione degli agenti causali delle malattie sia in laboratorio sia in campo. I metodi tradizionali di diagnosi delle malattie solitamente iniziano con l'interpretazione visiva dei sintomi dei tessuti malati, proseguono con lo studio delle caratteristiche morfologiche dei patogeni attraverso la loro crescita su specifici terreni di coltura (se coltivabili), oppure attraverso l'osservazione al microscopio ottico ed elettronico (se non coltivabili in vitro). In alcuni casi, i metodi tradizionali rimangono ancora più rapidi, appropriati ed economici (Ward et al., 2004). Tuttavia, quando i risultati della diagnosi richiedono elevata specificità e sensibilità si utilizzano tecniche molecolari basate sul rivelamento di DNA o RNA del patogeno vegetale. I metodi basati sugli acidi nucleici permettono la diagnosi dei patogeni vegetali, in maniera rapida, precoce ed affidabile, con la possibilità di analizzare un elevato numero di campioni. Lo sviluppo di tecniche molecolari capaci di produrre la diagnosi direttamente in campo potrebbe ridurre notevolmente il tempo necessario per prendere decisioni, evitando la trasmissione dei patogeni ad altre piante o l'introduzione in nuove aree geografiche. Inoltre, una riduzione dei tempi decisionali comporta potenzialmente una maggior efficienza delle diagnosi effettuate. In alcuni casi può succedere che i livelli dei patogeni siano bassi e il materiale vegetale risulta asintomatico, per cui la diagnosi con tecniche molto sensibili può aiutare

a ridurre la diffusione del patogeno o ad intervenire tempestivamente. Negli anni '90 sono stati sviluppati numerosi metodi basati sull'uso di anticorpi; tuttavia, questi saggi sono poco utilizzabili in campo, soprattutto per l'utilizzo di reagenti che possono degradarsi durante i saggi di immunoassorbimento dipendenti da enzimi (ELISA). I dispositivi lateral flow (LFD) sono stati sviluppati negli anni 1990 per la determinazione di alcuni virus della patata (Danks and Barker, 2000) mediante l'agglutinazione di una sola banda con una più facile lettura. Alcuni LFD disegnati e commercializzati riuscivano a rilevare la presenza del genere *Phytophthora spp.* in campo, ma erano necessarie ulteriori analisi per identificare le specie. Le tecniche sierologiche non possono essere utilizzate nella diagnosi dei viroidi a causa dell'assenza di involucro proteico (capside). Per superare tutte le problematiche dovute ai saggi basati sull'agglutinazione e ottenere un'elevata sensibilità e specificità, i metodi basati sull'amplificazione del DNA risultano imprescindibili. Inoltre, ricerche recenti tendono a combinare le tecniche sierologiche con quelle molecolari, come nel caso della PCR-ELISA per l'identificazione simultanea di quattro tospovirus (Charoenvilaisiri et al., 2014), e di LFDLAMP per la diagnosi di *Rhizoctonia solani* (Patel et al., 2015). Il DNA array, noto come evoluzione dell'ibridazione molecolare, può essere utilizzato per la caratterizzazione di fitopatogeni già noti. Il DNA array è basato sull'utilizzo di migliaia di sequenze di cDNA (sonde), specifiche per il fitopatogeno di interesse, immobilizzate su un supporto solido, che vengono ibridizzate con il cDNA bersaglio marcato proveniente dalle piante infette. La dimensione necessaria per la reazione di ogni sonda ha un diametro superiore ai 300 µm nel caso dei 'macroarray' o inferiore ai 300 µm nel caso dei 'microarray'. Il microarray e il macroarray sono generalmente utilizzati in studi di espressione genica, possono essere applicati anche nella diagnostica fitopatologica e nell'identificazione di mutazioni puntiformi (Lievens et al., 2005). I DNA array possono essere utilizzati per la diagnosi simultanea di più di un fitopatogeno (Boonham et al., 2014; Marusina, 2017). Il DNA array brevettato come Multiscan® (<http://www.dnamultiscan.com/>), ad esempio, permette la rilevazione simultanea di oltre 100 patogeni vegetali (funghi e batteri). È stata riportata la possibilità di identificare più generi di virus contemporaneamente e la simultanea identificazione di un batterio, un virus ed un viroide in piante di pomodoro infetto, mediante ibridazione molecolare con sonde (Zamora-Macorra et al., 2017; Zhang et al., 2014). La PCR rappresenta un metodo essenziale nella diagnostica molecolare dei patogeni vegetali. La PCR consiste nell'amplificazione enzimatica esponenziale di una regione specifica del genoma innescando la reazione attraverso due brevi sequenze

oligonucleotidiche (primer). La porzione genomica selezionata con i due primer viene amplificata in quantità tali da poter ottenere un amplificato visibile su gel d'agarosio. La PCR tradizionale è esclusivamente qualitativa e permette l'identificazione e la caratterizzazione di fitopatogeni senza necessità del loro isolamento. La PCR quantitativa 'in tempo reale' (qPCR) consente l'identificazione e la quantificazione accurata di patogeni vegetali che non possono essere coltivati o estratti facilmente dal tessuto ospite o sono presenti in bassa qualità. Questa tecnica permette un'elevata efficienza utilizzando sistemi automatizzati su micropiastre che consentono l'analisi di più campioni contemporaneamente. Diverse qPCR sono state sviluppate nella diagnosi singola o multipla dei patogeni vegetali, inclusi quelli economicamente importanti e anche quelli da quarantena come per esempio *Synchytrium endobioticum*, *Xylella fastidiosa*, *Citrus Tristeza Virus*, *Plum Pox Virus*, e *Ca. Phytoplasma vitis* (Boonham et al., 2014; Harper et al., 2010; Hren et al., 2007; Mirmajlessi et al., 2015; Saponari et al., 2008; Schaad and Frederick, 2002; van Gent-Pelzer et al., 2010).

Loop mediated isothermal Amplification – LAMP

Nel 2000 è stata sviluppata la metodica LAMP (Loop mediated isothermal amplification). Questa metodica è, analogamente alla PCR, una reazione di amplificazione del DNA (T. Notomi et al., 2000) altamente sensibile e specifica. La particolarità e il maggior vantaggio della tecnica LAMP stanno nel fatto che la reazione avviene in condizioni isoterme. Un altro grande vantaggio è la rapidità con cui la reazione avviene: con la tecnica LAMP è possibile amplificare quantità veramente piccole di DNA in meno di un'ora. Inoltre, offre tra i suoi vantaggi una sensibilità circa dieci volte maggiore a quella di una classica PCR.

La metodica pone le sue basi sulla sintesi del DNA a spostamento del filamento a ciclo unico che viene eseguita da una DNA polimerasi con un'elevata efficienza. Solitamente, il metodo impiega l'enzima Bst-DNA polimerasi, estratta dal batterio *Geobacillus stearothermofilo* (Niessen, 2007), con attività di *strand displacement* (spostamento del filamento in condizioni isoterme) e 6 primer disegnati in modo peculiare, che riconoscono 8 regioni sul DNA target prescelto: regioni F3, F2c e F1c in direzione 3' e regioni B1c, B2c e B3 in direzione 5'. Quindi un insieme di due primer interni e due

esterni appositamente progettati, in grado di legare sei diverse regioni del DNA bersaglio, sono strettamente necessari per la reazione LAMP (Tsugunori Notomi et al., 2000). Il meccanismo della reazione LAMP è brevemente illustrato in Figura 7. I primer FIP (Forward Inner Primer) e BIP (Backward Inner Primer) sono entrambi costituiti ognuno da due porzioni. Il primer FIP è costituito dalla porzione F2 e il primer BIP è costituito dalla porzione B2. I primer F3 (Forward Outer Primer) e B3 (Backward Outer Primer) sono disegnati sulla base delle regioni F3 e B3. Le due coppie di primer, FIP-BIP e F3-B3, sono indispensabili per avviare l'amplificazione.

La reazione, che viene eseguita in 30 minuti a una temperatura costante di 60 - 65°C, inizia quando parte del primer FIP si attacca alla sequenza target F2c e inizia a replicare. Contemporaneamente il primer esterno F3, più corto del FIP e presente in minore concentrazione, si attacca al sito F3c e inizia il distacco del filamento replicato dal primer FIP. Alla sequenza target (B2c) di questa replica si attacca successivamente parte del BIP che inizia la replicazione. Nel mentre alla sequenza esterna B3c si attacca il primer esterno B3 che distacca il filamento replicato. Questa prima parte della reazione porta a una forma ad anello del DNA replicato. La reazione procede con l'attacco ai lati dei primer FIP e BIP viene subito convertita in una forma simile alla metà della prima sequenza copiata e da qui inizia il secondo stadio della reazione che porta all'amplificazione esponenziale del DNA ottenuto. I prodotti finali della reazione di amplificazione sono un miscuglio di DNA target repliato che può assumere forma di singoli loop ripetuti e 'bracci' di diverse lunghezze e forme con cicli multipli derivanti dall'annealing di ripetizioni invertite delle sequenze target che si trovavano nello stesso filamento (Notomi et al, 2000).

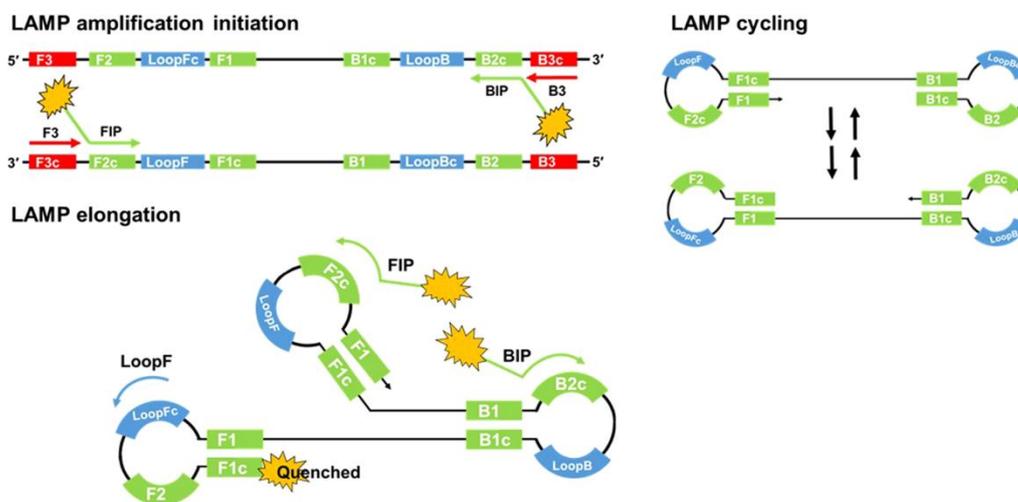


Figura 7. Rappresentazione grafica del processo di amplificazione RT-LAMP attraverso cui si formano i loop di amplificazione.

La reazione viene ulteriormente resa più specifica e incrementata aggiungendo una terza coppia di primer (loop primer) che ibridandosi con gli stem-loop ad eccezione dei loop che erano stati ibridati dai primer interni (Nagamine et al., 2002) riescono a consentire un più rapido avvolgimento del DNA innescando più velocemente la reazione dei cicli successivi. Dal momento che la Bst-DNA polimerasi ha un'attività molto elevata, grandi quantità di DNA ad alto peso molecolare vengono prodotte in breve tempo (Niessen, 2015). La rilevazione dell'acido nucleico target avviene attraverso la misurazione della fluorescenza e i risultati possono essere direttamente osservati in tempo reale su un monitor del termociclatore (Fig. 8).

Rilevazione e interpretazione dei risultati LAMP

Anche se i metodi per il monitoraggio in tempo reale LAMP sono ancora relativamente poco sviluppati rispetto alla PCR (Kubota et al., 2011), sono considerati la migliore opzione per l'applicazione point-of-care, lavorando con tubi chiusi per evitare il rischio di contaminazioni e monitorando i risultati. I test basati su LAMP attualmente sviluppati, specialmente in patologia vegetale (Harper et al., 2010; Tomlinson et al., 2007) possono presentare dei limiti principalmente dovuti all'utilizzo di coloranti intercalanti fluorescenti non specifici (Tanner et al., 2012), che emettono un segnale di fluorescenza rilevabile in seguito al legame con DNA a doppio filamento (dsDNA) (Fischbach et al., 2015) che aumenta con l'accumularsi dei prodotti ma che implica un maggior rischio di falsi positivi quando legano anche DNA a singolo filamento. I primi metodi di rilevamento della fluorescenza erano metodi a tubo aperto: i tubi venivano aperti dopo la reazione e veniva aggiunto il colorante SYBR Green I, determinando un cambiamento di colore visibilmente distinguibile e una forte fluorescenza che poteva essere visualizzata con l'eccitazione UV. Trattandosi di un metodo a provetta aperta, questa tecnica presentava un elevato rischio di contaminazione. Attualmente, la fluorescenza è il metodo più usato per la rilevazione LAMP. Sebbene il monitoraggio in tempo reale della LAMP possa essere utilizzato per quantificare i prodotti di reazione per mezzo della comparazione con la concentrazione di uno standard, questa quantificazione è spesso meno consistente delle corrispondenti reazioni qPCR. Il rilevamento colorimetrico dell'endpoint dei prodotti LAMP è un metodo di lettura indiretto e semplice per determinare le reazioni positive. Non richiede alcuna attrezzatura sofisticata e consente

la visualizzazione ad occhio nudo dei risultati. La LAMP genera sia pirofosfato che protoni man mano che l'amplificazione procede. Ad esempio, la NEB WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix si basa sull'uso di un colorante indicatore di pH e mostra una chiara transizione dal rosso al giallo per reazioni positive entro 30 minuti riducendo i tempi rispetto ad altri metodi di rilevamento analoghi. I campioni che si amplificano più rapidamente spesso raggiungono la saturazione della fluorescenza con conseguenti forti segnali colorimetrici finali, mentre i campioni che si amplificano successivamente producono misurazioni più deboli.



Figura 8. Esempio di termociclatore portatile capace di eseguire analisi PCR-RT e LAMP consentendo l'applicazione di tecniche diagnostiche che prevedono l'uso di biomarcatori.

I vantaggi della tecnologia LAMP

Negli ultimi 10 anni, la LAMP è stata ampiamente utilizzata in laboratorio per rilevare agenti patogeni di importanza medica e veterinaria, malattie parassitarie delle piante, prodotti geneticamente modificati. Le apparecchiature che sfruttano il metodo LAMP hanno tra i loro vantaggi la possibilità di eliminare la fase di estrazione degli acidi nucleici in laboratorio, evitando così contaminazioni e perdita di quantità di estratto (Kaneko et al., 2007). Un altro vantaggio della

tecnologia ready-to-use è la facilità di applicazioni senza la richiesta di personale altamente specializzato. Uno dei principali svantaggi alla praticità della metodica LAMP in condizioni di campo invece è la necessità di corrente elettrica per eseguire i test e di mantenere refrigerati i reagenti.

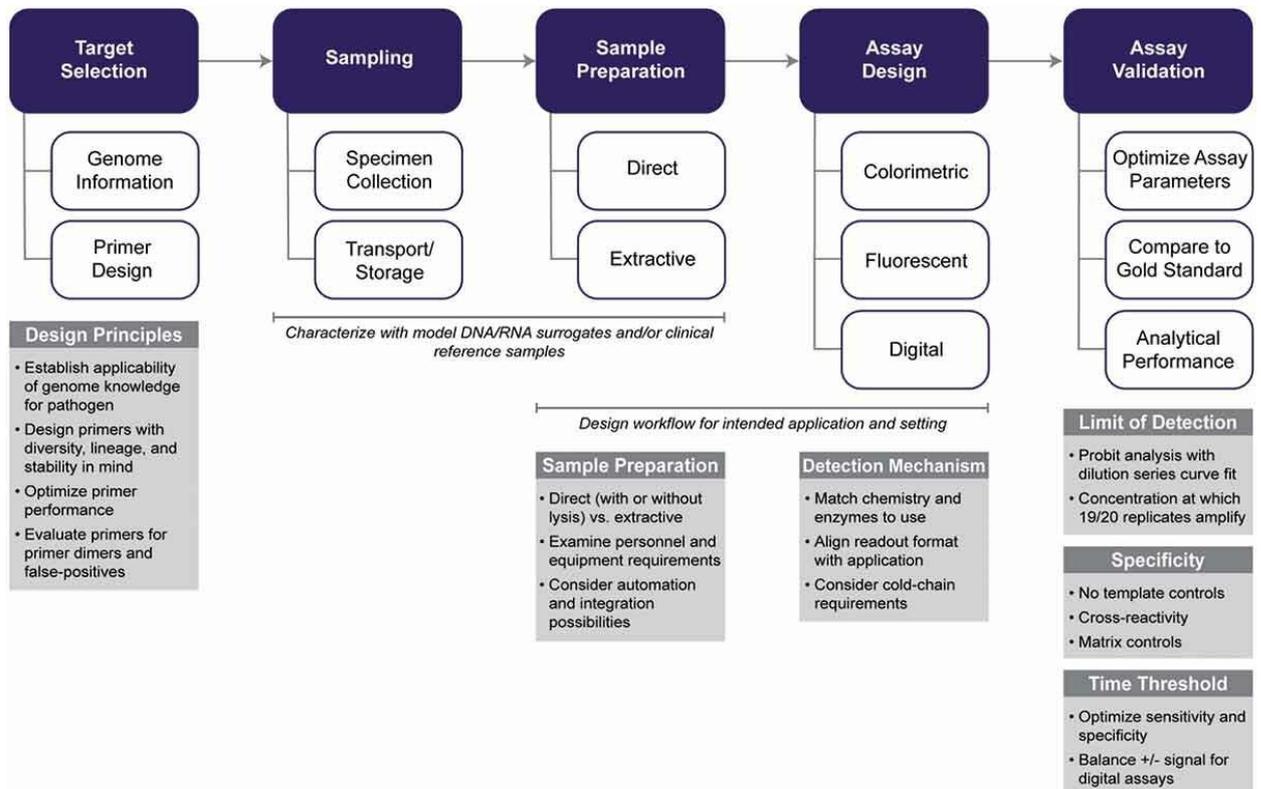


Figura 9. Sviluppo e validazione del saggio LAMP.

Trascrittomiche e applicazioni

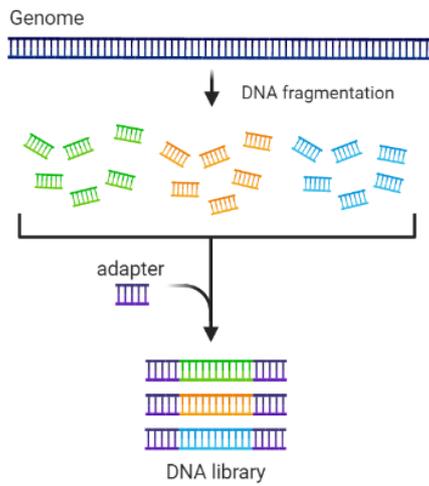
Sequenziamento dell'RNA o RNA- seq

Per poter individuare quali siano i geni differenzialmente espressi e implicati nel sistema di difesa da stress è necessario condurre esperimenti di trascrittomiche (Fig. 10), o RNA-sequencing (spesso indicato con la semplice abbreviazione RNA-seq) (Tarazona et al., 2011). In genere questa metodica di sequenziamento richiede la retrotrascrizione di RNA in cDNA (DNA complementare) prima di procedere con la preparazione delle librerie, salvo alcune eccezioni che prevedono la possibilità di sequenziare direttamente molecole di RNA. Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi di trascrittomiche finalizzati all'individuazione di geni differenzialmente espressi dovuti alle principali malattie dell'olivo (Benitez et al., 2005; Sadler et al., 2021; Azevedo-Nogueira et al., 2020; Luvisi et al., 2017) e putativi geni di resistenza, che sono anche depositati in genebank. Questi lavori sono stati condotti su un numero di cultivar molto ridotto trascurando il ruolo fondamentale che ha la vastissima biodiversità che esiste nella specie *O. europaea*.

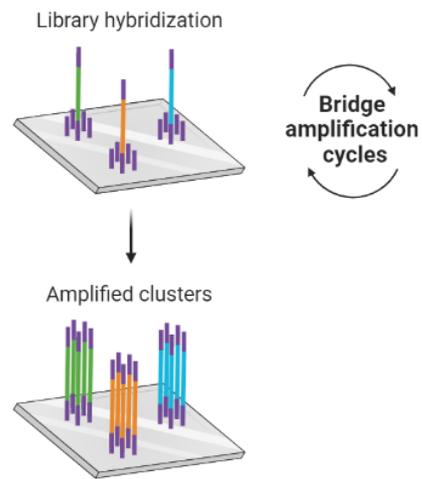
Per quanto questa tecnica potenzialmente possa consentire di analizzare tutte le diverse classi di molecole di RNA, in realtà il più delle volte essa è focalizzata sugli RNA messaggeri oppure sugli small RNA (miRNA). Essa può essere impiegata anche per studiare altri aspetti più propriamente strutturali (ad esempio lo splicing alternativo). Negli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi metodi statistici e strumenti bioinformatici associati a tale analisi (Lambert et al., 2020).

L'obiettivo del sequenziamento dell'RNA è identificare i geni espressi in un tessuto in un dato momento. In effetti, è stato dimostrato che RNA- seq rileva anche trascrizioni scarsamente espresse tuttavia talvolta ha come limite la presenza di falsi positivi (Nookaew et al., 2012). Inoltre, RNA- seq può, in linea di principio, essere utilizzato non solo per la quantificazione delle differenze di espressione tra condizioni distinte, ma offre anche la possibilità di rilevare e quantificare trascritti non codificanti proteici, nuovi trascritti e siti di interazioni proteina-RNA.

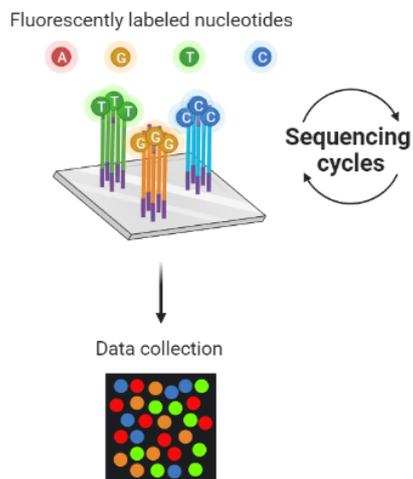
1 Library preparation



2 Library bridge amplification



3 Library sequencing



4 Alignment and data analysis

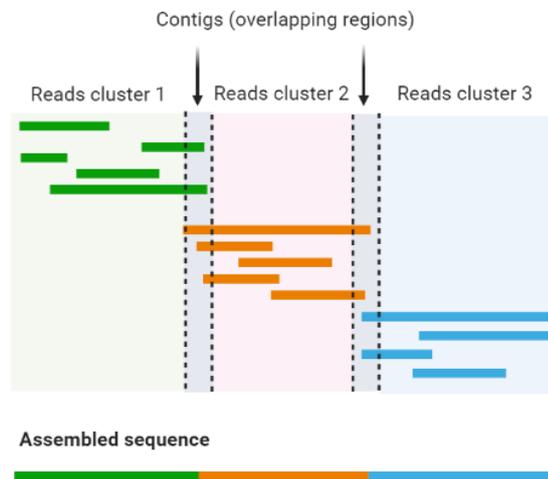


Figura 10. Schematizzazione di un esperimento tipodi trascrittomico.

Controllo di qualità della preparazione dell'RNA (RIN)

Tra gli acidi nucleici, l'RNA è molto più suscettibile alla degradazione rispetto al DNA e la qualità delle molecole di RNA estratte ha un forte impatto sui risultati degli esperimenti in RNA-seq. Tradizionalmente, l'integrità dell'RNA viene valutata tramite elettroforesi su gel mediante ispezione visiva delle bande di RNA ribosomiale. Si dovrebbe produrre una banda unica di RNA totale eucariotico intatto che ingloba le bande di rRNA 28S e 18S. La banda dell'rRNA 28S è circa due volte più intensa dell'rRNA 18S banda. Quando l'RNA si degrada, questo rapporto di 2:1 dell'RNA di alta qualità diminuisce e l'RNA a basso peso molecolare inizia ad accumularsi (Fig. 11) (Farrell Jr, 2009).

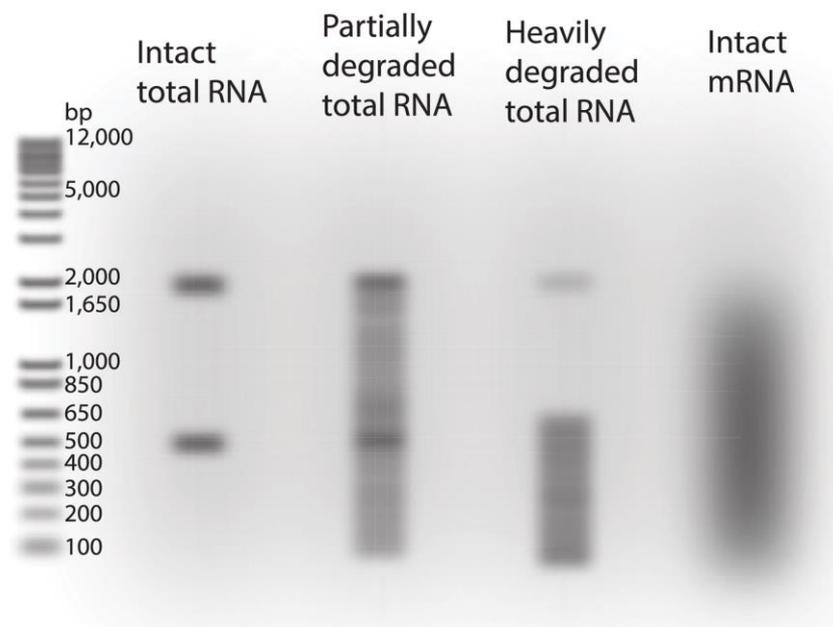


Figura 11. Elettroforesi che mostra il progressivo danneggiamento dell'RNA

L'azienda Agilent ha sviluppato un software che sfrutta un algoritmo che consente il calcolo di un RNA Integrity Number (RIN) da una rappresentazione digitale della distribuzione dimensionale delle molecole di RNA (che può essere ottenuta da un

Bioanalyzer Agilent) (Johnson et al., 2012). Il numero RIN è un sistema di numerazione che va da 1 a 10, dove 1 è il più degradato e 10 il più intatto (Fig. 12). Questo approccio facilita l'interpretazione e la riproducibilità delle valutazioni della qualità dell'RNA e fornisce un mezzo attraverso il quale i campioni possono essere confrontati in modo standardizzato.

Ad esempio, per la preparazione di una libreria 'shotgun' (derivante da una frammentazione casuale del RNA) RNA-seq è auspicabile un RIN ≥ 7 . Per librerie 3'tag è accettabile un livello di integrità leggermente inferiore. Questa metrica va anche abbinata ad un'analisi spettrofotometrica per valutare la presenza di contaminazioni.

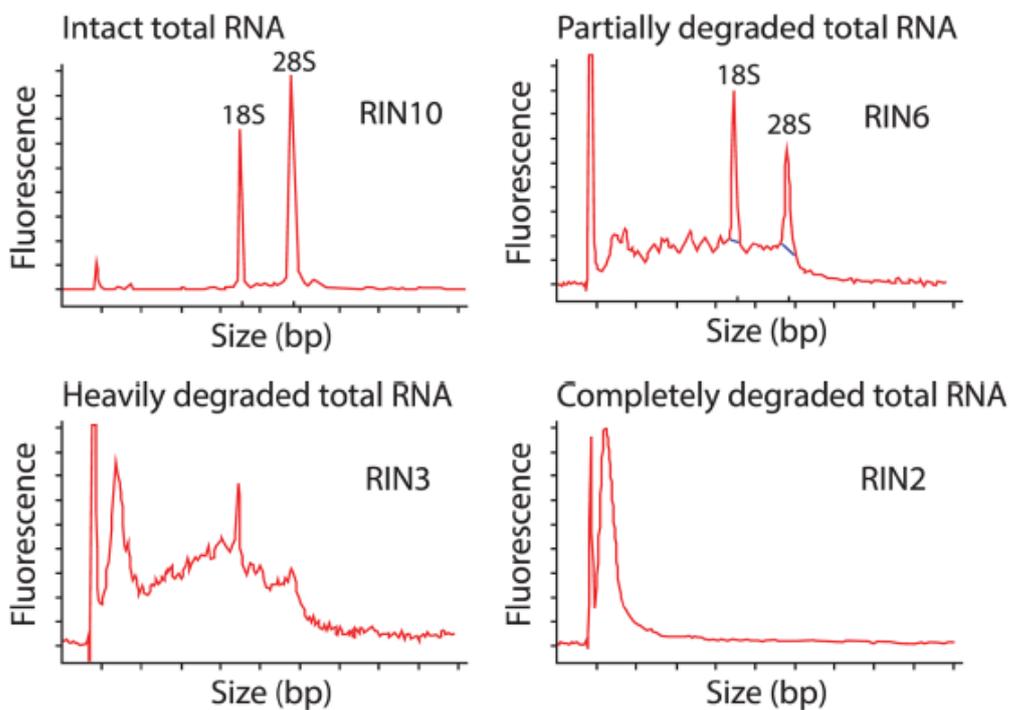


Figura 12. Il numero di RIN, algoritmo sviluppato da Illumina, mostra la qualità dell'RNA estratto.

Creazione della libreria

In termini di sequenziamento ad alto rendimento, una libreria è una raccolta (preferibilmente casuale) di cDNA, ottenuti dalla retrotrascrizione di mRNA, sottoposti a frammentazione (fisica, enzimatica o chimica del DNA). La preparazione della libreria per i protocolli Illumina mira a generare frammenti di cDNA tra 150 e 300 bp, che vengono ibridati su un vetrino con camere microfluidiche. Di questi frammenti, verranno effettivamente sequenziate solo le estremità (da 50 a 150 bp) (Bronner et al., 2013).

Una classica libreria 'shotgun' dovrebbe generare reads (read = corta sequenza di DNA di sintesi che viene prodotta durante la reazione di sequenziamento) distribuite in modo piuttosto uniforme lungo l'intera lunghezza del trascritto (Kumar et al., 2012).

Sequenziamento

Dopo l'ibridazione dei frammenti di DNA mediante adattatori, ogni frammento viene amplificato in modo massiccio e clonale, formando gruppi di DNA a doppio filamento. Questo passaggio è necessario per garantire che il segnale di sequenziamento sia sufficientemente forte da essere rilevato in modo inequivocabile per ciascuna base di ciascun frammento (Chatterjee et al., 2018; Wolf, 2013).

Il sequenziamento delle estremità del frammento si basa su dNTP marcati con fluoroforo con elementi terminatori reversibili che verranno incorporati ed eccitati da un laser uno alla volta e quindi consentiranno l'identificazione ottica di singole basi. Il sequenziamento può essere fatto a partire da una sola estremità del frammento (sequenziamento con single-end reads) o partendo da entrambe le estremità e proseguendo in direzioni opposte (sequenziamento con paired-end reads). Un approccio Illumina paired-end è fondamentale per ottenere un assemblaggio di un trascrittoma *de novo* o per studiare eventi di splicing alternativo (Quail et al., 2008; Rapaport et al., 2013).

Profondità e copertura del sequenziamento

Tecnicamente, la copertura (dall'inglese 'coverage') si riferisce al numero di letture sequenziate in relazione alla dimensione del genoma, ovvero è una stima di quante volte ciascuna base del genoma viene sequenziata. Per gli esperimenti basati sul sequenziamento del genoma, viene comunemente citata l'equazione di Lander-Waterman in quanto descrive la relazione tra la copertura, il numero di letture sequenziate e la dimensione del genoma:

$$\text{coverage} = \frac{\text{read length} * \text{number of reads}}{\text{haploid genome length}}$$

Per identificare gli errori di sequenziamento (ed eventualmente distinguerli dalle varianti genomiche), ogni base dovrebbe essere coperta più di una volta. Il valore di copertura sarà sempre una stima poiché il genoma di solito non è coperto in modo uniforme (Wendl and Barbazuk, 2005). Per RNA-seq, la stima della copertura ha un valore pratico piuttosto scarso poiché la dimensione del trascrittoma non è nota con la stessa precisione della dimensione del genoma e, cosa più importante, la copertura per base varierà drasticamente tra i diversi trascritti a seconda della loro espressione genica. Pertanto, il numero di letture di RNA richieste è determinato dalle specie di interesse.

Disegno sperimentale di esperimenti in RNA-seq

La maggior parte degli esperimenti di RNA-seq mira a identificare i geni la cui espressione varia tra due o più impostazioni sperimentali. Ciò significa che vengono prese in considerazione le variazioni in termini di espressione del singolo gene quando si confrontano due (o più) condizioni ambientali diverse.

Per distinguere i cambiamenti di trascrizione causati dalla condizione studiata è importante eseguire esperimenti di RNA-seq con un numero sufficiente di repliche. Idealmente, dovrebbero esserci abbastanza repliche per catturare l'ampiezza della variabilità e per identificare eventuali artefatti. In termini pratici, questo di solito si traduce in un numero di repliche che consente di identificare l'eventuale presenza di

campioni anomali e di essere in grado di rimuoverli senza perdere troppe informazioni sulla variazione di fondo tra trascrizioni dello stesso tipo di campione.

Lecture di sequenza grezza dei dati

La maggior parte delle riviste richiede che tutti i dati di sequenziamento siano depositati in un database accessibile al pubblico. Il Sequence Read Archive (SRA) è il principale archivio di sequenze di acidi nucleici (Kodama *et al.*, 2011) che attualmente conserva più di 25.000 terabasi. Vengono fatte tre copie degli SRA che sono mantenute rispettivamente dall'NCBI, dall'Istituto europeo di bioinformatica e dalla banca dati del DNA del Giappone (Fig. 13). I diversi siti mirror dell'SRA offrono modi diversi per sfogliare e scaricare i dati. NCBI/GenBank, ad esempio, in genere consente il download solo del formato compresso (SRA). ENA, invece, offre un file di testo che contiene i collegamenti diretti a diversi tipi di formati di dati grezzi, che possono poi essere scaricati con strumenti a riga di comando standard tramite FTP o Aspera (O'Sullivan, 2018).

International Nucleotide Sequence Database Collaboration

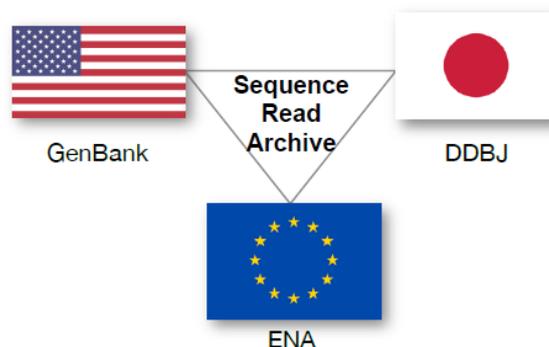


Figura 13. Banche dei dati bioinformatici collegate tra loro in diversi paesi

Controllo di qualità dei dati di sequenziamento grezzi

I controlli di qualità devono essere effettuati in ogni fase dell'analisi in modo tale da poter prevenire una qualsiasi perdita di dati in tempo utile. Ad esempio, i tassi di errore delle “reads” delle piattaforme NGS sono più elevati di quelli del sequenziamento col metodo Sanger. In quest’ultimo caso, la maggior accuratezza deriva non solo dal grado di avanzamento della chimica, ma anche dal fatto che i picchi dei ferogrammi corrispondono a reazioni di estensione con terminazioni multiple e altamente ridondanti. L’accuratezza per le piattaforme NGS è ottenuta grazie al fatto che il sequenziamento di una data regione di interesse viene ripetuto mediante una procedura massiva e parallela in cui ogni sequenza contribuisce all’intensità di “coverage” (Voelkerding et al., 2009). Un tipico esempio di flusso di lavoro bioinformatico completo è mostrato nella figura 14.

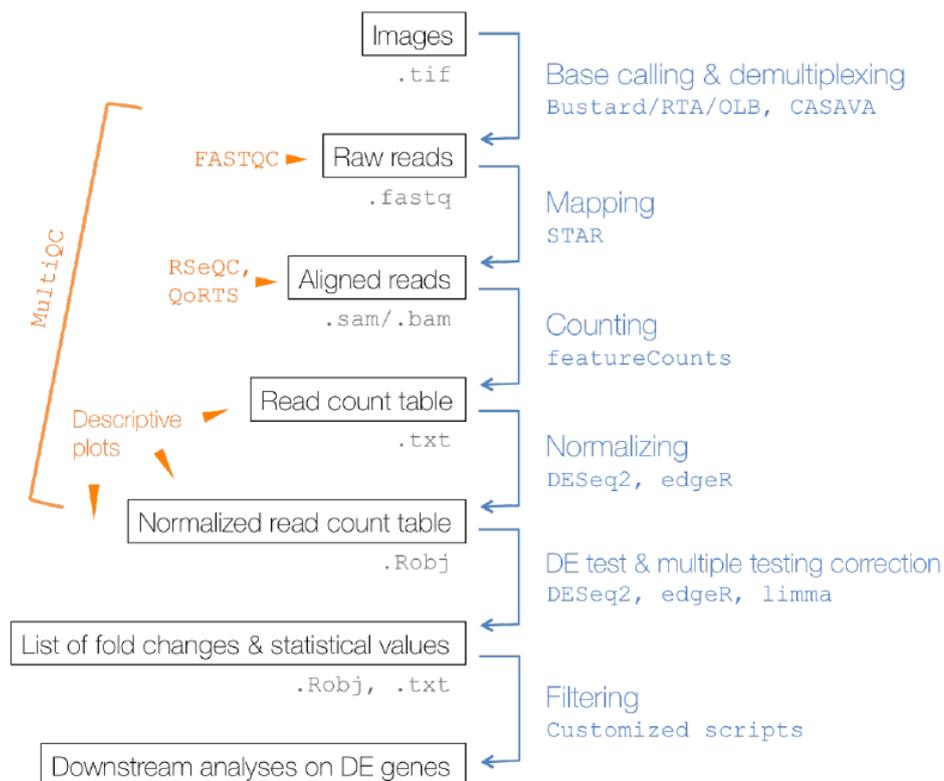


Figura 14. Flowchart del flusso di lavoro bioinformatico con alcuni esempi di programmi impiegabili per i diversi step di analisi

La mappatura

Per identificare i trascritti presenti in un campione specifico, è necessario determinare l'origine genomica dei frammenti di cDNA sequenziati. L'assegnazione di letture sequenziate rispetto la loro origine più probabile è chiamata mappatura ed è un passaggio cruciale in quasi tutti gli esperimenti di sequenziamento ad alto rendimento (Morrison et al., 2015).

I programmi di allineamento RNA-seq e annotazione più popolari sono STAR, TopHat , GSNAP (Steijger *et al.*, 2013).

Genoma di riferimento e annotazione

Indipendentemente dal tipo di mappatura della lettura (allineamento o pseudo-allineamento), la presenza di una sequenza di riferimento e l'annotazione del gene (cioè quali parti della sequenza di riferimento corrispondono ai geni) sono fondamentali per la maggior parte dei progetti RNA- seq. Le sequenze e le annotazioni del genoma sono spesso generate da consorzi come ENCODE, The Mouse Genome Project, The Berkeley Drosophila Genome Project e altri. I risultati delle analisi condotte possono essere, quindi, consultati e scaricati dai singoli siti Web creati dai rispettivi consorzi o da banche dati pan-specie come quella ospitata dall'Università della California, Santa Cruz (UCSC; <https://genome.ucsc.edu>) o la risorsa europea sul genoma, Ensembl (<http://www.ensembl.org>) (Dündar et al., 2018).

Allineamento delle letture

Un software per l'allineamento delle sequenze popolare è 'TopHat' (Kim et al., 2013). I numeri (o stime) delle letture che si sovrappongono a un dato gene non possono essere interpretati direttamente come assoluti dei livelli di espressione genica individuale. Il valore che si ottiene per un singolo gene in un singolo campione si basa sul numero di letture corrispondenti a quel gene (o trascrizione), ma ci sono numerosi fattori che

influiscono sull'efficienza dell'amplificazione e del sequenziamento di frammenti di DNA (es. GC-bias) (Ritchie et al., 2015).

Per confrontare l'espressione genica tra due condizioni, bisogna calcolare la frazione di letture assegnata a ciascun gene rispetto al numero totale di letture e rispetto all'intero repertorio di RNA, che può variare drasticamente da campione a campione (Fig. 15) (Glaus et al., 2012). Lo scopo della normalizzazione è eliminare gli effetti sistematici che non sono associati alle differenze biologiche di interesse in modo da non distorcere le analisi esplorative così come il test statistico per l'espressione genica differenziale.

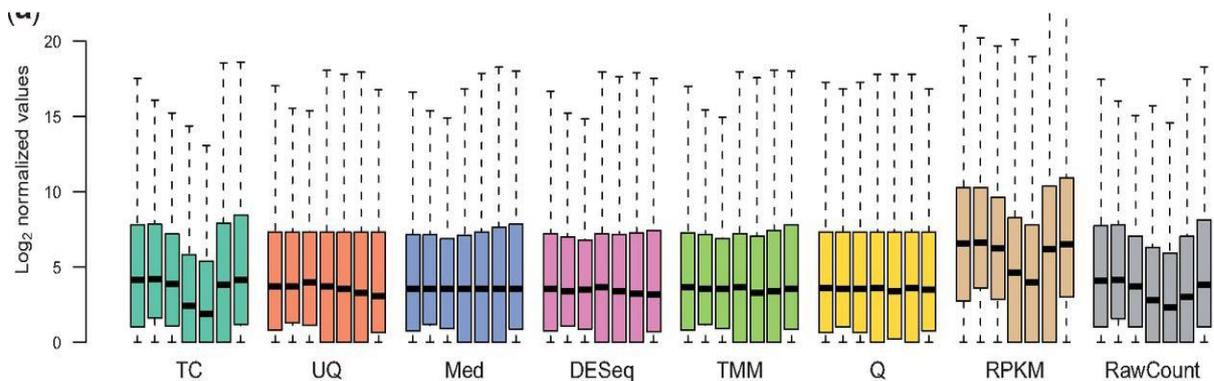


Figura 15. Esempio di normalizzazione per il sequenziamento delle differenze di profondità

Analisi dell'espressione genica differenziale (DGE)

Una delle principali applicazioni dell'RNA-seq è l'analisi dell'espressione genica differenziale (DGE), ovvero l'identificazione dei geni differenzialmente espressi che presentano una differenza significativa del loro livello di espressione fra i due gruppi di condizioni biologiche.

Nel corso degli ultimi anni, oltre all'esecuzione di analisi esplorative basate su misure normalizzate dei livelli di espressione, sono stati dedicati numerosi sforzi all'ottimizzazione dei test statistici per decidere se l'espressione di un singolo gene varia tra due o più condizioni in base alle informazioni raccolte da un minimo di due o tre repliche per condizione (McDermaid et al., 2019).

Le attività di base di tutti gli strumenti statistici DGE sono due:

- stimare l'entità dell'espressione differenziale tra due o più condizioni in base ai conteggi letti da campioni replicati;
- stimare il significato della differenza e correggere per test multipli.

Questi strumenti si basano tutti sul linguaggio di programmazione R e fanno un uso massiccio di potenti metodi statistici sviluppati e implementati negli ultimi due decenni per migliorare la capacità di rilevare cambiamenti basati su un numero estremamente ridotto di repliche.

Heatmap (Mappe di calore)

La Mappa di calore (in inglese: heatmap, di cui alcuni esempi illustrati in figura 16) è una rappresentazione grafica dei valori di espressione dei singoli campioni rappresentati da colori. Le mappe di calore per conteggi di lettura normalizzati per geni che mostrano un'espressione differenziale hanno in genere valori p regolati $<0,05$. Nel linguaggio R sono state predisposte numerose funzioni per generare mappe di calore. Ad esempio, un ottimo pacchetto per la generazione di mappe di calore personalizzate è il pacchetto 'ComplexHeatmap' (Gu et al., 2016).

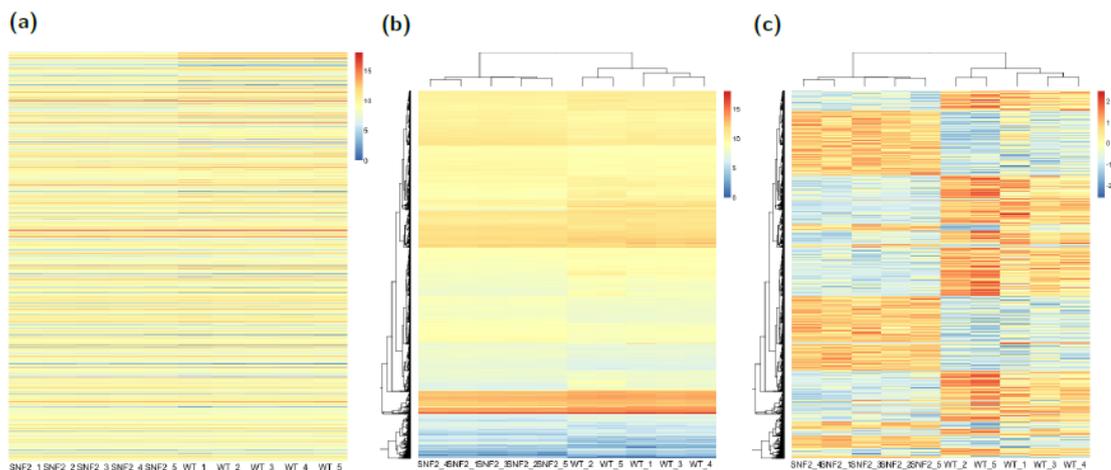


Figura 16. Esempi di mappe di calore dei conteggi di lettura trasformati da $rlog$ per i geni con valori p regolati $<0,05$ nell'analisi DGE.

Lettura dei conteggi di singoli geni

Un importante controllo di integrità dei dati e dell'analisi DGE è vedere se i geni di cui si possiede una conoscenza si comportano come previsto (Hesketh, 2019).

Il sito web <https://www.bioconductor.org/packages/release/data/annotation/> elenca tutti i pacchetti di annotazioni disponibili. I più comuni sono 'edgeR' e 'DESeq', 'limma'. Le funzioni del pacchetto limma sono state continuamente sviluppate per molto più di un decennio e hanno posto la base per molti concetti statistici ampiamente utilizzati per l'analisi dell'espressione genica differenziale (Ritchie et al., 2015).

Una volta ottenuta una tabella di geni che mostrano segni di espressione differenziale, si procede con la valutazione dell'attendibilità statistica attribuibile ai dati ottenuti dei geni differenzialmente espressi.

Meccanismi di resistenza ai patogeni in olivo e metodi di rilevazione

Le cultivar di olivo che mostrano livelli di resistenza ai patogeni, incluso *Spilocaea oleagina*, in genere presentano come segno di risposta all'infezione un aumento del contenuto di alcune molecole bioattive del metabolismo secondario, in particolare di derivati dell'oleuropeina, acidi idrossicinnamici e flavonoli (El Aabidine et al., 2010; Rahioui et al., 2013, 2009). Inoltre, la composizione fenolica delle matrici di olivo è estremamente complessa, le sostanze polifenoliche sono distribuite in tutte le parti della pianta (Soler-Rivas et al., 2000), ma cambiano in quantità e varietà in dipendenza del tessuto di provenienza. I polifenoli dell'olivo possono essere classificati in sette gruppi: fenoli semplici, acidi benzoici, acidi cinnamici, flavonoidi, isocromani, lignani, secoiridoidi e oleosidi (Bendini et al., 2007; Obied et al., 2007). I composti fenolici, infatti, sono anche spesso implicati nella difesa delle piante contro gli agenti patogeni e la loro sintesi e accumulo sono associati alla resistenza dell'ospite delle piante. In olivo, alcuni studi hanno evidenziato un effetto antifungino di oleuropeina, idrossitirosolo e rutina (Báidez et al., 2007; El Aabidine et al., 2010; Rahioui et al., 2009). L'ossidazione di questi difenoli, produce chinoni e melani, intermedi altamente reattivi le cui reazioni secondarie sono responsabili di gran parte di processi ossidativi che si evidenziano durante la senescenza vegetale, le risposte al taglio e ai patogeni, e che appaiono sotto forma di pigmentazione necrotiche marroni (El-Modafar and El-Boustani,

2005). Questi dati, nel complesso, suggeriscono un ruolo fondamentale dell'ossidazione fenolica catalizzata da composti polifenolici nel limitare l'infezione/invasione dei patogeni vegetali e la progressione della malattia (Lanza et al., 2017).

La rilevazione simultanea di un'ampia gamma di composti durante il processo di patogenesi si è rilevata utile anche nel caso di *Xylella* e i metabolomi delle piante resistenti e sensibili a questo patogeno hanno evidenziato cambiamenti nella quantità di alcuni metaboliti secondari (correlati alla via della fenilpropanoide, all'acido chinico, alla forma aldeidica dell'oleuropeina, al ligstrosio) a seguito dell'infezione batterica e del loro ruolo nella limitazione della progressione dei sintomi (Girelli et al., 2019; Vergine et al., 2019).

Luvisi et al. (2017) hanno analizzato la composizione fenolica delle cultivar di olivo (suscettibili e resistenti) in risposta alle infezioni da *Xylella*. Risultati significativi forniscono differenze in alcuni composti fenolici minori, ma non in quelli comunemente associati a meccanismi di resistenza attivati contro altri patogeni dell'olivo. Una significativa riduzione dell'idrossitirosole glucoside e aumento significativo della quantità di acido chinico sono stati riscontrati in piante infette. Risultati simili sull'acido chinico sono stati riportati anche da Wallis et al. (2013) in uno studio condotto sulla vite con sintomi di Pearce Disease, provocato da *Xylella*, suggerendo un possibile legame tra il comportamento dell'olivo e dell'uva infetta da *Xylella* e il possibile utilizzo di tale composto come marker di infezione. I risultati sono stati confermati in uno studio di Sabella et al. (2018), dove l'analisi dei profili fenolici di due cultivar (Cellina di Nardò e Leccino) hanno evidenziato una riduzione dell'idrossitirosole glucoside e, solo nel Leccino, un aumento dell'acido chinico e della lignina rispetto alla cultivar sensibile. In questo contesto, un livello più elevato di acido chinico nelle cultivar sensibili naturalmente infette, Ogliarola e Cellina di Nardò, è stato ulteriormente confermato dalla ricerca condotta da Girelli et al. (2019), supportando così ulteriormente il possibile utilizzo di questa molecola come biomarcatore per la malattia. Novelli et al. (2019) hanno valutato il ruolo potenziale dei metaboliti secondari di difesa nelle piante di olivo esposte a *Xylella* e hanno riportato le differenze nel contenuto totale di fenoli semplici, flavonoidi e tannini tra Cellina di Nardò e Leccino. Nelle piante di Leccino infette, sono state osservate quantità maggiori di flavonoidi (come quercetina, kaempferolo e genisteina), tannini, acido oleanolico, acido cinurenico e la molecola segnale fenolica dell'acido salicilico rispetto alle piante di Cellina di Nardò. I livelli più elevati di questi composti

solo nei campioni Leccino infetti indicano il loro possibile coinvolgimento nella risposta di difesa a *Xylella* (Vergine et al., 2019).

L'analisi del trascrittoma (ovvero lo studio dell'espressione dei geni attraverso l'analisi degli RNA messaggeri) mediante tecniche di sequenziamento di ultima generazione (Next Generation Sequencing) consente di identificare geni di resilienza e potenziali biomarcatori. È messo in evidenza che l'infezione da *Xylella* provoca un forte rimodellamento delle proteine della parete cellulare e che i geni coinvolti potrebbero essere utilizzati come biomarcatori utili per l'identificazione precoce dell'infezione (Giampetruzzi et al., 2020). Un altro tra i patogeni che attaccano l'olivo in maniera massiccia è la *Spilocaea oleagina*. In letteratura esistono pochi studi di espressione genica riguardanti la *Spilocaea oleagina*. La classe funzionale più abbondante individuata, attivata dalla presenza del fungo, corrisponde a sequenze con un'elevata omologia con i geni implicati nel metabolismo primario e secondario e nel mantenimento cellulare (21%). Un risultato di questo tipo indica che vi è un'ampia riprogrammazione dell'espressione nei geni coinvolti nel metabolismo primario e secondario che si verifica nelle foglie di olivo dopo l'infezione da *S. oleagina* (Benitez et al., 2005). Inoltre, è stata rilevata una correlazione tra l'espressione genica basale di alcuni geni (principalmente quelli indotti subito dopo l'infezione del patogeno) e la tolleranza a *S. oleagina*. Tuttavia, questi studi non sono esaustivi in quanto molti dei geni individuati come possibili fattori di resilienza/suscettibilità si sovrappongono alle vie biosintetiche che in generale si attivano nelle piante di olivo a seguito di un danno da ferita (Benitez et al. 2005).

La ricerca scientifica sta cercando attivamente di sviluppare metodi diagnostici che consentano di identificare la malattia precocemente in campo, prima della comparsa dei sintomi, attraverso l'analisi dell'espressione genica e l'identificazione di biomarcatori nelle primissime fasi dell'infezione, al fine di poter intervenire tempestivamente, di limitare la diffusione e di certificare il materiale di propagazione. Una volta individuati i biomarcatori, l'uso di metodiche innovative consente di bloccare ed isolare il focolaio di infezione a pochi individui fornendo risultati istantanei permettendo di rilevare efficacemente le infezioni direttamente sul campo (Martinelli et al., 2015). Queste metodiche innovative portano all'analisi della sintomatologia se calibrati e accoppiati con dati di trascrittoma. L'impronta trascrizionale tessuto-specifica migliorerebbe notevolmente il rilevamento asintomatico precoce del patogeno sistemico delle piante caratterizzato da bassi titoli nei tessuti infetti.

Scopo della tesi

Negli ultimi anni sono stati introdotti strumenti che possono rilevare risposte molecolari connesse all'infezione e/o meccanismi di difesa utilizzabili per effettuare la diagnostica precoce (Martinelli et al., 2015). Recentemente è stato sviluppato dalla Hyris un termociclatore portatile denominato bCUBE® che consente di effettuare in campo analisi molecolari attraverso tecniche di amplificazione isoterma LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) e la classica RealTime-PCR (RT-PCR). Allo stato attuale lo strumento è stato utilizzato per l'identificazione di *Xylella fastidiosa* (Martinelli et al., 2019) tramite kit brevettati da Hyris® con risultati promettenti anche se non ancora esaustivi, e con i primer sviluppati da Harper et al. (2010) e da Yaseen et al. (2015) e il protocollo LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) sviluppato da European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA>). Lo scopo dell'attività di dottorato è stato quello, quindi, di implementare e validare questo strumento portatile estremamente innovativo per l'identificazione precoce in campo di agenti patogeni dell'olivo mediante lo sviluppo di nuove metodiche di diagnostica di precisione basate sull'identificazione di geni candidati target e putativi biomarcatori di stress biotico e metaboliti secondari coinvolti nella resistenza ai patogeni, identificati attraverso esperimenti di trascrittomici realizzati mediante le più avanzate tecnologie NGS (Next Generation Sequencing).

Parte Sperimentale

Materiali e metodi

Scelta del materiale vegetale

Tutte le piante prese in esame in questa tesi provengono dal campo collezione appartenente al Dipartimento SAAF- Università degli Studi di Palermo, in cui sono presenti cultivar locali e internazionali di otto anni coltivate in pieno campo nel territorio di Sciacca (37°49'76'' N, 13°20'37'' E).

In una prima fase è stato condotto uno screening sulle cultivar presenti per definire la risposta delle cultivar all'infestazione da *Spilocaea oleagina*: nel periodo in cui il fungo manifesta maggiormente la sua presenza è stata valutata l'incidenza della malattia secondo il metodo diagnostico tradizionale sviluppato da Loprieno e Tenerini nel 1959. Questa consiste nell'immergere un campione di foglie in una soluzione al 5% di NaOH o KOH per un tempo di 2-4 minuti a 55-60°C. In presenza di infezione da *S. oleaginea* si evidenzia la comparsa di macchioline circolari sulla pagina superiore delle foglie. Il protocollo impiegato per la valutazione ha previsto il campionamento e la valutazione di 100 foglie per albero. Per ogni cultivar l'analisi è stata condotta in tre repliche. In questa prima fase sono state prese in esame 80 cultivar e individuati genotipi fenotipicamente divergenti circa la resistenza e suscettibilità

Dopodichè sono state selezionate 4 cultivar a rappresentanza di 4 diversi livelli di resilienza:

- molto suscettibile (Nocellara del Belice),
- suscettibile (Calatina),
- mediamente resistente (Abunara),
- resistente (Koroneiki).

Per ognuna di queste quattro cultivar, inoltre, è stata valutata l'incidenza della malattia al variare della distanza dei sestri di impianto considerando tre diverse distanze:

- 4 m x 2 m,
- 4 m x 3 m,
- 4 m x 4 m.

I campionamenti delle foglie su queste cultivar sono stati effettuati in 6 diversi periodi dell'anno, a fine estate (settembre), e nei mesi invernali (dicembre, febbraio, marzo, aprile e maggio). Per 2 anni le piante sono state seguite ed è stata monitorata la presenza a livello fogliare di *S. oleagina*.

Al fine di studiare i meccanismi molecolari coinvolti nella difesa da *Spilocaea oleagina* e per identificare funzioni geniche chiave coinvolte sono state selezionate per condurre gli esperimenti di trascrittomica su larga scala mediante RNA sequencing (RNA-seq-Illumina) la cultivar Koroneiki, che ha mostrato maggiore resistenza in campo, e la cultivar Nocellara del Belice, che ha mostrato la maggiore suscettibilità, analizzando due stadi: 'nessun segno di malattia' (stadio 0, T1) ed 'evidente presenza di malattia' (stadio 3, T3).

Determinazione dei polifenoli totali su genotipi resistenti e suscettibili

Per valutare il contenuto totale di polifenoli è stato ottenuto un estratto dalle foglie (Palmeri et al., 2019) e per la quantificazione è stato utilizzato il metodo Folin-Ciocalteu (Vazquez Roncero et al., 1976), apportando alcune modifiche. Una quantità di 250 µL di estratto fogliare è stata miscelata con 1,25 mL di reagente Folin-Ciocalteu e lasciata reagire per 3 minuti, quindi sono stati aggiunti 2,5 mL di carbonato di sodio al 20% (Na₂CO₃). La miscela è stata portata ad un volume finale di 25 mL e posta ad incubare al buio per 1 ora a 25° C. Per quantificarne il contenuto è stata misurata l'assorbanza a 725 nm utilizzando uno spettrofotometro e i risultati sono stati espressi come milli grammi di acido gallico equivalente (mg GAE / g su foglie secche). È stata poi costruita una retta di taratura usando l'acido gallico avente R²=0.998.

Valutazione della sintomatologia da *Spilocaea oleagina*.

Nel periodo in cui il fungo manifesta maggiormente la sua presenza sull'olivo è stato condotto uno screening di valutazione dell'occhio di pavone. Durante il primo anno è stata monitorata la presenza di *Spilocaea oleagina* usando il protocollo di Loprieno e Tenerini (1959) efficace per la valutazione del fungo, che prevede l'immersione del campione di foglie in una soluzione al 5% di NaOH o KOH per un tempo di 2-4 minuti a 55-60°C. In presenza di infezione da *S. oleaginea* si

nota la comparsa di macchioline circolari sulla pagina superiore delle foglie. Il protocollo impiegato per la valutazione ha previsto il campionamento e la valutazione di 100 foglie per albero. Per ogni cultivar l'analisi è stata condotta in tre repliche.

Estrazione dell'RNA totale e trascrizione inversa del cDNA per Real Time

Sono stati prelevati campioni in triplicato di foglie provenienti dalle 4 cultivar selezionate per lo studio – Nocellara del Belice, Abunara, Calatina e Koroneiki – in tre stadi: ‘nessun segno di malattia’ (stadio 0, indicato come T1, in data 24 settembre), stadio intermedio ‘presenza della malattia’ (stadio 2, indicato come T2, prima settimana marzo) e ‘evidente presenza di malattia’ (stadio 3, indicato come T3, 21 aprile).

Il materiale vegetale (foglie) è stato polverizzato con un pestello in azoto liquido. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il Kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma). L'RNA totale è stato quantificato e la sua purezza è stata valutata al Nanodrop (ND1000 Thermo fisher Scientific) e successiva elettroforesi capillare su chip tramite Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer), che ha permesso di rilevare i valori RIN (RNA integrity number). Complessivamente la resa e la qualità sono risultate buone, intorno a 200 ng/microlitro, RIN = 9.

Per la retrotrascrizione (RT) del RNA è stato usato il kit di sintesi del cDNA iScript™ gDNA BioRad seguendo il protocollo consigliato. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 µL contenente: 4 µL di buffer e 1 µL di soluzione con l'enzima retrotrascrittasi e 15 µL di RNA. Il ciclo termico di trascrizione prevede la fase di printing a 25° C per 5 minuti, la trascrizione inversa a 45° C per 20 minuti, l'inattivazione della RT a 95° C per 1 minuto. La qualità e la quantità del cDNA sono state determinate utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop.

Disegno di primer di possibili biomarcatori impiegabili per la tecnologia LAMP

Determinati i livelli di resistenza e suscettibilità in campo di 4 cultivar (Nocellara del Belice, Abunara, Calatina e Koroneiki) sono stati disegnati primer LAMP e Real Time PCR utilizzando

dati molecolari presenti in letteratura. Infatti, negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi di trascrittomica finalizzati all'individuazione di geni differenzialmente espressi durante le principali malattie dell'olivo (Azevedo-Nogueira et al., 2022; Benitez et al., 2005; Luvisi et al., 2017; Sadler et al., 2021) che sono anche depositati in genebank. I geni e gli EST (Espressed Sequence Tag) putativamente coinvolti nella resistenza e suscettibilità a *Spilocaea oleagina* sono stati scaricati dal database NCBI e salvati in formato fasta. Successivamente una volta disponibili i nostri dati di sequenziamento dei trascritti di Koroneiki e Nocellara del Belice si è proceduto al disegno di ulteriori primer di geni e putativi marcatori di stress da infezione determinato da *Spilocaea oleagina*. Per il disegno dei primer specifici per RT-LAMP è stato usato il software online 'Primer Explorer' un designer gratuito basato sul Web offerto da Eiken (<https://primerexplorer.jp/e/>) e un prodotto commerciale di Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com>). È stato mantenuto come gene di riferimento 'housekeeping' l'Olest34 in entrambe le metodiche. Il gene Olest34 (simile a un interspacer ribosomiale, GenBank CK087212) è stato scelto come gene di controllo (Housekeeping), analogamente a quanto riportato dalla letteratura (Benitez et al., 2005). Per la validazione dello strumento portatile bCube in modalita LAMP sono stati disegnati 10 primer e altri 10 per RT-PCR sulle sequenze riportate in letteratura (Benitez et al., 2005). I primer disegnati possono essere consultati in tabella 5 e tabella 6.

Saggio RT-LAMP

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato in reazioni RT- LAMP utilizzando WarmStart Colorimetric RT-LAMP 2X Master Mix o WarmStart LAMP Kit (DNA & RNA) (New England Biolabs, Ipswich, MA) e primer LAMP disegnati impiegando NEB LAMP Primer Design Tool (sequenze riportate in tabella 5). Le miscele e le condizioni di reazione sono state impostate secondo le istruzioni del produttore. Il rilevamento dei prodotti è stato eseguito utilizzando il termociclature portatile bCube. Tutti i dati RT-LAMP sono stati ripetuti conducendo 3 esperimenti indipendenti.

Condizione di reazione RT-LAMP

Per semplicità nell'impostazione delle reazioni, sono stati creati degli stock dei primer LAMP a una concentrazione 10X. Una miscela dei 6 primer 10X LAMP è stata utilizzata, come riportato in tabella 3:

Tabella 3. Condizione di reazione saggio LAMP

PRIMER	CONCENTRAZIONE 10X (STOCK)	CONCENTRAZIONE 1X (FINALE)
FIP	16 microlitri	1,6 microlitri
BIP	16 microlitri	1,6 microlitri
F3	2 microlitri	0,2 microlitri
B3	2 microlitri	0,2 microlitri
LOOP F	4 microlitri	0,4 microlitri
LOOPB	4 microlitri	0,4 microlitri

La miscela di reazione LAMP da 25 µl è stata così di seguito preparata per singolo campione (tabella 4):

Tabella 4. Solventi di reazione saggio LAMP

REAGENTE	
	RILEVAMENTO RNA TARGET
WarmStart LAMPADA 2X Master Mix	12,5 microlitri
Colorante fluorescente (50X)	0,5 microlitri
Miscela di primer LAMP (10X)	2,5 microlitri
RNA bersaglio	1 microlitri
dH2O	8,5 microlitri
Volume totale	25 microlitri

L'amplificazione è stata condotta a temperatura costante di 65°C e la reazione è stata monitorata per 3600 secondi con acquisizioni ogni 60 secondi.

Tabella 5. Sequenze dei primerdisegnati per LAMP.

Primer name		Primer Sequence LAMP
Olest34	F3	GGGGAACAAGCACACTTGG
	B3	AAGTGGAGCATGCATGAAGT
	FIP	ACGGTCCAACCAATTGGGAGAG-GGAGAGTTGTATGCTGCGT
	BIP	CTTCACGGGCGAGGTCTCTG-TCTATTCTTTTCCCTGGCGC
	F2	GGAGAGTTGTATGCTGCGT
	F1c	CTTCACGGGCGAGGTCTCTG
Olest17	B2	ACTACCACGACCCCTCCT
	B1c	TGGGCAGTAAACAAACTCCA
	FIP	CAGTGCCAGTCCCCCATTC-GATAACCTCCGAGGCCGTA
	BIP	CGTTCGGATTTCGGGGGACTG-ACAGAGAGTAGCCACGCTG
	F2	GATAACCTCCGAGGCCGTA
	F1c	CAGTGCCAGTCCCCCATTC
	B2	ACAGAGAGTAGCCACGCTG
	B1c	CGTTCGGATTTCGGGGGACTG
Olest30	F3	CACATTTACTTGTCTGGAG
	B3	CAGAGAAGAGGTTACTTTCCA
	FIP	GTTCTTCTACAGAACTCGAGCATTT-TGGTCTTTTGCCCTTGAAG
	BIP	TGGCTGCCATCAAGTGCAAA-AGAAGAAAGGGTACTAGTTCAT
	F2	TGGTCTTTTGCCCTTGAAG
	F1c	GTTCTTCTACAGAACTCGAGCATTT
	B2	AGAAGAAAGGGTACTAGTTCAT
	B1c	TGGCTGCCATCAAGTGCAAA
Olest57	F3	AAATAACCATGTGTGACATCA
	B3	CAGGTATAGAGAGTAATATCAGAGT
	FIP	GAGCAAACATCAAAGAGGCTTTAGT- TTTGAAACATCTTTCTTTTGGGA

	BIP	GGTGTA AAAATGATCGTCTTTTCGTG- ACAAGGAAGAATTTTCAAGGT
	F2	TTTGAAACATCTTTCTTTTGGGA
	F1c	GAGCAAACATCAAAGAGGCTTTAGT
	B2	ACAAGGAAGAATTTTCAAGGT
	B1c	GGTGTA AAAATGATCGTCTTTTCGTG
	BIP	TGGAGTACAATCAATTCTGCACTAA-AGCATTGAAGTGCCAGTG
Olest60	F2	ATCTGCTGATATATTTGCTGTG
	F1c	CCACTAGACTTCGTACCTCAAC
	B2	AGCATTGAAGTGCCAGTG
	B1c	TGGAGTACAATCAATTCTGCACTAA
Olest71	F3	GGAATTACTTTGAAA ACTTGGTTAG
	B3	GCTTAGGAATGTAGTTTTTGTGAG
	FIP	GCTATGCTCTAAGGTGGTCTTACTA-TTGGAGAATGGTCTCTCTG
	BIP	GGAAGGGGAAAGGGATCTTCC-ATCAATGACGGTGGTTGC
	F2	TTGGAGAATGGTCTCTCTG
	F1c	GCTATGCTCTAAGGTGGTCTTACTA
	B2	ATCAATGACGGTGGTTGC
	B1c	GGAAGGGGAAAGGGATCTTCC
Olest72	F3	TCTCTTGATACTAGTTCTGTACC
	B3	AGCTATCATAAAAATAACTGACGG
	FIP	CGAAGTTCACCTCGACATAGCTG-CAATCTTACTCTCAGGCTTCC
	BIP	TCTTCAAGGTAATCATAATTGGGGC- TGTAACATATTCACATCGATCAG
	F2	CAATCTTACTCTCAGGCTTCC
	F1c	CGAAGTTCACCTCGACATAGCTG
	B2	TGTAACATATTCACATCGATCAG
	B1c	TCTTCAAGGTAATCATAATTGGGGC

Olest22	F3	GGACTTTTCATCATTGACAAGG
	B3	GTTTGGGGTCTGGTTTCA
	FIP	GTTTCGTCGACACTTCGCCA-AAGGAGTTATACAACACTCCAC
	BIP	ATTGAGAACACTCCAGGCATTG-TCTCCCCAGGTTTCCATC
	F2	AAGGAGTTATACAACACTCCAC
	F1c	GTTTCGTCGACACTTCGCCA
	B2	TCTCCCCAGGTTTCCATC
	B1c	ATTGAGAACACTCCAGGCATTG
Olest47	F3	CTGGATATACGATCGAGAGG
	B3	CGAAGCTATAGCTGCCTCT
	FIP	TGCAAGGGAACAACTACGG-TACAACTCTGAGTACATCATGT
	BIP	ATTTCTTGTTACATCTGGTATGGG- TATATGAAGATCTAGCAAAACCACA
	F2	TACAACTCTGAGTACATCATGT
	F1c	TGCAAGGGAACAACTACGG
	B2	TATATGAAGATCTAGCAAAACCACA
	B1c	ATTTCTTGTTACATCTGGTATGGG
Olest66	F3	AGAAACAGCAAGAGGAGG
	B3	ATTGATGTTCTGCCGTGC
	FIP	GGTTTCATCTGGCAAATAGCTTTC- ACTTGAAAGTTGTATCTGGTCA
	BIP	TCTCTGACAGCAAACCCAGTTT-GCAGCATTAGATGATGTGTC
	F2	ACTTGAAAGTTGTATCTGGTCA
	F1c	GGTTTCATCTGGCAAATAGCTTTC
	B2	GCAGCATTAGATGATGTGTC
	B1c	TCTCTGACAGCAAACCCAGTTT
Olest80	F3	TACCCAAATGTTGAGCCG
	B3	GCTTCCCTCGAGTTAACG

	FIP	GCACATAAAACCAAGAAGATAACCG- TGACTACACGAGTGTATACGA
	BIP	GCTTTGAGGGCACGAGTGTA-TTCTTGCCAATGCTGTCTG
	F2	TGACTACACGAGTGTATACGA
	F1c	GCACATAAAACCAAGAAGATAACCG
	B2	TTCTTGCCAATGCTGTCTG
	B1c	GCTTTGAGGGCACGAGTGTA

Real-time quantitative RT-PCR

Per l'esecuzione delle analisi RT-PCR quantitativa in tempo reale i primer forward e reverse sono stati disegnati per essere specifici, facendo riferimento alle sequenze Olest riportate in letteratura da Benitez et al. (2005) (tabella 6). Il gene Olest34 (simile a un interspacer ribosomiale, GenBank numero di adesione: CK087212) è stato scelto come "housekeeping gene" (Benitez et al., 2005).

Ogni reazione di trascrizione inversa è stata eseguita utilizzando 1 µg di RNA totale ottenuto da campioni di foglia a diversi stadi della malattia in tre repliche, utilizzando la II RNasi trascrittasi inversa di Invitrogen.

Condizione di reazione RT-PCR

Le reazioni sono state eseguite in un volume totale di 10 µl, contenente 0,2 µl di primer forward e reverse 3,6 µl di ddH₂O e 5 µl della master mix PCR (PCR SuperMix, ThermoFisher). È stato impiegato il seguente ciclo termico di PCR: 95°C per 30 s, seguito da 40 cicli di 95°C per 15 s e poi 60°C per 30 s e una fase finale di estensione di 72°C per 40 s. La generazione della curva di melting (55–95°C) dopo il ciclo finale della PCR è stata effettuata per testare la specificità dell'amplificazione della PCR, utilizzando il termociclatore Rotore-Gene Q (QIAGEN).

Dagli studi presenti in letteratura (Benitez et al., 2005) sono state selezionate 4 coppie di primer Olest08, Olest30, Olest72 e Olest34 che amplificano geni differenzialmente espressi in cultivar di olivo resistenti e suscettibili a *Spilocaea oleagina*, identificati da Benitez et al. (2005) in esperimenti di Differential Display e caratterizzati mediante RT-PCR quantitativa in tempo reale. Quattro cultivar che avevano mostrato dai rilievi di campo e test NaOH diversi livelli di resilienza/suscettibilità a *S. oleagina* (bassa sensibilità Koroneiki; media sensibilità - Calatina; medio-altamente suscettibile - Abunara, altamente suscettibile Nocellara del Belice) sono state impiegate nell'esperimento.

Il livello di espressione relativo di ciascun gene è stato calcolato con il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizzando il gene "housekeeping", *Olest34*, (Benitez et al. 2005). Questi valori sono stati quindi utilizzati per determinare i cambiamenti di fold di espressione genica tra sane e foglie malate, secondo le seguenti espressioni:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)},$$

$$\Delta Ct = Ct(\text{gene 'bersaglio'}) - Ct(\text{gene 'housekeeping'})$$

$$\text{e } \Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct(\text{foglie malate}) - \Delta Ct(\text{foglie sane}) \text{ (van Englesdorp et al., 2009).}$$

Tutti i campioni sono stati analizzati in tre repliche e presentati come media \pm SD dopo la normalizzazione. Al fine di eseguire il confronto dei cambiamenti nell'espressione relativa genica (GRE) nei test qRT-PCR e nei dati RNA-Seq, sono stati calcolati i parametri Log₂GRE e log₂FC di RNA-Seq.

Tabella 6. Geni marcatori candidati sensibili selezionati da studi di riferimento.

Nome	Descrizione	Gene ID	Reference	Sequenza Primer RT-PCR
Olest34	Ribosomal RNA gene	KF80510 2.1	Benitez et al., 2005	CCAACTACCGTGCATGTATGATCC GGAGAGTTGTATGCTGCGTTCCG
Olest08	Constans B-box zinc finger family	CK08720 1	Benitez et al., 2005	TTTTTTTTTTGAAGATATTGAAAGGATGTGCTGT GCTAGCATGGATTTTCATAATATATTGTATCACACTTCC
Olest21	BPF-1 gene (BPF-1)	CK08720 5	Benitez et al., 2005	GTAACACAAATGAACTTTCGCAAC AGGGTCTTCCATTTATCCTTCAAG
Olest60	Calciu m dependent protein kinase (CDPK)	CK08721 5	Benitez et al., 2005	GCAAGCATTGAAGTGCCAGTGGCTGA CGAGTGTCCGATTGCAGGGGCAAG
Olest71	Ring zinc finger protein	CK08721 9	Benitez et al., 2005	CGAGTGTCCGATTGCAGGGGCAAG
Olest17	Retrotransposon Tnt (RTR-Tnt)	CK08720 3	Benitez et al., 2005	TCGGAGGTTATCCAGGAGGGGTCGTG TCAAAGCGTCAGTCATGCGTGGCAAG
Olest30	Thaumatococcus protein (TLP)	CK08721 0	Benitez et al., 2005	CAAACAGAGAAGAGGTTACTTTCC CGAGTGGTCTTTTGCCCTTGAAGC
Olest72	Retrotransposon Tgmr (RTR-Tgmr)	CK08722 0	Benitez et al., 2005	ATCTAATCCAATCATGCATGAGCCTCGTCA TCGCCGATACTTCTTGAGTGAAGCCTGA
Olest22	Thioredoxin peroxidase Bas 1 (TPx)	CK08720 6	Benitez et al., 2005	GGTTCTCCTGAACATATTGCAATGCCTGGA GCATGGGTCCAAACAGACAGAAAGTCTGGG
Olest06	Chalcone synthase (CHS)	CK08720 0	Benitez et al., 2005	TTTCCTGTCCAAAAGAGAAGGATACAGAAAAGCTGT ACGAGGTGACCATTGAAGAAGCCAAGGATG
Olest47	Stearoyl-acyl carrier protein desaturase	CK08721 3	Benitez et al., 2005	GGGCCAAGCAAGGACCAAGAATTCCA GCGATGATGATCACCAAATTCCTCGAGA

Sequenziamento ad alto rendimento

Complessivamente sono state preparate 6 librerie di Nocellara del Belice che comprendono 3 repliche allo stadio assenza di malattia T1 (NBT1R1, NBT1R2, NBT1R3) e 3 repliche allo stadio infetto T3 (NBT3R1, NBT3R2, NBT3R3), 6 librerie di Koroneki che comprendono 3 repliche allo stadio assenza di malattia T1 (KT1R1, KT1R2, KT1R3) e 3 repliche allo stadio infetto T3 (KT3R1, KT3R2, KT3R3) che sono state sottoposte al sequenziamento, mediante Illumina Novaseq 6000 utilizzando S1 Reagent Kit v1.5 (200 cicli, Illumina, Inc.), condotto conto terzi (ditta BMR genomics – Padova). Il materiale vegetale è stato prelevato allo stadio ‘T1’ quando non erano presenti segni di malattia dovuta all’infezione da *Spilocaea* (data: 24/09/2020) e allo stadio ‘T3’ infetto con evidenti segni della malattia (data: 21/04/2021).

Analisi bioinformatica

Le letture RNA-seq sono state sottoposte a controllo di qualità con fastqc (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e le basi di bassa qualità sono state rimosse utilizzando uno script di perl personalizzato e da un adattatore proprio del software cutadapt versione 2.0 (Martin, 2011). Le letture pre-elaborate sono state mappate sul genoma di riferimento di *Olea europaea var. sylvestris* scaricato da NCBI con HISAT2 versione 2.1.0 (Kim et al., 2015) utilizzando i parametri predefiniti. L'identificazione dei geni differenzialmente espressi è stata eseguita utilizzando l'algoritmo Cuffdiff nella pipeline Cufflinks versione 2.2.1 (Trapnell et al., 2013) con parametri predefiniti. I geni sovra e sotto- regolati sono stati identificati applicando un valore p di cutoff ($\leq 0,01$). Le annotazioni dei geni differenzialmente espressi sono state scaricate dal database uniprot (<https://www.uniprot.org/>) e gli ID TAIR sono stati ottenuti mediante una ricerca “blastp” di *Olea europaea var. sylvestris* facendo una ricerca dei dati di sequenze proteiche presenti in gene bank TAIR10. I file dei risultati di blastp sono stati analizzati utilizzando gli script di ‘perl’ generando il file di mappatura Mapman (Thimm et al., 2004) per *Olea europaea var. sylvestris* che contengono cinque categorie (a) Quasi identiche: punteggio ≥ 1000 e e-value = 0 (b) Molto simili: punteggio ≥ 1000 e e-value $\neq 0$ OPPURE (punteggio ≥ 500 e punteggio < 1000) e e-value = 0 (c) Moderatamente simile: (punteggio ≥ 200 e punteggio < 1000) ed e-value $\neq 0$ (d) Debolmente simile: (Punteggio ≥ 100 e punteggio < 200) (e) Molto debolmente simile: (Punteggio < 100) basato sul punteggio blastp e sul valore elettronico. La panoramica

metabolica e le categorie di geni dello stress biotico dei geni differenzialmente espressi di ciascun confronto sono state visualizzate utilizzando lo strumento MapMan sempre facendo riferimento al genoma *Olea europaea var. sylvestris*. L'analisi di arricchimento dell'ontologia genetica dei geni identificati differenzialmente espressi è stata eseguita utilizzando il Server web DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>). Le tre classificazioni dei termini Gene Ontology (GO) (processo biologico, componente cellulare e funzione molecolare) sono state estratte da DAVID utilizzando uno script Perl personalizzato. I termini in GO con valori $p \leq 0,05$ sono stati considerati significativi e la pipeline utilizzata era già stata impiegata con successo per l'analisi di tratti fisiologici altamente complessi in altre specie (Benny et al., 2022, 2020).

Individuazione di possibili biomarcatori ottenuti dai geni DE dati dalla trascrittomiche e validazione mediante RealTime – PCR

Dai dati ottenuti dalla trascrittomiche sono stati selezionati 15 geni per essere impiegati come possibili biomarcatori. Sono successivamente stati individuati tra questi i sei geni maggiormente performanti che sono stati utilizzati per confermare i risultati di RNA-Seq e quindi per testare i livelli di espressione genica utilizzando qPCR in tempo reale. Le coppie di primer sono state disegnate con il software Primer Premier 3.0 (<https://primer3.ut.ee>).

Le reazioni sono state eseguite in un volume totale di 10 ml, contenente 0,2 ml di primer forward e reverse, 3,6 ml di ddH₂O e 5 ml della miscela master PCR (PCR SuperMix ThermoFisher). È stato impiegato il seguente ciclo termico PCR: 95°C per 30 s, seguito da 40 cicli a 95°C per 15 s, 60°C per 30 s, e una fase finale di estensione di 72°C per 40 s. La generazione della curva di melting (eseguita da 55 a 95°C) dopo il ciclo finale della PCR è stata effettuato per testare la specificità dell'amplificazione della PCR, utilizzando il termociclatore per PCR in tempo reale Rotor-Gene Q (QIAGEN). Anche in questo caso è stato impiegato come gene Housekeeping l'Ole34 (Benitez et al., 2005). Tutti i campioni sono stati analizzati in tre repliche. Tutti i dati sono stati presentati come media \pm DS dopo la normalizzazione. Per eseguire un confronto tra i cambiamenti nelle espressioni relative dei geni (GRE) nei test qRT-PCR e nei dati RNA-Seq, si è proceduto al calcolo di Log 2GRE e log 2FC di RNA-Seq.

Risultati

Valutazione della sintomatologia da *Spilocaea oleagina*

Il protocollo di diagnostica tradizionale che prevede l'immersione in soda delle foglie (Loprieno e Tenerini, 1959), applicato su 80 cultivar, ha permesso di individuare in campo i genotipi fenotipicamente divergenti circa la resistenza e suscettibilità ai *Spilocaea oleagina*. In campo è risultato evidente che tutti gli alberi non presentavano segni di malattia solitamente alla fine dell'estate (settembre), mentre ad aprile si verificava una vera e propria epidemia.

In base alla percentuale di foglie infette, i genotipi possono essere divisi in 4 gruppi:

- a) bassa suscettibilità – meno del 30% di foglie infette;
- b) media suscettibilità, con un intervallo di foglie infette compreso tra il 30% e il 60%;
- c) medio-alta suscettibilità, con un intervallo compreso tra il 61% e il 90% di foglie infette,
- d) alta suscettibilità con oltre il 90% di foglie infette.

I genotipi presenti nel campo collezione che mostrano una putativa resilienza a *Spilocaea* sono: Koroneiki, Aitana, Conservoli, Opera Pia, Abunara, Cerasuola, Bottone di Gallo, Murtiddara Vassallo, Vetrana, Piricuddara.

Tra le cultivar più suscettibili si evidenzia la Bariddara, alcuni cloni di Biancolilla, Monaca, Salicina Vassallo, Passulunara di Lascari, Nasitana, Iacona, Verdello, Verdella frutto grosso, Tonda Iblea, Calatina, Oliva Longa, Castricianella Rapparina, Ogliara Maltese, Leucocarpa e la Cerasuola standard, Nocellara Etnea standard e Nocellara del Belice standard. Ragionevolmente, questo ha portato alla selezione di una cultivar rappresentativa per ogni categoria (Fig.17).

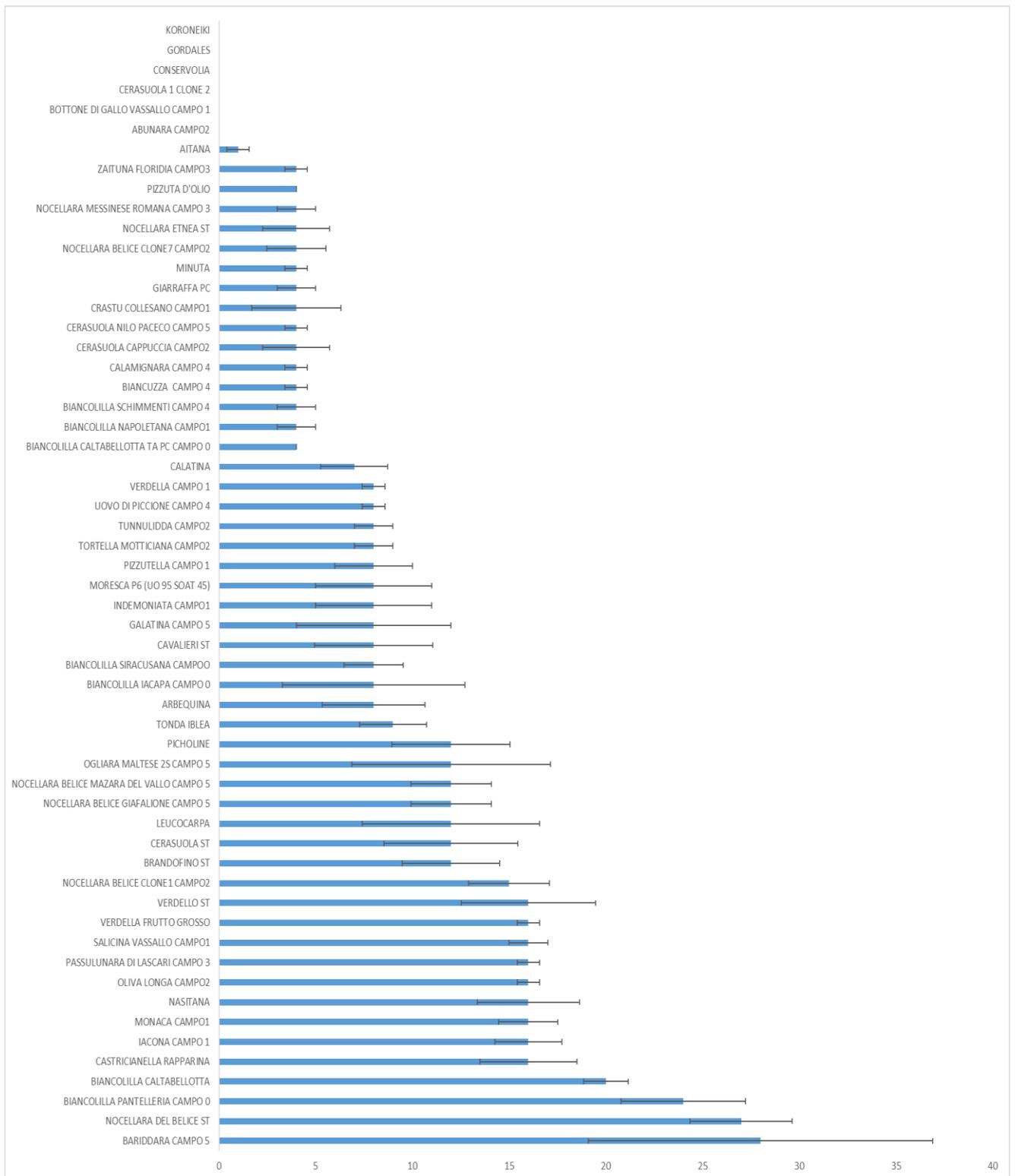


Figura 17. Screening cultivar infette da *S.oleagina*.

Durante i due anni di osservazione, la cultivar Koroneiki ha mostrato una presunta resistenza alla *Spilocaea oleagina* (meno del 20% di foglie infette), mentre la cultivar siciliana di oliva da tavola Nocellara del Belice è risultata particolarmente sensibile (oltre il 90% delle foglie infette). Per questo motivo, queste due cultivar altamente divergenti in termini di suscettibilità sono state scelte per l'analisi RNA-seq Illumina.

Successivamente, sono state selezionate 4 cultivar rappresentative per ogni categoria, indagando l'influenza del ciclo infettivo del fungo e l'interazione che ha su cultivar suscettibili e resistenti. L'incidenza della malattia è stata valutata analogamente determinando la percentuale di foglie infette.

Come mostrato dai grafici (figure 18, 19 e 20), lo 'stadio 0' è quello in cui la malattia non è ancora particolarmente presente se non nel caso di Nocellara del Belice per il sesto di impianto 4x2. Allo 'stadio 1' i segni della malattia risultano già evidenti. Le foglie intaccate dalla malattia mostravano degli aloni relativamente piccoli tipici del fungo. La cultivar Nocellara del Belice è la maggiormente colpita dalla malattia. In questo stadio è stato possibile notare come la distanza del sesto di impianto influenzi, seppur non significativamente, lo sviluppo della *Spilocaea oleagina*. Una maggiore aerazione tra le foglie crea delle condizioni per cui l'umidità tra le foglie si riduce e il numero delle foglie infette si riduce conseguentemente. Questo effetto si ripercuote maggiormente nel sesto di impianto 4x4. Allo stadio di infezione T3 è possibile distinguere i differenti livelli di resistenza/suscettibilità tra le cultivar prese in esame: Nocellara del Belice risente maggiormente dell'infezione, di seguito Calatina, mentre Abbunara e Koroneiki sono quelle dove il livello di infezione resta più basso.

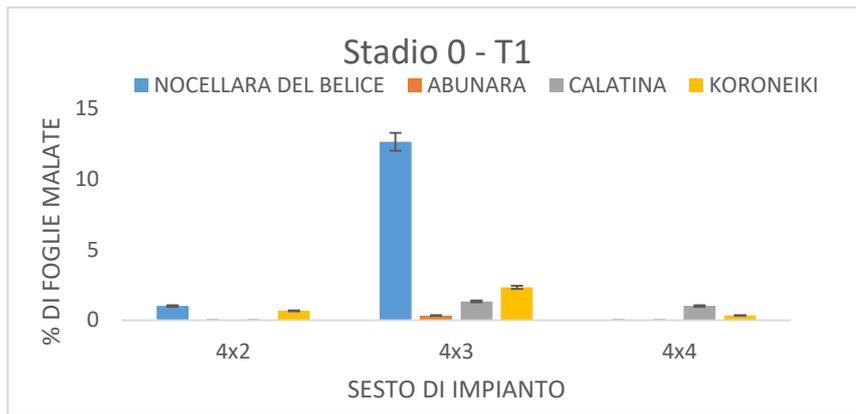


Figura 18. Livelli di infezione da *S. oleagina* allo stadio 0.

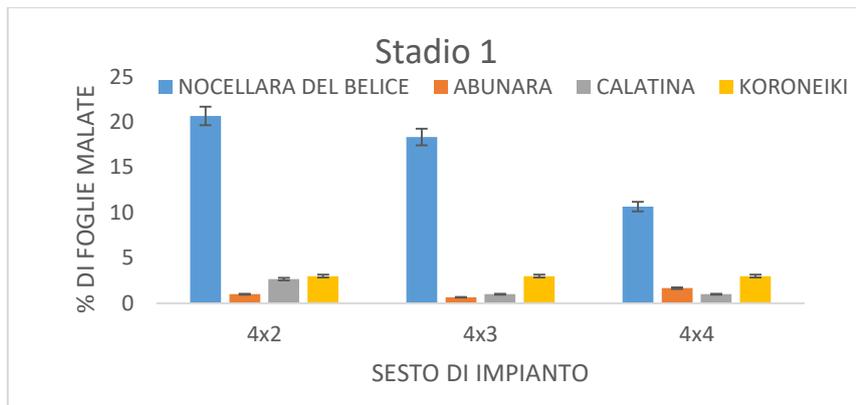


Figura 19. Livelli di infezione da *S. oleagina* allo stadio 1.

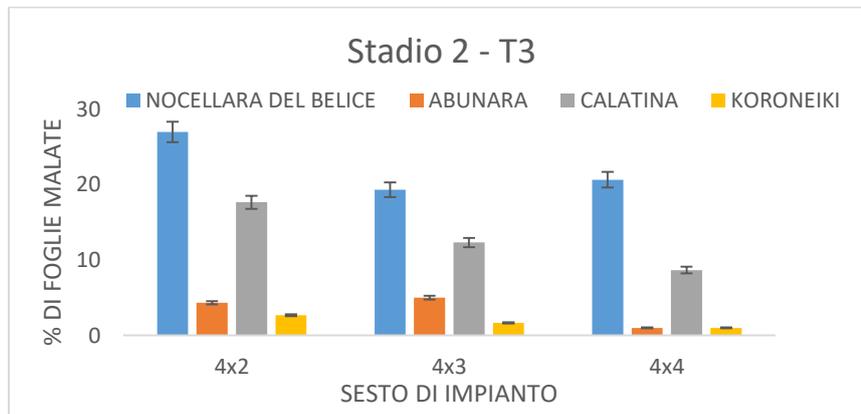


Figura 20. Livelli di infezione da *S. oleagina* allo stadio 2.

Polifenoli totali

Le analisi spettrofotometriche dei polifenoli totali (PT) nelle foglie di olivo (tabella 7) hanno mostrato che non vi è una diretta correlazione tra il contenuto degli stessi e la malattia causata da *Spilocaea oleagina*. Piuttosto, è emerso che le cultivar Nocellara del Belice e Calatina posseggono quantità nettamente superiori di polifenoli, sebbene siano particolarmente suscettibili alla malattia (Fig. 21).

Tabella 7. Quantificazione dei PT espressi in mg di acido gallico su g di foglie secche; ABB: Abunara; CAL.: Calatina; KOR: Koroneiki; NB: Nocellara del Belice

CULTIVAR	TEMPO	FILARE	ID SAMPLE	mg/g dry leaves
ABB	T0	4X2	ABB T0	31,971 ± 2,039
ABB	T0	4X4	ABB T0	29,085 ± 3,077
ABB	T0	4x3	ABB T0	28,945 ± 3,463
CAL	T0	4X2	CAL T0	27,387 ± 1,397
CAL	T0	4X4	CAL T0	23,368 ± 4,969
CAL	T0	4x3	CAL T0	24,291 ± 4,650
KOR	T0	4X2	KOR T0	19,228 ± 0,904
KOR	T0	4X4	KOR T0	19,859 ± 0,838
KOR	T0	4x3	KOR T0	20,504 ± 1,673
NB	T0	4X2	NB T0	27,292 ± 6,411
NB	T0	4X4	NB T0	24,550 ± 4,143
NB	T0	4x3	NB T0	28,203 ± 4,792
ABB	T1	4X2	ABB T1	16,909 ± 2,947
ABB	T1	4X4	ABB T1	19,049 ± 6,567
ABB	T1	4x3	ABB T1	16,626 ± 5,369
CAL	T1	4X2	CAL T1	33,142 ± 1,896
CAL	T1	4X4	CAL T1	24,148 ± 7,239
CAL	T1	4x3	CAL T1	29,390 ± 7,770
KOR	T1	4X2	KOR T1	15,952 ± 2,166
KOR	T1	4X4	KOR T1	27,518 ± 8,459
KOR	T1	4x3	KOR T1	24,282 ± 6,090
NB	T1	4X2	NB T1	39,393 ± 2,375
NB	T1	4X4	NB T1	24,057 ± 10,009
NB	T1	4x3	NB T1	27,256 ± 9,147
ABB	T2	4X2	ABB T2	13,618 ± 2,536
ABB	T2	4X4	ABB T2	17,167 ± 2,767

ABB	T2	4x3	ABB T2	16,293 ± 2,673
CAL	T2	4X2	CAL T2	19,204 ± 1,309
CAL	T2	4X4	CAL T2	15,866 ± 3,676
CAL	T2	4x3	CAL T2	16,945 ± 2,825
KOR	T2	4X2	KOR T2	12,051 ± 0,763
KOR	T2	4X4	KOR T2	13,950 ± 2,838
KOR	T2	4x3	KOR T2	12,634 ± 1,988
NB	T2	4X2	NB T2	18,533 ± 1,557
NB	T2	4X4	NB T2	19,280 ± 0,469
NB	T2	4x3	NB T2	19,717 ± 0,593

Avendo a disposizione piante in pieno campo con sestri di impianto diversi, le analisi condotte sui polifenoli totali hanno consentito di indagare se la distanza inter-filare possa influenzarne o meno la quantità totale di PT. In letteratura non vi sono riferimenti a tali variazioni e concordemente nelle analisi eseguite non sono state riscontrate variazioni significative, relativamente alla stessa cultivar, al variare del sesto di impianto. Per la valutazione dei dati è stato impiegata un'analisi della varianza fattoriale, mettendo in relazione il genotipo, i polifenoli totali e l'incidenza di malattia.

L'analisi delle differenze è stata condotta usando come categorie di controllo il genotipo, le distanze iterfilari e i tempi di campionamento con un intervallo di confidenza del 95%.

Impiegando il test di Turkey sono stati determinati i valori critici che consentono di individuare differenze significative (tabella 8).

Rispetto alla categoria 'cultivar' il valore critico dell'indice di Turkey è di 3,86. Il valore che supera tale indice è tra le cultivar Koroneiki e Nocellara del Belice. Inoltre, sono stati definiti due insiemi A e B:

- A: Nocellara del Belice, Calatina e Abbunara;
- B: Abbunara e Koroneiki.

Rispetto al tempo, il valore critico dell'indice di Turkey è 3,49. Rimane significativa la distanza tra le cultivar Nocellara del Belice e Koroneiki. Lo stadio 0 (T1) e lo stadio 1 vengono inseriti nell'insieme statistico A, mentre lo stadio 2 (T3) nell'insieme B.

Rispetto alla distanza interfilare, il valore critico dell'indice di Turkey è 3,49. Non è stata rilevata alcuna differenza significativa. Tutti i filari sono stasti inseriti nello stesso insieme.

Tabella 8.Sommario riassuntivo dei gruppi individuati dall'analisi di Turkey.

Summary of all pairwise comparisons for CULTIVAR (Tukey (HSD)):			
Category	LS means(mg/g dry leaves)	Groups	
NB	25,3644	A	
CAL	23,7492	A	B
ABB	21,0736	A	B
KOR	18,4420		B
Summary of all pairwise comparisons for TEMPO (Tukey (HSD)):			
Category	LS means(mg/g dry leaves)	Groups	
T0	25,3904	A	
T1	24,8100	A	
T2	16,2715		B
Summary of all pairwise comparisons for FILARE (Tukey (HSD)):			
Category	LS means(mg/g dry leaves)	Groups	
4X2	22,8900	A	
4x3	22,0907	A	
4X4	21,4913	A	

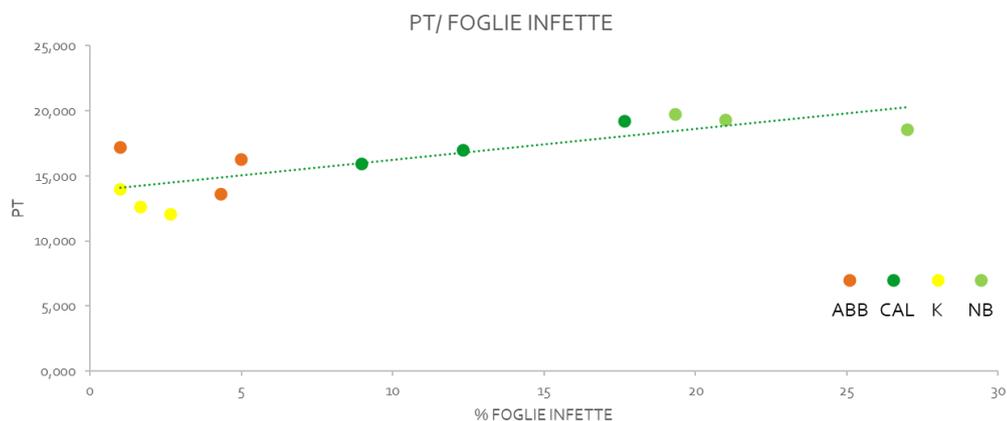


Figura 21. Regressione lineare della quantità di polifenoli totali in confronto alla percentuale di foglie malate allo stadio T3 prendendo in considerazione i valori dei PT delle tre distanze interfilarli 4x2,4x3, 4x4 (Giallo: Koroneiki; Rosso: Abunara; Verde scuro: Calatina; Verde chiaro: Nocellara del Belice) - p-value: 0,001; R²: 0,621.

RT-PCR quantitativa in tempo reale

Per mettere a punto la metodica sono stati testati primer disegnati su geni provenienti dalla letteratura utilizzando il termociclatore portatile bCube in RT-PCR quantitativa in tempo reale. In figura 22 è mostrata l'interfaccia utente che lo strumento mette a disposizione per effettuare le analisi. L'uso di questa interfaccia avviene tramite indirizzo web (<https://bapp2.hyris.net/#/>) ed è accessibile anche da smartphone. Possono essere impostate analisi da qualsiasi parte del mondo senza necessariamente essere lo stesso utente esegue il campionamento poiché lo strumento si collega direttamente ai server della ditta di fabbricazione.

Inizialmente, si è proceduto ad effettuare uno screening dei principali lavori presenti in letteratura e delle banche dati (National Center for Biotechnology Information-NCBI) che ha portato all'identificazione di alcuni putativi geni candidati che potrebbero rappresentare dei biomarcatori. I risultati ottenuti da questo screening preliminare hanno mostrato una correlazione tra l'espressione di alcuni geni Olest e la presenza di *Spilocaea oleagina*. Il gene di controllo *housekeeping* Olest34 è espresso in tutte le cultivar oggetto di studio, indicando che l'esperimento è stato eseguito correttamente e permettendo di normalizzare le curve. Nocellara del Belice e Koroneiki allo stadio 0 (assenza di malattia) hanno presentato curve di emissione di fluorescenza molto simili. È risultato molto interessante l'espressione del gene target.

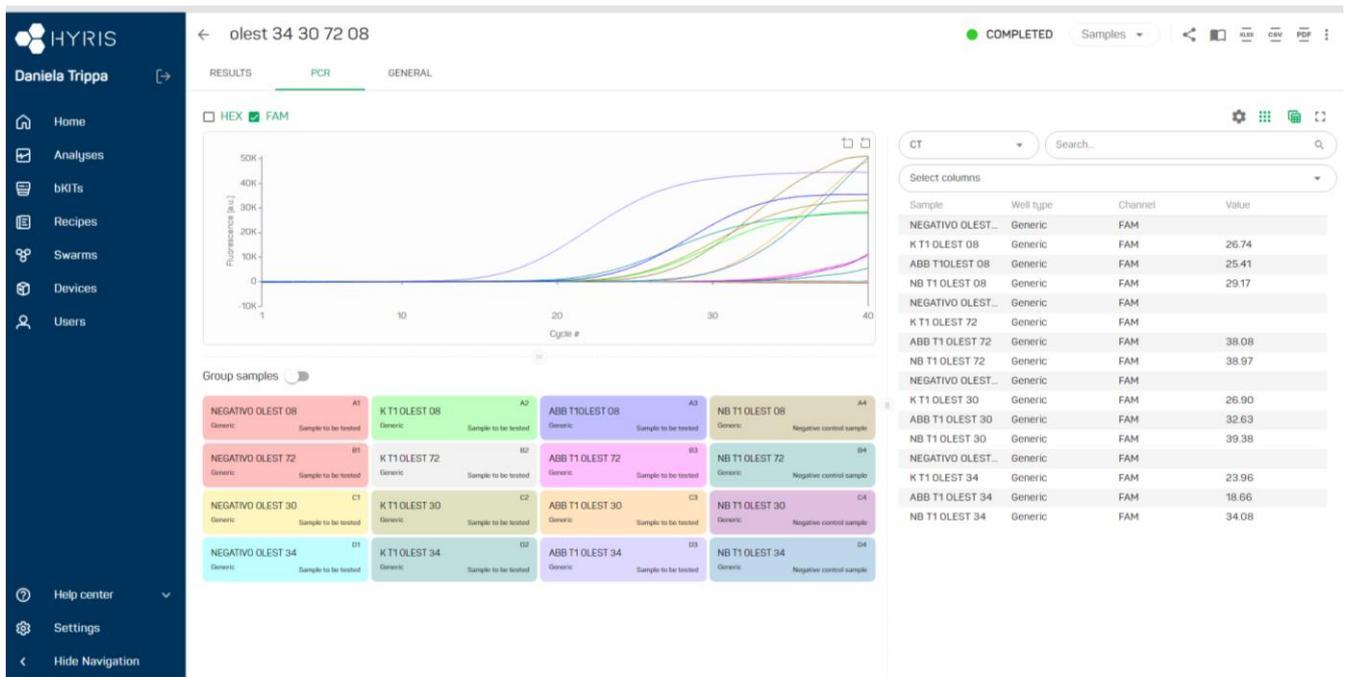


Figura 22. Interfaccia online del termociclatore portatile bCube che mostra alcuni dei risultati ottenuti testando alcuni dei primer Olest (Benitez et al., 2005). Le cultivar mostrate sono: NB- Nocellara del Belice, K- Koroneiki, ABB- Abunara. I risultati dei CT value relativi all'analisi mostrata sono riportati in tabella 9

Tabella 9. Sono mostrati i CT value di una delle analisi effettuate utilizzando il bCube. Nella prima colonna è illustrato il numero del plate, nella seconda colonna l'identificativo assegnato e nella terza il risultato. In questa analisi sono stati testati i primer olest08, olest72 e olest30 rispetto all'house keeping olest34.

Well	Sample name	CT
A1	NEGATIVO OLEST 08	#N/A
A2	K T1 OLEST 08	26.74
A3	ABB T1OLEST 08	25.41
A4	NB T1 OLEST 08	29.17
B1	NEGATIVO OLEST 72	#N/A
B2	K T1 OLEST 72	#N/A
B3	ABB T1 OLEST 72	38.08
B4	NB T1 OLEST 72	38.97
C1	NEGATIVO OLEST 30	#N/A
C2	K T1 OLEST 30	26.9
C3	ABB T1 OLEST 30	32.63
C4	NB T1 OLEST 30	39.38
D1	NEGATIVO OLEST 34	#N/A
D2	K T1 OLEST 34	23.96
D3	ABB T1 OLEST 34	18.66
D4	NB T1 OLEST 34	34.08

Esperimenti di trascrittomici per individuare nuovi biomarkers di resilienza/suscettibilità

Analisi dei dati di sequenza dell'RNA

L'RNA-seq è stato utilizzato per valutare i cambiamenti trascrittomici dovuti all'infezione da *Spilocaea oleagina* nella cultivar di olivo a bassa suscettibilità Koroneiki e nella cultivar di olivo altamente suscettibile Nocellara del Belice. Sono state ottenute oltre 23-29 milioni di letture per i 12 campioni totali con una percentuale media di allineamento dell'83% in riferimento a *Olea europaea var. sylvestris*, scaricato da NCBI (Tabella 10). L'identificazione dei geni differenzialmente espressi (DEG) era basata sui criteri di p-value $\leq 0,01$ e frammenti per kilobase di esone per milione di frammenti mappati (FPKM) ≥ 1 almeno in un campione. In tutti e quattro i confronti sono stati ottenuti 14.974 DEG totali. Totale 3.801 geni sono stati significativamente regolati nel confronto Koroneiki T1 vs Koroneiki T3 DEGs, dove 2.043 geni sono stati up-regolati e 1.758 geni sono stati down-regolati, mentre è stato ottenuto un numero inferiore di DEG (1.698 DEG) nel confronto 'Nocellara del Belice T1 vs. Nocellara del Belice T3 DEG dove, 769 geni erano significativamente up-regolati e 929 geni down-regolati. I file fastq sono stati inviati a NCBI SRA nell'ambito del bioprogetto PRJNA929711.

Tabella 10. Informazioni di lettura grezze e informazioni di allineamento di tutti i campioni (NB: Nocellara del Belice,KT : Koroneiki,T1 : no signs of disease,T3 : evident presence of disease,R : Repliche

Sample	Total reads	Total pre-processed reads	Total aligned reads	Alignment%
NBT1R1	26.827.772	26.824.609	23.181.827	86,42%
NBT1R2	27.327.173	27.317.658	24.585.893	90,00%
NBT1R3	27.472.738	27.469.318	23.552.192	85,74%
NBT3R1	27.095.228	27.091.536	22.345.099	82,48%
NBT3R2	27.082.004	27.076.845	23.001.780	84,95%
NBT3R3	26.941.444	26.937.555	22.697.584	84,26%
KT1R1	23.445.217	23.439.202	20.284.285	86,54%
KT1R2	26.613.407	26.609.709	22.884.350	86,00%
KT1R3	29.798.545	29.792.915	24.349.749	81,73%
KT3R1	24.268.668	24.257.656	15.866.933	65,41%
KT3R2	29.336.895	29.318.665	25.952.882	88,52%
KT3R3	25.964.313	25.956.319	21.255.630	81,89%

Analisi RNA- Seq e identificazione dell'espressione genica differenziale in 'Koroneiki ' e 'Nocellara del Belice'

Sono stati prodotti diagrammi di dispersione usando il programma Volcano Plot per fornire una panoramica dei geni più interessanti espressi in modo differenziato (DEG) nei quattro confronti studiati: KT1 vs. KT3, NBT1 vs. NBT3, NBT1 vs. KT1, NBT3 vs. KT3. Il \log_2 (FC) (fold change) è stato tracciato sull'asse x e il \log_{10} negativo (p-value) è stato tracciato sull'asse y. I geni con $\log_2(\text{FC}) \leq 2$ dopo l'applicazione del cutoff del p-value ≤ 0.01 sono stati considerati significativi e sono stati evidenziati. I punti grigi non mostrano un'espressione genica differenziale significativa con il valore assoluto di \log_2 (FC). I punti verdi mostrano geni sotto-regolati mentre i punti rossi mostrano geni sopra-regolati con il valore assoluto di \log_2 (FC) (Fig. 23).

Complessivamente 1.620 geni risultano espressi in modo differenziato, come illustrato dal diagramma di Venn (KT1 vs. KT3; NBT1 vs. NBT3, NBT1 vs. KT1, NBT3 vs. KT3) utilizzando il valore p cutoff $\leq 0,01$ e assoluto \log_2 fold change ≥ 2 (Fig. 24).

L'analisi dell'arricchimento genico è stata eseguita per i geni sopra-regolati e geni sotto-regolati utilizzando DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov/sintesi.jsp>). L'analisi dell'arricchimento DAVID è stata completata per i confronti NBT1 vs. KT1, KT1 vs. KT3 e NBT1 vs. NBT3. È stato applicato un cut-off del valore p di $\leq 0,05$ per la selezione dei dati statisticamente significativi.

I geni differenzialmente espressi sono stati classificati utilizzando il software GO (Gene Ontology Consortium 2000). È stato stimato che le sovrarappresentazioni del termine GO nell'insieme di geni regolati in modo differenziato “*up*” e “*down*” mostrano quali processi biologici, funzioni molecolari e componenti cellulari, sono stati maggiormente interessati durante la fase di infezione.

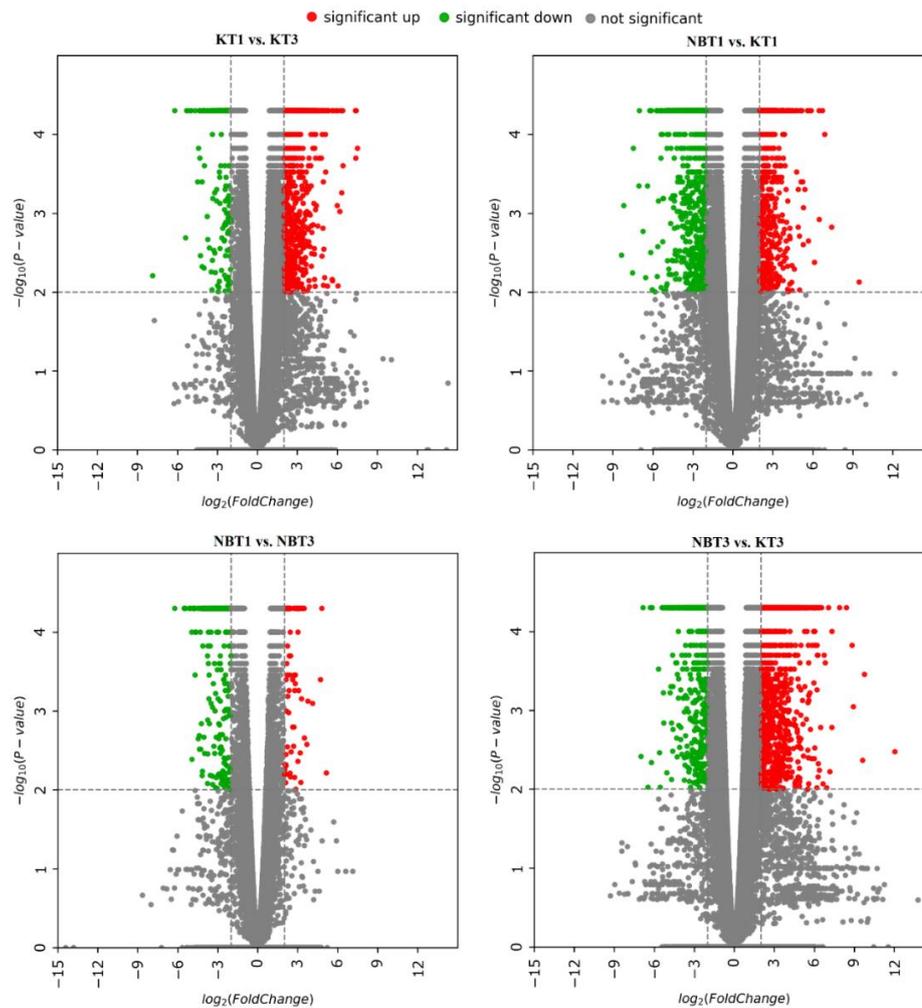


Figura 23. Il diagramma traccia i geni differenzialmente espressi per tutti e quattro i confronti a) KT1 vs. KT3 b) NBT1 vs. KT1 c) NBT1 vs. NBT3 e d) NBT3 vs. KT3. L'asse X mostra il fold change log2 nell'espressione genica tra diversi campioni e l'asse Y mostra il significato statistico delle differenze. I geni significativamente up e down-regolati sono stati filtrati ($\log_2(\text{Fold Change}) \geq 2$, $P \text{ value} \leq 0,01$) ed evidenziati rispettivamente in punti rossi e verdi, mentre i geni non significativi sono stati indicati da punti grigi.

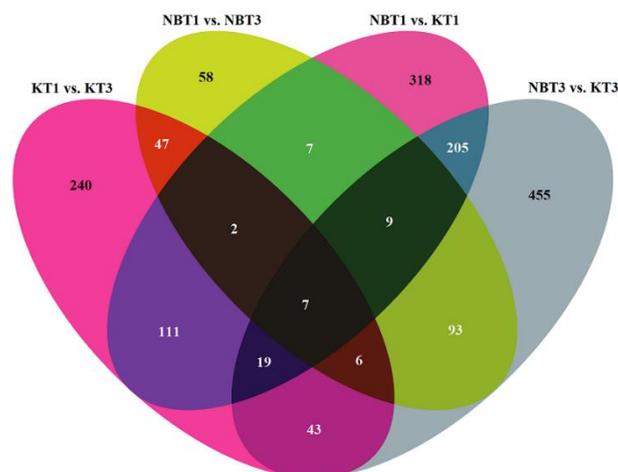


Figura 24. Diagramma di Venn che mostra il numero di geni specificamente e comunemente regolati in tutti e quattro i confronti a) KT1 rispetto a KT3 b) NBT1 rispetto a KT1 c) NBT1 rispetto a NBT3 e d) NBT3 rispetto a KT3. I geni sono stati selezionati applicando il filtro: $\log_2(\text{Fold change}) \geq 2$ e $p\text{-value} \leq 0.01$.

Geni differenzialmente espressi (DEG) in Koroneiki (stadio sano vs. stadio infetto)

Il software MapMan ha permesso di visualizzare accuratamente i DEG delle foglie infette di Koroneiki T2 e delle foglie sane T0 (figura 25 – tabella 11). Nelle foglie infette di Koroneiki i geni maggiormente espressi sono quelli correlati alla classe di segnalazione e risposta allo stress, alla segnalazione ormonale, alle modificazioni della cromatina, svariati geni di resistenza, alcuni dei quali specifici contro le infezioni fungine, fattori di trascrizione, metabolismo degli zuccheri e dei lipidi, comprese le vie dell'ubiquitina, le vie metaboliche secondarie, la biosintesi della polifenolossidasi (PPO) e vie biosintetiche correlate alla parete cellulare e alla biosintesi della lignina. Tra la classe di geni di segnalazione di stress vi sono molti geni che codificano i receptor-like protein kinase (RLKs), inclusi i geni relativi alla kinasi-like cysteine-rich receptor-like (LLR), i geni della calmodulina e delle acquaporine sono risultati sovra-espressi, come pure i geni di segnalazione mediata dai principali fitormoni (JA, Brassinosteroidi, Auxine, ABA, Gibberelline, Citochinine ed etilene). Tra i sensori della parete cellulare sono risultati sovraregolati i geni dell'estensina e i geni delle chinasi associate alla parete. Molti geni correlati alla patogenesi (Resistance Protein - PR) sono risultati sopra-espressi: 6-nsLTP (non-specific lipid-transfer), geni HD-ZIP, sette geni appartenenti probabilmente alle LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase genes, kinasi LRR-like receptor with extracellular Malectin-like Domain 1, il gene delle chinasi di resistenza alla ruggine Lr10-like, il gene RESISTENCE 6-like relativo alla resistenza alla peronospora, il gene di resistenza alla muffa MLO, glycine-rich protein (GRP), pathogenesis-related leaf protein 6-like, defensin Ec-AMP-D2-like, protein SAR DEFICIENT 1, Thaumatin-like proteins (TLPs), GDSL esterase lipase, geni MADS-box, proteine correlate alla patogenesi (STH-21-like, major allergen Pru ar 1-like), endochitinasi, la glucano endo-1,3-beta-glucosidasi e diverse proteinasi. Molti dei geni coinvolti nella biogenesi della parete cellulare, nel rimodellamento e nella difesa basata sulla parete cellulare, inclusa la sintesi della lignina, sono stati trovati anche sovraregolati: WAT1-related protein (At2g37460), lignans biosynthesis-secoisolariciresinol dehydrogenase-like, lysine-rich arabinogalactan protein 18-like, e proteine CASP-like. Diversi geni coinvolti nelle vie metaboliche dei ROS e dello stress ossidativo sono risultati sovraregolati (es. Ankyrin repeat-containing protein ITN1-like isoform X2). Tra i geni di segnalazione appartenenti alla classe dei fitormoni sono risultati sovra-espressi, in particolare: ethylene-responsive transcription factor TINY-like, salicylic acid-binding protein 2-like, inositol transporter 4, gibberellin-regulated protein 14-like, auxin-induced protein 22D-like, auxin response factor 5-like isoform X4, e i Carotenoid cleavage dioxygenases. I seguenti fattori di trascrizione potenzialmente coinvolti nelle risposte allo stress biotico sono risultati sovraespressi: WRKY31,

WRKY 43, WRKY 53, WRKY70, e i fattori di trascrizione relativi alla MYB family. I fattori di trascrizione (TF) maggiormente sottoregolati erano: RADIALIS-like, GATA transcription factor 21-like, bHLH18-like isoform X2, MYB8-like, ethylene-responsive transcription factor TINY-like, e protein BIC1-like.

Tra i geni di segnalazione regolati dai fitormoni sono risultati sovraregolati: ethylene-responsive transcription factor TINY-like, salicylic acid-binding protein 2-like, inositol transporter 4, gibberellin-regulated protein 14-like, auxin-induced protein 22D-like, auxin response factor 5-like isoform X4, e Carotenoid cleavage dioxygenases.

Tra la classe di analoghi del gene di resistenza o geni correlati alla patogenesi (PR): 6 geni nsLTP (proteina di trasferimento dei lipidi non specifica), geni HD-ZIP, sette probabili geni receptor-like serine/threonine-protein kinase LRR (ERL2, RBK2 , RESISTENTE ALL'INIBIZIONE DFPM DEL SEGNALE ABA 2 (At1g11330), CELLULOSE SYNTHASE LIKE D2 (At1g29720), At3g47570, LYSM RLK1-INTERACTING KINASE 1 (At3g14840), rust resistance kinase Lr10-like, DOWNY MILDEW RESISTANCE 6-like, glycine-rich protein (GRP), pathogenesis-related leaf protein 6-like, defensin Ec-AMP-D2-like, protein SAR DEFICIENT 1, Thaumatin-like proteins (TLPs)-related to the PR5 family, Ap2-ethylene-responsive transcription factor, GDSL esterase lipase, MADS-box genes, pathogenesis-related proteins (STH-21-like, major allergen Pru ar 1-like), endochitinases, glucan endo-1,3-beta-glucosidases, molte proteinasi (come metalloendoproteinasi 2-MMP-1, proteinasi aspartica CDR1-like) sono state trovate sovraregolate.

Molti geni coinvolti nella biosintesi, rimodellamento e difesa della parete cellulare, inclusa la sintesi della lignina, sono stati sovraregolati: WAT1 (At2g37460), lignans biosynthesis—secoisolariciresinol dehydrogenase-like, lysine-rich arabinogalactan protein 18-like, e il gene CASP-like.

I geni coinvolti nei ROS e nello stress ossidativo sono risultati sovraregolati (es. Ankyrin repeat-containing protein ITN1-like isoform X2).

Mentre i geni simili al recettore dell'acido abscissico PYL4 e alla citochinina deidrogenasi 7 erano sottoregolati.

Anche i DEG coinvolti nell'ubiquitinazione proteica sono risultati modulati: l'E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER e F-box/LRR-repeat MAX2 erano sovraespressi, mentre l'E3 ubiquitin-protein ligase RGLG5 era sotto-regolato.

Tabella 11. Lista dei geni differenzialmente espressi (DEG) in *Koroneiki* (stadio sano vs. stadio infetto).

GO Classification	GO Term	Regulation	Significant
Biological Process	response to water deprivation	Up-regulated	Yes
Biological Process	carbohydrate metabolic process	Up-regulated	Yes
Biological Process	defense response	Up-regulated	Yes
Biological Process	cuticle development	Up-regulated	Yes
Biological Process	fatty acid biosynthetic process	Up-regulated	Yes
Biological Process	syncytium formation	Up-regulated	Yes
Biological Process	defense response to Gram-negative bacterium	Up-regulated	Yes
Biological Process	wax biosynthetic process	Up-regulated	Yes
Biological Process	response to bacterium	Up-regulated	Yes
Biological Process	cellular response to oxygen-containing compound	Up-regulated	Yes
Biological Process	developmental growth	Up-regulated	Yes
Biological Process	plant-type cell wall loosening	Up-regulated	Yes
Biological Process	unidimensional cell growth	Up-regulated	Yes
Biological Process	negative regulation of cellular process	Up-regulated	Yes
Biological Process	positive regulation of flower development	Up-regulated	Yes
Biological Process	sterol biosynthetic process	Up-regulated	Yes
Biological Process	UDP-D-xylose biosynthetic process	Up-regulated	Yes
Biological Process	flavonoid biosynthetic process	Up-regulated	Yes
Biological Process	defense response to bacterium	Up-regulated	Yes
Biological Process	detection of calcium ion	Up-regulated	Yes
Cellular Component	nucleosome	Up-regulated	Yes
Cellular Component	plasma membrane	Up-regulated	Yes
Cellular Component	cell wall	Up-regulated	Yes
Cellular Component	extracellular region	Up-regulated	Yes
Cellular Component	plant-type cell wall	Up-regulated	Yes
Cellular Component	plasmodesma	Up-regulated	Yes
Cellular Component	plastid	Up-regulated	Yes
Cellular Component	peroxisome	Up-regulated	Yes
Cellular Component	nucleolus	Up-regulated	Yes
Cellular Component	vacuole	Up-regulated	Yes
Cellular Component	thylakoid	Up-regulated	Yes
Cellular Component	vacuolar membrane	Up-regulated	Yes
Cellular Component	cytosol	Up-regulated	Yes
Cellular Component	trans-Golgi network	Up-regulated	Yes
Cellular Component	endosome	Up-regulated	Yes
Cellular Component	membrane	Up-regulated	Yes
Cellular Component	apoplast	Up-regulated	Yes
Cellular Component	Golgi apparatus	Up-regulated	Yes
Cellular Component	integral component of membrane	Up-regulated	Yes

Molecular Function	protein heterodimerization activity	Up-regulated	Yes
Molecular Function	structural constituent of chromatin	Up-regulated	Yes
Molecular Function	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	Up-regulated	Yes
Molecular Function	NAD binding	Up-regulated	Yes
Molecular Function	3-oxo-lignoceronyl-CoA synthase activity	Up-regulated	Yes
Molecular Function	3-oxo-cerotoyl-CoA synthase activity	Up-regulated	Yes
Molecular Function	3-oxo-arachidoyl-CoA synthase activity	Up-regulated	Yes
Molecular Function	DNA binding	Up-regulated	Yes
Molecular Function	flavin adenine dinucleotide binding	Up-regulated	Yes
Molecular Function	calcium ion binding	Up-regulated	Yes
Biological Process	response to salt stress	Down-regulated	Yes
Biological Process	response to abscisic acid	Down-regulated	Yes
Biological Process	cellular response to hypoxia	Down-regulated	Yes
Biological Process	dephosphorylation	Down-regulated	Yes
Biological Process	phosphoenolpyruvate transport	Down-regulated	Yes
Biological Process	response to water deprivation	Down-regulated	Yes
Biological Process	phosphoglycerate transport	Down-regulated	Yes
Biological Process	cellular phosphate ion homeostasis	Down-regulated	Yes
Cellular Component	cell wall	Down-regulated	Yes
Cellular Component	apoplast	Down-regulated	Yes
Cellular Component	chloroplast membrane	Down-regulated	Yes
Cellular Component	extracellular region	Down-regulated	Yes
Cellular Component	plasmodesma	Down-regulated	Yes
Cellular Component	cytoplasm	Down-regulated	Yes
Cellular Component	plasma membrane	Down-regulated	Yes
Cellular Component	vacuole	Down-regulated	Yes
Cellular Component	cytosol	Down-regulated	Yes
Cellular Component	plant-type cell wall	Down-regulated	Yes
Cellular Component	plant-type vacuole membrane	Down-regulated	Yes
Molecular Function	phosphoenolpyruvate:phosphate antiporter activity	Down-regulated	Yes
Molecular Function	phosphoglycerate transmembrane transporter activity	Down-regulated	Yes
Molecular Function	beta-amylase activity	Down-regulated	Yes
Molecular Function	phosphatase activity	Down-regulated	Yes
Molecular Function	trehalose-phosphatase activity	Down-regulated	Yes
Molecular Function	sucrose alpha-glucosidase activity	Down-regulated	Yes

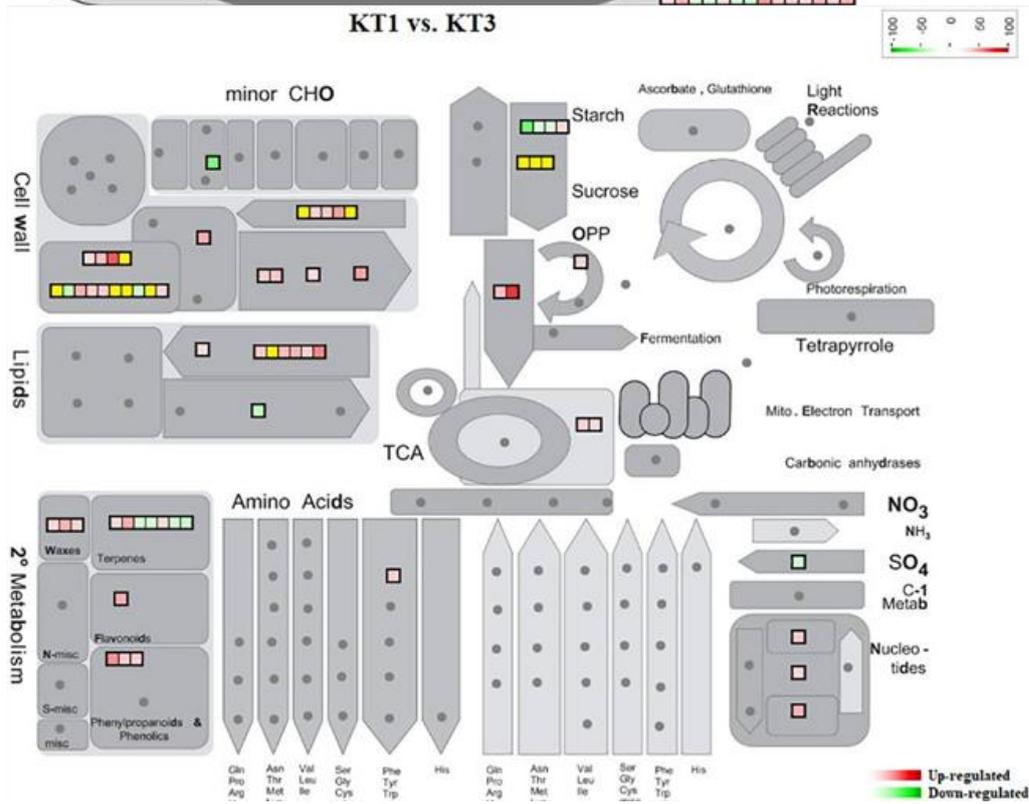
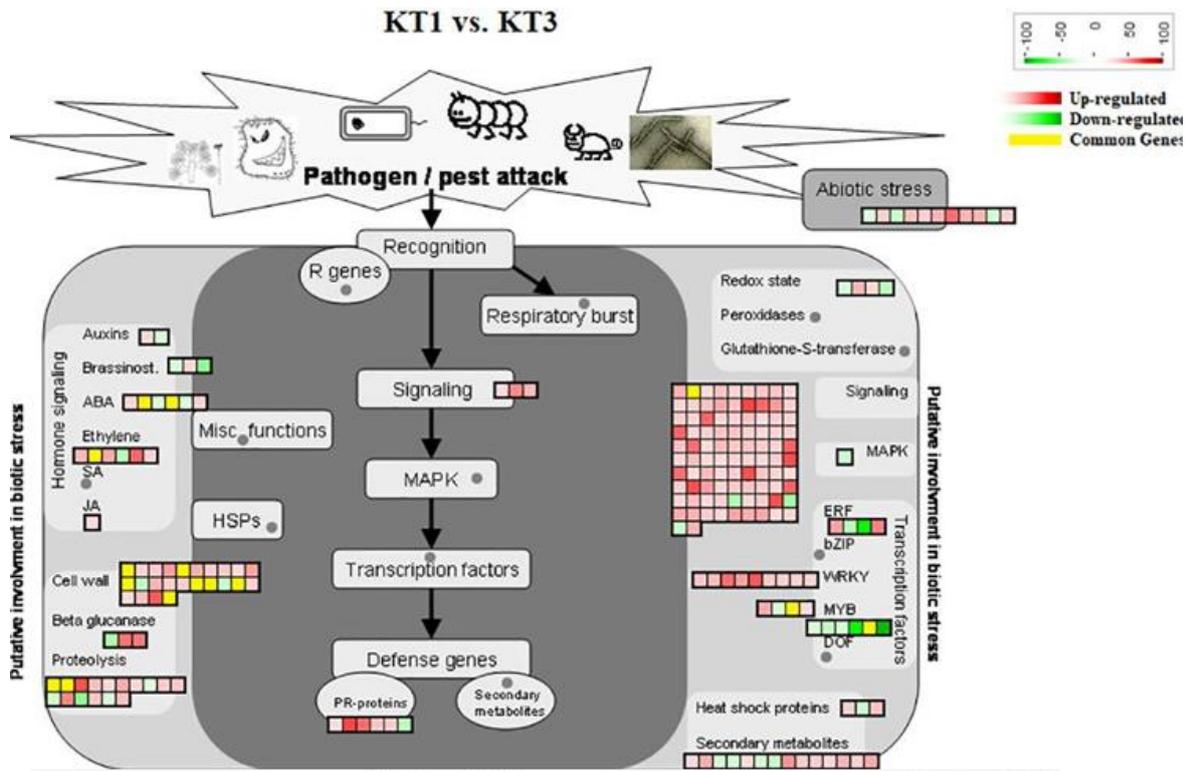


Figura 25. Geni differenzialmente in 'Koroneiki' allo stadio T1 vs. T3 sottoposti allo stress biotico da infezione a *Spilotea oleagina*. Il gradiente rosso mostra i geni sovraregolati e il gradiente verde rappresenta i geni sottoregolati. I geni modulati sia in 'Koroneiki' che in 'Nocellara del Belice' sono evidenziati in giallo. Stress biotico ambientale putativo(a); vie metaboliche secondarie(b).

Geni differenzialmente espressi (DEG) in Nocellara del Belice (stadio sano vs. stadio infetto)

Il medesimo software è stato utilizzato per evidenziare i geni DEG in foglie sane e infette di Nocellara del Belice (figura 26 – tabella 12). Nelle foglie infette i geni sovra-espressi sono stati individuati geni di risposta allo stress biotico/abiotico, geni produzione di fitoalessine e terpeni e i geni relativi alla difesa basata sulla parete cellulare sono risultati modulati nei soggetti sani (T1) e infetti (T3): exocyst complex component EXO70H1-like, disease resistance response protein 206-like, DMR6-LIKE OXYGENASE 2-like, DOWNY MILDEW RESISTANCE 6-like, serine-type protease inhibitors (proteinase inhibitor PSI-1.2-like), premnaspirodione oxygenase-like, vetispiradiene synthase 2-like isoforma X2, shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase correlata alla via di biosintesi dei fenilpropanoidi, pinoresinol-lariciresinol reductase-like, shikimate O-hydroxy-cinnamoyltrasferase, jasmonoato e Omethyltransferase-like sono stati trovati up-regolati. Oltre a due segnali di trasmissione, il gene dell'anidrasi alfa-carbonica 1 e la LRR receptor-like serine/ threonine-protein kinase GSO1, e il transcriptional factor MYB8-like TF. Anche alcuni geni di segnalazione mediati dai principali fitormoni legati alla difesa (SA, gibberelline, etilene) erano sovra-regolati. Mentre i geni correlati all'ABA e all'auxina sono risultati sottoregolati. Tra i geni sotto-regolati c'erano: la protein Epidermal Patterning Factor 2-like, GDSL esterase/lipase, chitinaselike protein 1, heavy metal-associated isoprenylated plant protein 24-like, a receptor-like serine/threonine-protein kinase (At5g57670), receptor protein kinase TMK1-like, CBL-interacting protein kinase 2-like, BAHD acyltransferase DCR-like (gene coinvolto nella formazione della cuticola), trasportatore dicarbossilato del tonoplasto (coinvolto nella regolazione del pH e dell'omeostasi), il gene ECERIFERUM 1, coinvolto nella biosintesi della cera e degli alcani, le protein NRT1/PTR family 2.11-like, codeine O-demethylase-like, cation/H(+) antiporter 20 isoform X1, plasma membrane ATPase 4-like, asparagine synthetase, carboxylesterase 8, e galactinol synthase 2-like; e tra i TF due erano sotto-regolati: transcription factors NAC domain-containing protein 72-like and bHLH149.

Tabella 12. Lista dei geni differenzialmente espressi (DEG) in *Nocellara del Belice* (stadio sano vs. stadio infetto).

GO Classification	GO Term	Regulation	Significant
Biological Process	response to water deprivation	Down-regulated	Yes
Biological Process	response to abscisic acid	Down-regulated	Yes
Biological Process	response to light stimulus	Down-regulated	Yes
Biological Process	microtubule-based process	Down-regulated	Yes
Biological Process	seed coat development	Down-regulated	Yes
Biological Process	plant epidermis morphogenesis	Down-regulated	Yes
Biological Process	galacturonate biosynthetic process	Down-regulated	Yes
Biological Process	hyperosmotic salinity response	Down-regulated	Yes
Biological Process	microtubule cytoskeleton organization	Down-regulated	Yes
Biological Process	carbohydrate metabolic process	Down-regulated	Yes
Biological Process	response to cold	Down-regulated	Yes
Biological Process	carboxylic acid metabolic process	Down-regulated	Yes
Biological Process	cell differentiation	Down-regulated	Yes
Cellular Component	plant-type vacuole	Down-regulated	Yes
Cellular Component	Golgi apparatus	Down-regulated	Yes
Cellular Component	plant-type cell wall	Down-regulated	Yes
Cellular Component	vacuolar membrane	Down-regulated	Yes
Cellular Component	apoplast	Down-regulated	Yes
Cellular Component	cytoplasm	Down-regulated	Yes
Cellular Component	vacuole	Down-regulated	Yes
Cellular Component	cell wall	Down-regulated	Yes
Cellular Component	tubulin complex	Down-regulated	Yes
Cellular Component	plant-type vacuole membrane	Down-regulated	Yes
Cellular Component	endosome	Down-regulated	Yes
Molecular Function	UDP-glucuronate 4-epimerase activity	Down-regulated	Yes
Molecular Function	sucrose alpha-glucosidase activity	Down-regulated	Yes
Molecular Function	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	Down-regulated	Yes

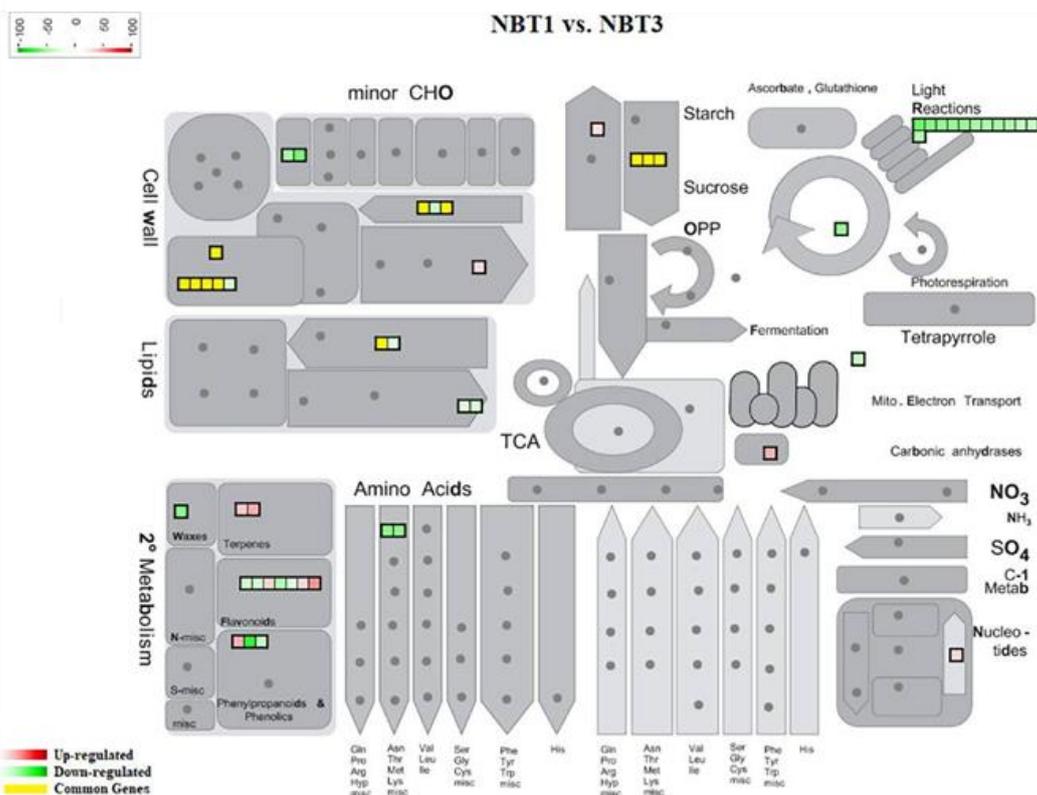
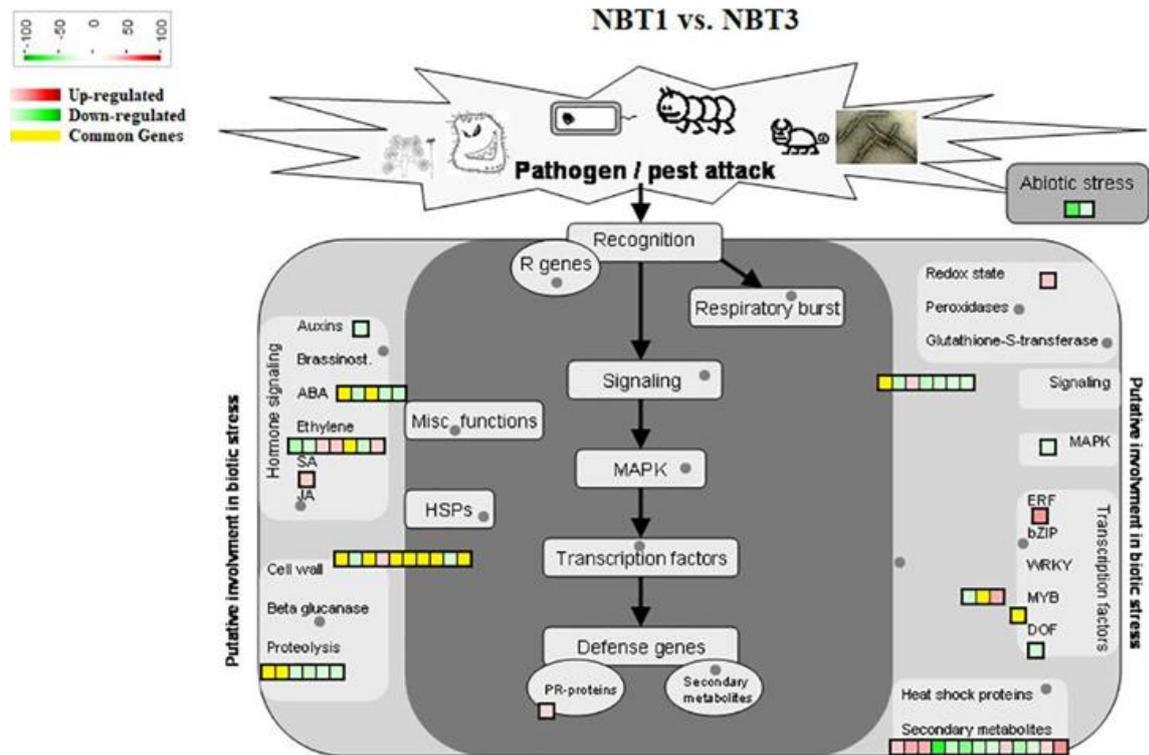


Figura 26. Geni differenzialmente in 'Nocellara del Belice' allo stadio T1 vs. T3 sottoposti allo stress biotico da *Spilotea oleagina*. Il gradiente rosso mostra i geni sovraregolati e il gradiente verde rappresenta i geni sottoregolati. I geni comuni in 'Koroneiki' e in 'Nocellara del Belice' sono evidenziati in giallo. Stress biotico ambientale putativo(a); vie metaboliche secondarie (b).

Koroneiki T3 vs. Nocellara T3 DEG

Non sono stati trovati molti geni in comune tra le cultivar Koroneiki T3 infetta e Nocellara del Belice infetta T3. I geni espressi in comune da entrambe le cultivar sono rappresentati dalle figure 27 e 28. Nella figura 27 è mostrata attraverso una mappa del calore l'espressione di 61 geni comuni e presenti in tutti e quattro i confronti; KT1 su KT3, NBT1 su KT1, NBT1 su NBT3 e NBT3 su KT3. I geni sono stati raggruppati gerarchicamente in base a una matrice di correlazione di Pearson utilizzando dati FPKM e collegamento medio. Nella figura 28 viene mostrato un modello che descrive i fattori di trascrizione che regolano le vie di segnalazione dello stress biotico. Inoltre, è nella tabella 13 sono elencati i geni DE comuni e la loro regolazione.

Le differenze significative hanno riguardato i geni unicamente espressi, in particolare in Koroneiki. In Koroneiki la sovra-regolazione dei geni di segnalazione mediata dai principali ormoni correlati alla difesa (JA, Brassinosteroidi, Auxine, ABA, Gibberelline, Cytocinine e etilene) sono stati significativamente indotti, così come molti Pathogenesis-Related (PR) Proteine (non-specific lipid-transfer proteins, HD-ZIP genes, LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase genes, and LRR receptor-like kinase con extracellular Malectin-like Domain 1), alcune delle quali di solito specificamente coinvolte nella difesa contro i funghi come funghi-rust resistance kinase Lr10-like, glycine-rich protein (GRP), pathogenesis-related leaf protein 6-like, defensin Ec-AMP-D2-like, protein SAR DEFICIENT 1, Thaumatin-like proteins (TLPs), GDSL esterase lipase, pathogenesis-related proteins (STH-21-like, major allergen Pru ar 1-like), Glucan 1,3 Beta Glucosidase, e endochitinases. Geni coinvolti nella modellazione della parete cellulare e la lignans biosynthesis-secoisolariciresinol dehydrogenase-like, lysine-rich arabinogalactan protein 18-like, Casparian strip membrane domain (CASP)-like protein, che può svolgere un ruolo fondamentale nel conferire tolleranza allo stress biotico e abiotico. Inoltre, sono stati trovati sovra-regolati geni coinvolti nella biosintesi di metaboliti secondari, attraverso la biosintesi di terpeni e flavonoidi (es. il gene BAHD aciltransferasi coinvolto nella produzione di metaboliti secondari fenolici). Nelle foglie infette di Nocellara del Belice pochi geni coinvolti nella risposta allo stress biotico/abiotico erano sovra-regolati (exocyst complex component EXO70H1-like, disease resistance response protein 206-like, DMR6-LIKE OXYGENASE 2-like, DOWNY MILDEW RESISTANCE 6-like, serine-type protease inhibitors, as well as two transmitting signals; alpha carbonic anhydrase 1 gene e LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1), come pure alcuni geni correlati alla via di biosintesi dei fenilpropanoidi, premnaspirdiene oxygenase-like, vetispiradiene synthase 2-like isoform X2, shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase correlati alla biosintesi del

phenylpropanoid, bifunctional pinoresinol-lariciresinol reductase-like, shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase, e il jasmonate O-methyltransferase-like.

Ponendo l'attenzione su alcuni geni di resistenza espressi condivisi sia da Nocellara del Belice che da Koroneiki, i risultati ottenuti dalla trascrittomica si pongono in linea con diversi omologhi discussi in letteratura. Infatti, negli ultimi decenni, un certo numero di geni di resistenza alle malattie sono stati isolati da specie vegetali modello come *Arabidopsis thaliana* e riso o da piante coltivate diploidi come pomodoro e orzo (Dangl and Jones, 2001; Hulbert et al., 2001). I DEG LOC111384845, LOC111370659, LOC111380489, LOC111412187, LOC111367450, LOC111382403 si sono dimostrati essere attivi nella risposta biotica fungina (Bhuiyan et al., 2007; Giraldo-González et al., 2021; Masoodi et al., 2022; Misra et al., 2016; Saintenac et al., 2018; Zeilmaker et al., 2015). Mentre, alcuni tra i DEG selezionati come LOC111401947, LOC111401949, LOC111408132, LOC111410971, LOC111410972, LOC111381484, LOC111371498 sono in letteratura correlati a una risposta a stress biotici e abiotici, nonostante questo, sono importati da valutare poiché l'interazione ospite-patogeno genera anche risposte aspecifiche attivando più vie metaboliche dello stress che possono coinvolgere più pathway (Nagashima et al., 2022; Yang et al., 2018, 2019; Zhang et al., 2021).

Inoltre, tra Koroneiki T3 e Nocellara del Belice T3 anche la sovra-regolazione dei fattori di trascrizione ha mostrato molte differenze. In Koroneiki Ap2-etilene-responsiv, geni MADS-box, WRKY6-like, WRKY31, WRKY 43, WRKY 53, WRKY70, JUNGBRUNNEN 1-like, i fattori di trascrizione della famiglia MYB (MYB3R-1-like, PHL11, TF PIF3-like) erano sovra-regolati, mentre in Nocellara del Belice solo MYB8-like era sovra-regolato, che invece era sottoespresso in Koroneiki.

Tabella 13. Geni DE comuni sia in *Koroneiki* che in *Nocellara del Belice*.

Gene	NB	K	Protein Products
	Reg	Reg	
LOC111407221	Down	Up	aquaporin NIP1-1-like isoform X1; aquaporin NIP1-1-like isoform X1; aquaporin NIP1-1-like isoform X1; aquaporin NIP1-1-like isoform X2
LOC111399065	Down	Up	pectinesterase
LOC111407274	Down	Up	potassium channel KAT3-like
LOC111375553	Down	Up	auxin-induced protein 22E-like
LOC111412391	Down	Up	pectinesterase inhibitor 6
LOC111376905	Down	Up	serine/threonine-protein kinase HT1-like
LOC111379094	Down	Up	tubulin alpha chain-like
LOC111394677	Down	Up	WAT1-related protein At1g68170-like isoform X1; WAT1-related protein At1g68170-like isoform X2
LOC111381869	Down	Up	serine/threonine-protein kinase CTR1-like isoform X1, X2, X3
LOC111367400	Down	Up	CASP-like protein 1E2
LOC111388105	Down	Up	3-ketoacyl-CoA synthase 10
LOC111389230	Down	Up	caffeoylshikimate esterase-like
LOC111394816	Down	Up	pollen allergen Che a 1-like
LOC111373101	Down	Up	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 1-like isoform X1, X2
LOC111392851	Down	Up	guard cell S-type anion channel SLAC1
LOC111367843	Down	Up	sodium/hydrogen exchanger 2-like
LOC111387687	Down	Up	tubulin alpha chain
LOC111371758	Down	Up	UDP-glucose 6-dehydrogenase 3-like
LOC111404972	Down	Up	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 21-like
LOC111395345	Down	Up	E3 ubiquitin-protein ligase RHA2A-like
LOC111396339	Down	Up	molybdate-anion transporter-like
LOC111399691	Down	Up	probable protein phosphatase 2C 25; probable protein phosphatase 2C 25; probable protein phosphatase 2C 25
LOC111372878	Down	Up	probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710
LOC111398898	Down	Up	homeobox-leucine zipper protein ATHB-54-like
LOC111387110	Down	Up	ABC transporter G family member 15-like
LOC111406934	Down	Up	HVA22-like protein e
LOC111393358	Down	Up	transcription factor FAMA-like isoform X2; transcription factor FAMA-like isoform X1; transcription factor FAMA-like isoform X3
LOC111378339	Down	Up	MADS-box protein 04g005320-like isoform X1; MADS-box protein 04g005320-like isoform X2; MADS-box protein 04g005320-like isoform X3
LOC111380606	Down	Up	proline-rich protein 4-like isoform X2; repetitive proline-rich cell wall protein 2-like isoform X1
LOC111384811	Down	Up	probable glycerol-3-phosphate dehydrogenase; probable glycerol-3-phosphate dehydrogenase
LOC111412180	Down	Up	probable fatty acyl-CoA reductase 4 isoform X1; probable fatty acyl-CoA reductase 4 isoform X2
LOC111402401	Down	Up	heavy metal-associated isoprenylated plant protein 6-like
LOC111374154	Down	Up	polyphenol oxidase, chloroplastic-like
LOC111371578	Down	Up	transcription factor FAMA-like

LOC111408762	Down	Up	cellulose synthase A catalytic subunit 2
LOC111404046	Down	Up	UDP-glycosyltransferase 88B1-like
LOC111367469	Down	Up	GDSL esterase/lipase LTL1-like
LOC111412183	Down	Up	probable fatty acyl-CoA reductase 4 isoform X1; probable fatty acyl-CoA reductase 4 isoform X2
LOC111408989	Down	Up	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 7
LOC111409465	Down	Up	serine/threonine-protein kinase CTR1-like
LOC111386858	Down	Up	WRKY transcription factor 22-like
LOC111403119	Down	Up	S-adenosylmethionine synthase 3-like; S-adenosylmethionine synthase 3-like

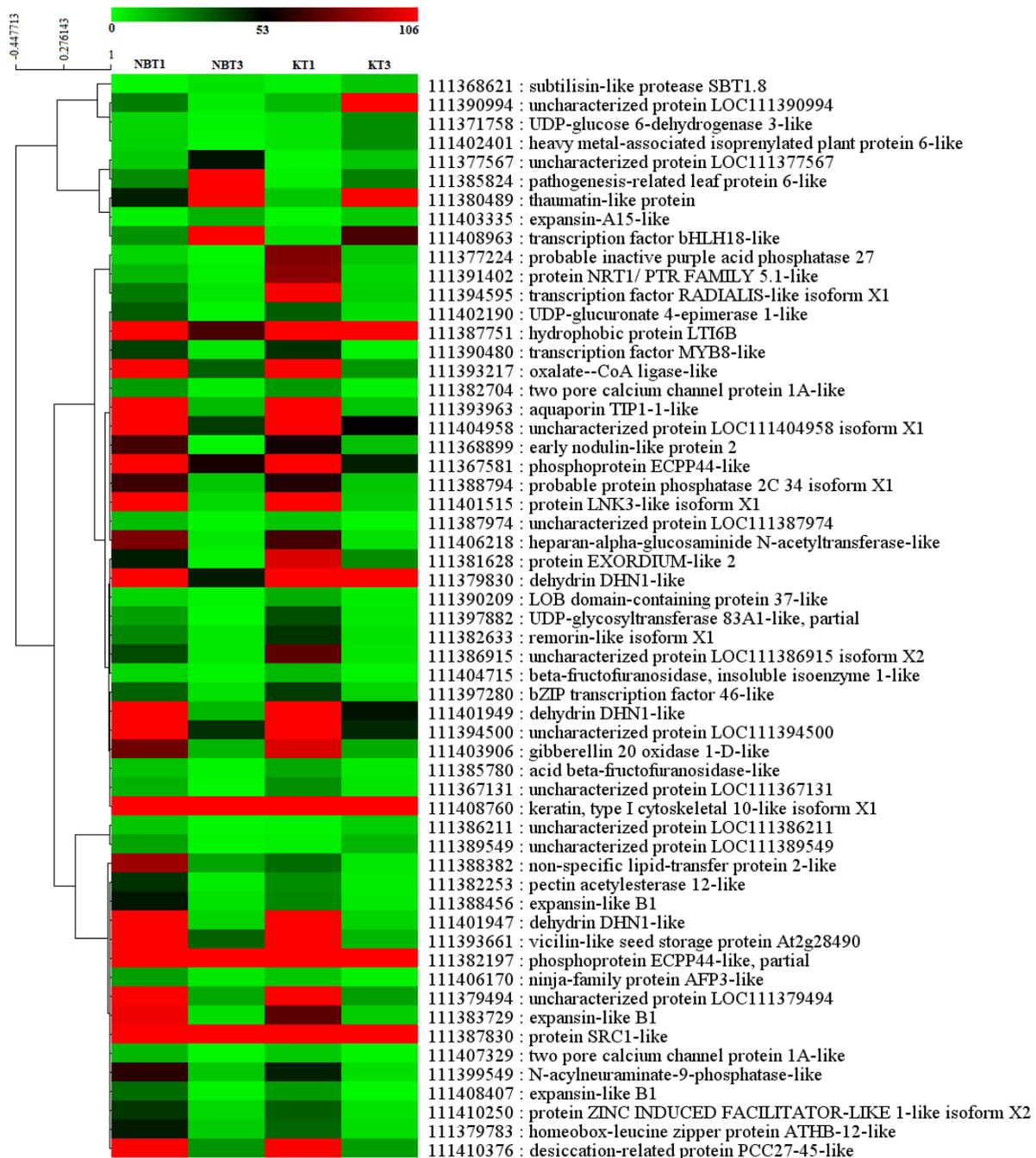


Figura 27. Heatmap grafico che mostra l'espressione di 61 geni comuni presenti in tutti e quattro i confronti; KT1 contro KT3, NBT1 contro KT1, NBT1 contro NBT3 e NBT3 contro KT3. I geni sono stati raggruppati gerarchicamente in base a una matrice di correlazione di Pearson utilizzando dati FPKM e collegamento medio.

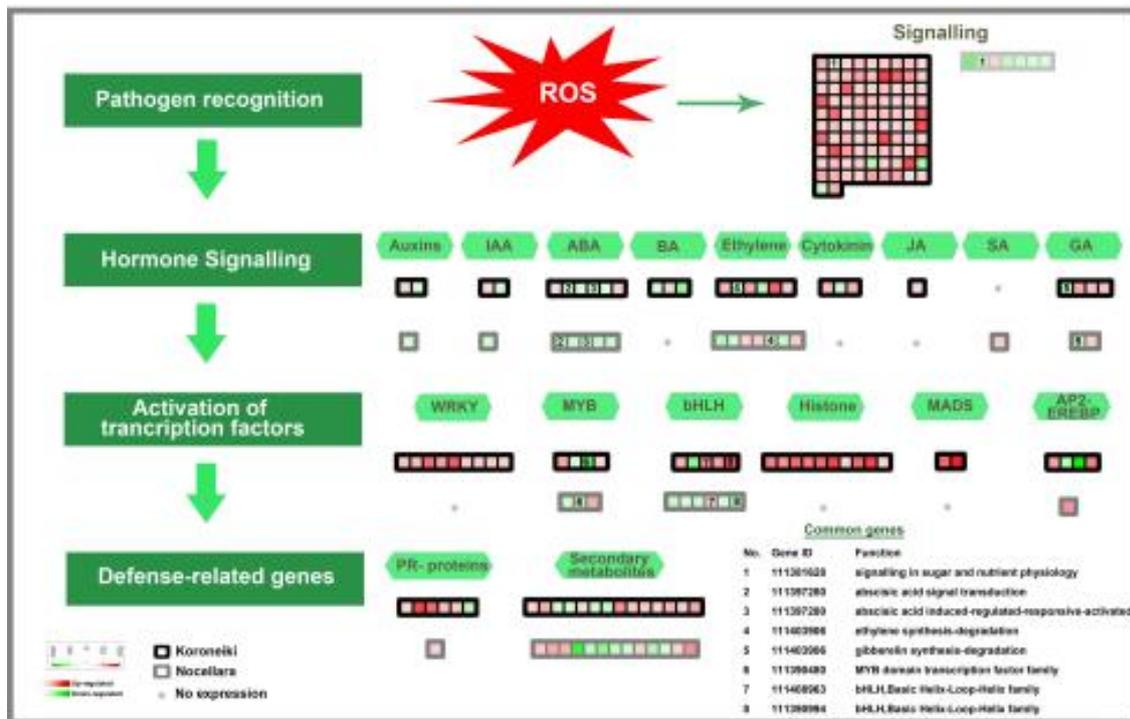


Figura 28. La figura rappresenta le differenze chiave nell'espressione genica tra 'Koroneiki' infetta T3 e 'Nocellara del Belice' T3. I geni regolati in 'Koroneiki' sono evidenziati da box neri, mentre i geni di 'Nocellara del Belice' da box grigi. È evidente la diversa tipologia di fattori di trascrizione nella regolazione della segnalazione dello stress, che poi innescano una diversa risposta di difesa down-stream. Il gradiente rosso mostra i geni sovraregolati e il gradiente verde rappresenta i geni sottoregolati. La lista di alcuni geni comuni numerati è fornita.

Individuazione e validazione dei primer disegnati sui DEG candidati a possibili biomarcatori

Koroneiki e Nocellara del Belice a livello trascrittomico hanno mostrato notevoli differenze nei meccanismi di difesa. Sono stati disegnati primer specifici di putativi biomarcatori di resilienza/suscettibilità per le cultivar per poterne validare l'efficienza in metodica RT-PCR utilizzando come strumento termociclature il bCube. Quindi, sono stati selezionati 15 geni DE ritenuti più significativi e disegnati i relativi primer (tabella 14). Per il disegno dei primer specifici RT-PCR è stato usato il programma online 'Primer 3' e per il disegno dei primer specifici per RT-LAMP è stato usato il software online 'Primer Explorer', un designer gratuito basato sul Web offerto da Eiken (<https://primerexplorer.jp/e/>). È stato mantenuto come gene di riferimento 'housekeeping' l'olest34 in entrambe le metodiche (Benitez *et al.*, 2005). Dunque si è scelto di testare i geni DE espressi unicamente in Koroneiki e geni DE comuni ad entrambe le cultivar al fine di individuare risposte che potrebbero risultare comuni a più cultivar e che siano indice precoce della malattia. Tutte le analisi sono state condotte in triplo. Inoltre, per ogni primer sono stati delineati i profili delle curve di melting in modo da confermare l'assoluta specificità del

dell'amplicone (Fig. 29). Successivamente a questo step, le analisi di trascrittomiche ci hanno permesso, inoltre, di mettere in evidenza le forti differenze nella risposta allo stress biotico che vi sono tra Koroneiki e Nocellara del Belice (Figure 25, 26, e 27).

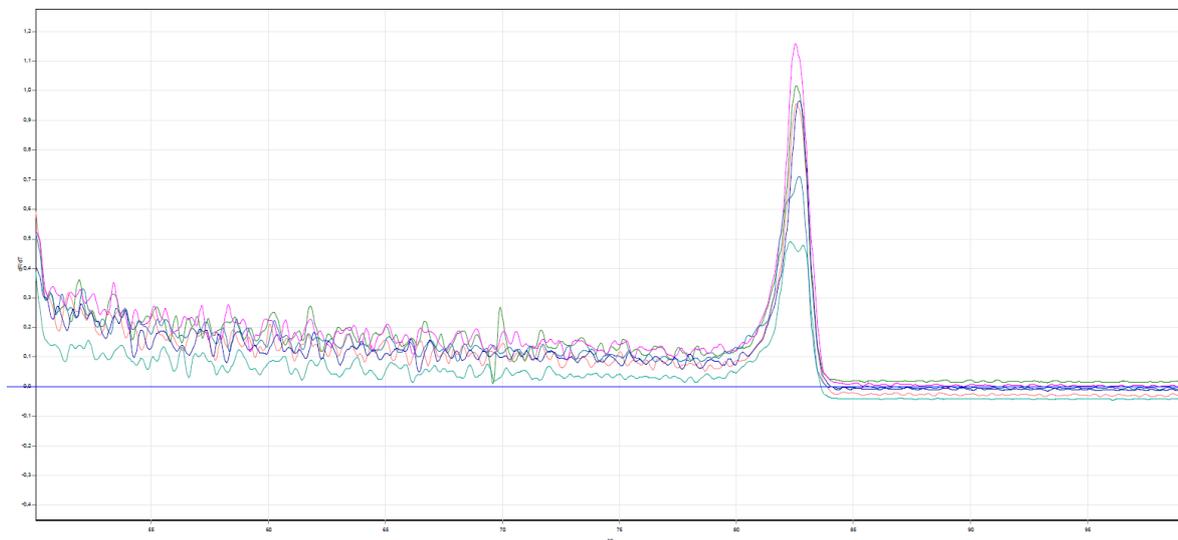


Figura 29. Curve di melting ottenute dall'amplificazione del primer disegnato su *LOC111384845* relative ai campioni *KT1*, *KT3*, *NBT1*, *NBT3*.

Tabella 14. Geni selezionati per essere testati come biomarcatori

Name	Description Primer	Gene ID	NCBI Accession
LOC111367450	Rust resistance kinase Lr10-like	111367450	NC_036254.1
LOC111401947	dehydrin DHN1-like	111401947	XM_023029935.1
LOC111401949	dehydrin DHN1-like	111401949	XM_023029936.1
LOC111408132	bifunctional pinoreosinol-lariciresinol reductase-like	111408132	XM_023037935.1
LOC111410971	protein RADIALIS-like 2	111410971	XM_023041558.1
LOC111410972	protein RADIALIS-like 2	111410972	XM_023041559.1
LOC111370659	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like	111370659	XM_022992479.1
LOC111385280	MLO-like protein 6	111385280	XM_023009661.1
LOC111384845	protein DOWNY MILDEW RESISTANCE 6-like	111384845	XM_023009174.1
LOC111380489	thaumatin-like protein	111380489	XM_023004071.1

LOC111396110	receptor-like protein 12	111396110	XM_023022401.1
LOC111412187	putative wall-associated receptor kinase-like 16	111412187	XM_023043035.1
LOC111381484	cold-regulated 413 plasma membrane protein 2-like	111381484	XM_023005269.1
LOC111382403	exocyst complex component EXO70H1-like	111382403	XM_023006370.1
LOC111371498	ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like	111371498	XM_022993525.1

I risultati ottenuti sono stati molto significativi e concordi all'esperimento di trascrittomico (tabella 15). Le analisi di PCR in tempo reale sono servite a determinare per i relativi livelli di espressione. I geni LOC111412187, LOC111381484 hanno mostrato espressione significativamente indotta (>10 volte) in Koroneiki e comunque positiva in Nocellara del Belice; i geni LOC111410971 e LOC111410972 sono risultati negativamente espressi; i geni LOC111401949, LOC111408132, LOC111370659, LOC111385280, LOC111384845, LOC111380489 hanno mostrato espressione significativa in Koroneiki; e il gene LOC111382403 in Nocellara del Belice. L'amplificazione dei geni LOC111367450 e LOC111396110 non ha portato alcun risultato. Per la diagnostica di precisione i geni che hanno mostrato le migliori performance (Fig. 31) sono: LOC111408132 (Bifunctional pinoresinol-lariciresinol reductase-like gene), LOC111384845 (DOWNY MILDEW RESISTANCE 6 gene), LOC111401947 (Dehydrin DHN1-like) (mostrato in figura 30), LOC111380489 (Thaumatococcus-like), LOC11141097 1 (RADIALIS-like 2) e LOC111385280 (MLO-like protein 6).

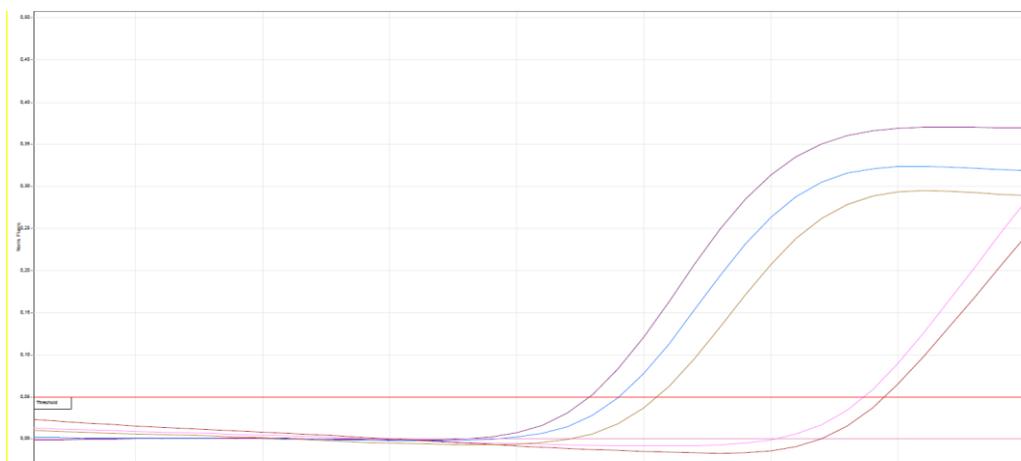


Figura 30. Curve RT-PCR del set di primer LOC111401947 su Nocellara del Belice e Koroneiki (stadi 0,1 e 2).

Tabella 15. Quantificazione relativa dell'espressione genica dei putativi geni di resilienza scelti per la validazione RT-PCR; NB: Nocellara del Belice; K: Koroneiki; N: nessun risultato apprezzabile; Il simbolo (+) indica una risposta maggiormente indotta (>10 volte); Il simbolo (-) indica una repressione dell'espressione genica.

Gene Id	Gene Regulation		RT- PCR 2 Δ CT	
	NB	K	NB	K
111367450	Up	Up	N	N
111401947	Down	Down	+	+
111401949	Down	Down	N	+
111408132	Up	Up	N	+
111410971	Down	Down	-	-
111410972	Down	Down	-	-
111370659	Up	Up	-	+
111385280	Up	Up	N	+
111384845	Down	Down	-	+
111380489	Up	Up	-	+
111396110	Up	Up	N	N
111412187	Up	Up	+	+++
111381484	Down	Down	+	+++
111382403	Up	Up	+	N

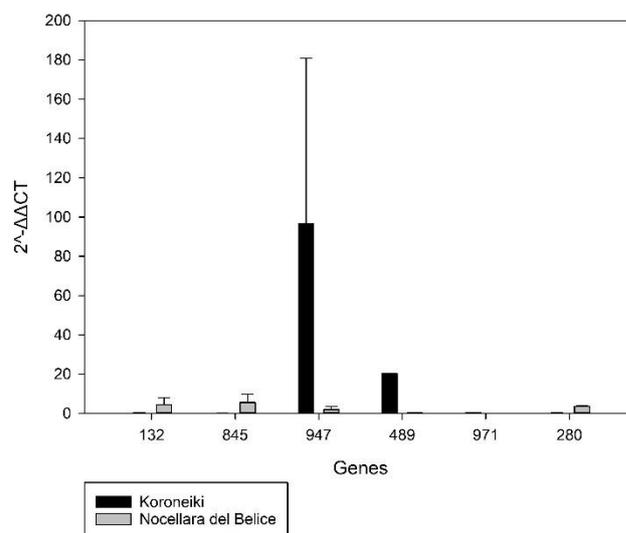


Figura 31. Validazione qRT-PCR di sei geni migliori espressi in modo differenziale (LOC111408132 (gene bifunzionale simile alla pinoresinol-laricresinolo reductasi), LOC111384845 (gene della RESISTENZA ALLA peronospora 6), LOC111401947 (simile alla deidrina DHN1), LOC111380489 (simile alla taumatina), LOC11141097 1 (RADIALE- come 2) e LOC111385280 (proteina simile a MLO 6)).

Discussione

Allo scopo di studiare i meccanismi che regolano la resistenza/suscettibilità al patogeno *Spilocaea oleagina* e di individuare geni e marcatori di stress per sviluppare metodiche di diagnostica in campo è stato impiegato un approccio integrato che ha previsto analisi chimiche (polifenoli) e molecolari di cultivar di olivo divergenti per la resistenza al patogeno.

In genere, le cultivar di olivo che mostrano livelli di resistenza/resilienza ai patogeni, incluso *Spilocaea oleagina*, presentano come segno di risposta all'infezione un aumento del contenuto di polifenoli e in particolare di derivati dell'oleuropeina, acidi idrossicinnamici e flavonoli (Rahioui et al., 2009; Rahioui et al., 2013; Aabidine et al., 2010). La composizione fenolica delle matrici di olivo è estremamente complessa, le sostanze polifenoliche sono distribuite in tutte le parti della pianta (Soler-Rivas et al., 2000), ma cambiano in quantità e varietà in dipendenza del tessuto di provenienza (Bendini et al., 2007). In questo studio l'elevata presenza di polifenoli totali a livello fogliare riscontrata nella cultivar suscettibile Nocellara del Belice indica che il loro contenuto non determina un fattore di resistenza all'occhio di pavone. In letteratura è stata testata l'attività antimicrobica in vitro dei polifenoli dell'olivo, tuttavia, essendo una matrice estremamente complessa e mutevole non vi sono pareri concordanti in merito. Rahioui et al., (2009) ha individuato nell'estratto fenolico dell'olivo dieci composti maggiormente presenti: rutina, luteolina-7-glucoside, oleuropeina, verbascoside, tirosolo, apigenina e altri quattro composti fenolici non completamente identificati (derivato dell'oleuropeina, derivato idrossicinnamico e due monoglucosidi flavonolici). L'oleuropeina aglicone ha distinto nettamente le cultivar resistenti da quelle suscettibili e mediamente resistenti. Le cultivar resistenti ne contengono quantità più elevate. Mentre, un derivato del tirosolo ha distinto le cultivar suscettibili dalla cultivar mediamente resistenti. Il nostro risultato concorda con una ricerca più recente di Ilias et al., (2017) che ha dimostrato che i polifenoli totali presenti in foglie di olivo infettati da *Spilocaea* sono più elevati rispetto alle foglie di campioni non infetti. In un altro studio (Lanza et al., 2017) viene indicato che non c'è nessun aumento significativo dell'attività complessiva della polifenolossidasi, enzima coinvolto nell'attivazione di alcune molecole fenoliche nelle foglie infette; al contrario, l'attività enzimatica viene gradualmente persa con il progredire dell'infezione, probabilmente a causa della degradazione dei plastidi all'interno delle cellule del mesofillo, in cui tali enzimi sono normalmente confinati. L'attivazione della polifenolossidasi sembrerebbe essere solo localizzata nel punto di infezione di cellule epidermiche superiori della foglia, indicando una debole risposta della pianta, probabilmente localizzata e non sistemica (Balint-Kurti, 2019), ciò ha trovato conferma anche nell'analisi del trascrittoma.

L'analisi RNAseq è stata molto più esaustiva ed ha consentito di identificare geni di resistenza/resilienza e potenziali biomarcatori da usare per la diagnostica precoce con termociclatori portatili di ultima generazione (bQube).

Non sono stati trovati molti geni in comune tra la cultivar Koroneiki allo stadio infetto T3 e la cultivar Nocellara del Belice infetta T3 (Fig. 26), che si sono contraddistinte invece per l'unicità dei geni espressi. In Koroneiki la sovra-regolazione dei geni di segnalazione mediata dai principali fitormoni correlati alla difesa (JA, Brassinosteroidi, Auxine, ABA, Gibberelline, Citochine ed Etilene) è stata evidente, così come la sovra-espressione di geni Pathogenesis-Related Protein (PR).

La produzione e l'accumulo di PR fanno parte della risposta immunitaria innata sotto stress biotico e abiotico (I Finkina et al., 2017). Queste proteine PR si accumulano localmente nei tessuti colpiti e circostanti, anche non infetti, fornendo protezione. Inoltre, le proteine PR fanno parte della risposta ipersensibile (HR) o della resistenza sistemica acquisita (SAR) contro diversi tipi di infezioni (LIU et al., 2010). Le proteine PR, descritte per la prima volta in *Nicotiana tabacum* (Van Loon and Van Kammen, 1970) includono chitinasi, non-specific lipid transfer proteins, β -1,3-glucanasi, perossidasi, proteine thaumatin like (Agrios, 2005; Ali et al., 2018; Souza et al., 2017; Vaghela et al., 2022; Van Baarlen et al., 2007; Van Loon and Van Strien, 1999).

Le proteine PR sono estremamente acide o estremamente basiche e per questo motivo possono essere altamente solubili e reattive (Agrios, 2005). La maggior parte delle proteine PR di natura acida sono per lo più secrete nello spazio extracellulare, mentre le proteine PR di natura basica sono principalmente localizzate nel vacuolo (Legrand et al., 1987). Alcune proteine PR hanno attività chitinasica (Legrand et al., 1987) o β -1,3-glucanasica (Kauffmann et al., 1987). Gli enzimi della chitinasica possono idrolizzare la chitina e si ritiene che molti di essi siano coinvolti nella difesa dai patogeni fungini (Kumar et al., 2018; Schlumbaum et al., 1986). La produzione di chitinasi a seguito di infezione fungina è stata spesso riscontrata nelle piante e la loro funzione è stata validata in piante transgeniche in cui è stata studiata l'espressione di geni della chitinasica clonati fornendo ulteriori prove a sostegno del loro coinvolgimento nel meccanismo di difesa (Kumar et al., 2018; Solgi et al., 2015; Vaghela et al., 2022). Le chitinasi idrolizzano la molecola strutturale di chitina/chitosano presente in vari animali e funghi producendo piccoli lipo-chito-oligosaccaridi (LCO) (Vaghela et al. 2022), che probabilmente funzionano come molecole segnale di stress endogeno. È interessante notare che nelle foglie Koroneiki infette era evidente la sovra-regolazione dei geni della chitinasica e della β -1,3-glucanasica. La sovraespressione di chitinasi e β -1,3-glucanasica in Koroneiki suggerisce quindi la presenza di un sistema di difesa antimicotico attivo. Si può

ipotizzare che l'accumulo di chitinasi ed endoglucanasi nei tessuti delle foglie infette possa interferire con l'infezione e lo sviluppo della *Spilocaea oleagina* crescita presumibilmente indebolendo la parete cellulare fungina e riducendo la progressione del micelio. Glucani o frammenti di chitina dalla parete cellulare di *Spilocaea* o peptidi/glicoproteine o funghi Avr possono rappresentare gli elicitori che inducono i geni PR.

In Koroneiki era evidente la sovra-regolazione di molte chinasi simili a recettori, come le receptor-like kinases, le Rust resistance kinase Lr10-like, e molti geni LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase possibilmente coinvolti nel riconoscimento del segnale di molecole derivate da agenti patogeni (PAMP). Il gene Rust resistance kinase Lr10-like relativo alla resistenza alla ruggine in *Vitis vinifera* è, ad esempio, coinvolto nel riconoscimento della peronospora (Ricciardi et al., 2022).

Inoltre, una serie di eventi di trasduzione del segnale, come i lipidi e vari fitormoni, che rilevano l'attacco del patogeno, sono stati anche innescati presumibilmente attivati come risposta a valle della risposta immunitaria relativa alla presenza di *Spilocaea*. Generalmente, le piante sottoposte ad attacchi di patogeni producono etilene, JA, SA e specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Yang et al., 1997). I PR acidi sono sovra-regolati da specie reattive dell'ossigeno e diversi tipi di molecole di segnalazione come l'acido salicilico (Epple et al., 1995; Reymond and Farmer, 1998; Vaghela et al., 2022) mentre i PR di natura basica (come la defensina e gli inibitori della proteasi) sono sovra-regolati da metil jasmonato e il fitormone gassoso etilene (es. Xu et al., 1994, rivisto in Vaghela et al. 2022). In Koroneiki la sovra-regolazione dei geni di segnalazione mediata dai fitormoni (JA, Brassinosteroidi, Auxine, ABA, Gibberelline, Cytokinine ed Etilene) è stata significativamente indotta, così come sei non-specific lipid transfer proteins (nsLTP), che sono considerate peptidi antimicrobici (AMP). I geni nsLTPs sono coinvolti nella difesa contro i patogeni, come dimostrato in molti studi su piante transgeniche. Nel grano transgenico, la sovraespressione della lipid transfer protein TaLTP5 (proteina di trasferimento lipidico) ha aumentato la resistenza alla peronospora *Cochliobolus sativus* e al marciume radicale comune *F. graminearum* (Zhu et al., 2012). In *A. thaliana* transgenica la sovraespressione del gene della lipid transfer protein TdLTP4 isolato da *T. turgidum* ha aumentato la resistenza contro *Botrytis cinerea* e *Alternaria solani* (Safi et al., 2015). Inoltre, esperimenti condotti su piante di carota transgeniche hanno dimostrato che è possibile aumentare la resistenza ad *Alternaria radicum* e *B. cinerea* combinando la sovraespressione della lipid transfer protein del grano e del gene della chitinasi2 dell'orzo (Jayaraj and Punja, 2007).

Finkina et al. (2017) hanno proposto un modello del meccanismo di risposta di difesa della pianta che coinvolge la secrezione di nsLTP nell'apoplasto. Quindi le proteine nsLTP possono legarsi ad altre molecole lipidiche secrete dalle piante (come l'acido jasmonico) o a molecole secrete dagli agenti patogeni stessi. In questo modello, quando gli nsLTP si legano alle molecole lipidiche, interagiscono anche con le LRR serine/threonine protein kinases, nonché con una regione della membrana e la cytoplasmic protein kinase (PK). Questa interazione provoca delle reazioni di biosintesi a cascata che portano alla fosforilazione delle proteine chinasi attivate dal mitogeno (MAPK) e possibili processi legati alla presenza del Ca^{2+} , inducendo fattori di trascrizione, altre proteine correlate alla patogenesi e portando alla resistenza sistemica acquisita (SAR). Questo modello può adattarsi allo scenario molecolare osservato a Koroneiki.

Per quanto riguarda i fattori di trascrizione sovra-regolati (TF) di Koroneiki – WRKY6-like, WRKY31, WRKY 43, WRKY 53, WRKY70, JUNGBRUNNEN 1- like, MYB family transcription factors (MYB3R-1-like, PHL11, and TF PIF3-like, Ap2-ethylene-responsive transcription factor, e SAR DEFICIENT 1 (SARD1) TF – è interessante notare che molti di essi sono stati riconosciuti come regolatori chiave coinvolti nella resistenza sistemica indotta (ISR) attivando e modulando simultaneamente le vie di segnalazione SA e JA / ET (es. WRKY70 - Jiang et al., 2016; WRKY70 e WRKY53 - Hu et al 2012). In *Arabidopsis* WRKY46, WRKY70 e WRKY53, parzialmente coinvolti nella via di segnalazione SA, regolano positivamente la resistenza contro *P. syringae*, svolgendo ruoli sinergici nella difesa basale della pianta (Hu et al., 2012). WRKY TF può inibire direttamente o indirettamente l'espressione genica che risponde a JA (Caarls et al., 2015). SARD1 è un fattore di trascrizione principale nell'immunità delle piante, indotto dall'accumulo di SA, la sua sovraespressione è sufficiente per attivare l'espressione genica di difesa (Huang et al., 2021; Zhang et al., 2010).

Le vie di segnalazione mediate dagli ormoni consentono l'attivazione trascrizionale che porta alla resistenza agli attacchi dei patogeni (Caarls et al., 2015). In Koroneiki, è evidente il coinvolgimento dell'acido abscissico (ABA) e dell'etilene e questi possono agire in sinergia con le risposte regolate da JA, sopprimendo le risposte dell'SA. Il crosstalk ormonale in Koroneiki ha portato alla regolazione delle vie di segnalazione della difesa e all'induzione della resistenza sistemica contro *Spilocaea oleagina* attraverso la sovraespressione di molti altri importanti geni R (GDSL esterase lipase, defensin Ec-AMP-D2-like, pathogenesis-related leaf protein 6-like, Thaumatin-like proteins (TLPs) relativo alla PR5 family, glycine-rich protein (GRP), MADS-box genes, STH-21-like, major allergen Pru ar 1-like, e altre proteinasi come la metalloendoproteina 2-MMP-1 e l'aspartic proteinase CDR1-like). Il GDSL LIPASE1 (GLIP1)

è un gene di difesa mediato dall'etilene che attiva la segnalazione di resistenza sistemica ai funghi e diversi microrganismi nelle piante e possiede attività enzimatica della lipasi e antimicrobiche che alterano l'integrità delle spore fungine (Oh et al., 2005).

I peptidi antimicrobici (AMP), chiamati anche Plant defensins, trovati sovra-regolati in Koroneiki, sono stati estratti e purificati da diverse piante e la loro attività antimicotica è stata dimostrata (Aumer et al., 2020; Owens and Doyle, 2021; Silva et al., 2014; Struyfs et al., 2021). Come parte del sistema di difesa dell'ospite, sembra che abbiano un meccanismo d'azione sfaccettato, a seconda delle specie fungine bersaglio (Leannec-Rialland et al. 2022), trasferendo informazioni tra il sistema immunitario innato e quello adattativo (Silva et al. 2014). Alcune Plant defensin necessitano di attraversare la parete cellulare e la membrana plasmatica dei funghi per indurre la morte cellulare, altre esercitano i loro effetti tossici senza entrare all'interno delle cellule fungine. (Leannec-Rialland et al., 2022).

Per quanto riguarda il gene pathogenesis-related leaf protein 6-like, sovraespresso in Koroneiki, ci sono molte prove che questa classe di proteine sia coinvolta nella difesa contro i funghi (rivisto in Hoegen et al., 2002).

Il gene MLO di resistenza alla muffa codifica per le proteine transmembrana ed è stato identificato per la prima volta nell'orzo, ha un ruolo chiave nella resistenza all'oidio ma anche a molti stress biotici e abiotici nel riso e nell'*Arabidopsis* (Nguyen et al., 2016). Tuttavia, in alcune specie il gene MLO è stato identificato come fattore di suscettibilità ai patogeni (Kusch and Panstruga, 2017; Pépin et al., 2021).

Le TLP (correlate alla PR5 family) hanno attività antimicotica, (Batalia et al., 1996). Alcune TLP possono arrestare l'invasione fungina mediante idrolisi di β -1,3-glucani o mediante inibizione di enzimi fungini (Grenier et al., 1999; Ye et al., 1999). In molte specie la sovraespressione della proteina taumatinica ha migliorato la resistenza a molte malattie fungine (Acharya et al., 2013; de Jesús-Pires et al., 2020; Misra et al., 2016; Munis et al., 2010). È interessante notare che in questo lavoro il gene Thaumatin-like era un gene unico sovraespresso in entrambe le cultivar Koroneiki e Nocellara del Belice.

Le proteine leganti l'RNA (RBP) (gene glycine-rich protein), sovra-regolato in Koroneiki T3, è noto per la sua attività antifungina e antibatterica in molte specie (Czolpinska and Rurek, 2018).

Molte proteasi, compresi i geni della metalloendoproteinasi, sono state trovate anche sovraespresse nelle foglie infette di Koroneiki, questi geni codificano per le proteine coinvolte nella regolazione della risposta di difesa contro l'infezione da patogeni delle piante (Li et al. 2015). Le proteasi in

altre specie sono secrete dalla cellula nell'apoplasto che è un possibile sito utilizzato dai patogeni per la colonizzazione. Secondo i lavori di Godson et al (2021) e Backer et al. (2022), le proteasi apoplastiche possono: a) avere un'attività antimicrobica diretta; b) attivare l'idrolasi immunitaria; c) essere coinvolte nel rilascio di modelli molecolari associati al danno fogliare (Damage-associated molecular patterns - DAMP); d) percepire gli effettori; e) essere coinvolte nell'avvio della risposta di ipersensibilità (HR); f) essere coinvolte nella regolazione sia della resistenza sistemica acquisita o indotta. Inoltre, le proteasi sembrano implicate nell'attività caspasi-like nelle piante, promuovendo la morte cellulare programmata (PDC) che è un aspetto importante nelle risposte di difesa (Backer et al., 2022; Godson and van der Hoorn, 2021).

Molti geni che codificano per le vie biosintetiche dei phenyl-propanoidi e terpenoidi, compresi quelli che coinvolgono la produzione di lignina, flavonoidi, terpeni e fitoalessine, sono stati trovati sovraespressi in Koroneiki e in misura minore in Nocellara del Belice. Flavonoidi, terpeni e fitoalessine possono avere attività antimicotica o hanno anche dimostrato di svolgere un ruolo chiave nella difesa delle piante contro lo stress biotico e abiotico (Backer et al., 2022; Báidez et al., 2007; Desmedt et al., 2021; El Aabidine et al., 2010; Lanza et al., 2017; Mekuria et al., 2001; Pott et al., 2019; Rahioui et al., 2009; Yadav et al., 2020). L'accumulo di questi composti è più rapido a livelli più alti nelle piante resilienti, spesso localizzate nelle aree di infezione, ma non è specifico in quanto può essere innescato da stress abiotici (Pott et al. 2019).

Inoltre, molti geni che codificano per gli enzimi biosintetici per il trasporto di cutina, cere, suberina, di deposizione e di rimodellamento, che sono importanti per la protezione epidemica contro i patogeni, sono stati trovati sovregolati in Koroneiki. Tra questi, ad esempio, i geni CASPL, espressi nell'endoderma, codificanti in modo altamente tessuto-specifico per le Casparian strip domain proteins (CASP) inducono la formazione di strutture di lignina a nido d'ape, che possono impedire la proliferazione del patogeno nel tessuto infettato (Barbosa et al., 2019; Roppolo et al., 2014).

In questo lavoro, era evidente la diversità di DEG tra le foglie infette di Koroneiki e Nocellara del Belice, che ha evidenziato una palese mancanza di risposte di difesa in Nocellara del Belice, indicata dalla mancata espressione di geni di segnalazione, limitato cross-talk ormonale e limitata espressione genica correlata alla resistenza. Solo un gene thaumatin like è stato sovraespresso in entrambe le cultivar dopo l'infezione. La mancanza di adeguate risposte difensive nella Nocellara del Belice può spiegare l'elevata suscettibilità di questa cultivar, che reagisce all'infezione solo regolando geni (polifenoli) solitamente legati allo stress da ferita e/o taglio. Finora, solo in due portainnesti di avocado sotto l'attacco del fungo *Phytophthora cinnamomic*, che differivano per la

loro suscettibilità al patogeno, è stata descritta una risposta genetica estremamente diversa, che mostra l'attivazione di una pletera di geni nel portainnesto resistente e la mancanza di risposta molecolare nel portainnesto suscettibile (Backer et al., 2022), analogamente al meccanismo di risposta di difesa osservato in Koroneiki vs. Nocellara del Belice.

Conclusioni e prospettive future

La prima parte dello studio ha permesso di conoscere i livelli di resistenza in campo a *S. oleagina* di diverse cultivar, incluse locali e internazionali. Le analisi dei polifenoli hanno messo in evidenza che non vi è alcuna correlazione tra una maggiore quantità di polifenoli totali e la resistenza a *S. oleagina*, bensì una correlazione inversa tra incidenza di malattia e polifenoli totali, visto che in Nocellara del Belice come pure in altre cultivar locali suscettibili al patogeno (es. Calatina e Abunara) sono stati riscontrati i livelli più alti di polifenoli.

A livello trascrizionale Koroneiki e Nocellara del Belice allo stadio infetto hanno presentano notevoli differenze. L'analisi RNA-seq ha consentito di identificare diversi geni di resistenza/resilienza da poter impiegare come biomarcatori per la diagnostica precoce di infezioni da *S. oleagina*. Ad esempio, il gene thaumatin like è risultato sovraespresso in modo univoco in entrambe le cultivar, e può essere utilizzato come possibile indicatore per la diagnosi precoce dell'infezione.

Diverse sequenze genetiche sono state indagate dai dati ottenuti dalla trascrittomiche come possibili biomarcatori precoci della malattia. I risultati ottenuti fanno ben sperare che vi sia una applicabilità che si adatti allo scopo.

La grande sfida che la diagnostica molecolare applicata alle problematiche del campo si pone è la necessità di identificare in modo rapido, accurato ed economico la presenza di un agente patogeno in modo tale da limitarne al massimo i danni e la diffusione e concentrare gli interventi fitochimici. Uno strumento portatile come il bCube può risultare utile nella diagnostica precoce e anche simultanea di più agenti patogeni. In questa tesi è stato scelto un agente eziologico come *S. oleagina* che apporta delle perdite ingenti in campo e per cui non esiste una cura definitiva per sviluppare una metodica di diagnostica che idealmente può risultare una strategia valida anche per altri patogeni.

Alla luce di tutto questo, la scoperta di biomarcatori attraverso le sempre più avanzate tecnologie 'omiche' e la loro applicazione in campo grazie a strumenti versatili come il bCube potrebbe diventare in un futuro prossimo una pratica diagnostica di routine, consentendo di monitorare le piante e prevenire infezioni su vasta scala, evitando perdite ingenti o trattamenti fitosanitari eccessivi nell'ottica di un'agricoltura più sostenibile e di precisione.

I risultati della presente tesi sono stati pubblicati in 3 lavori:

- Trippa, D., Scalenghe, R., Basso, M.F., Panno, S., Davino, S., Morone, C., Giovino, A., Oufensou, S., Luchi, N., Yousefi, S. and Martinelli, F., 2023. Next-generation methods for early disease detection in crops. A review. *Pest Management Science*. DOI: 10.1002/ps.7733
- Marchese, A., Balan, B., Trippa, D.A., Bonanno, F., Caruso, T., Imperiale, V., Marra, F.P., Giovino, A. (2023). NGS transcriptomic analysis uncovers the possible resistance mechanisms of olive to *Spilocaea oleagina* leaf spot infection. *Frontiers in Plant Science*, 14:1219580. doi: 10.3389/fpls.2023.1219580
- Bertacca, S., Caruso, A.G., Trippa, D., Marchese, A., Giovino, A., Matic, S., Noris, E., Ambrosio, M.I.F.S., Alfaro, A., Panno, S., Davino, S. (2022). Development of a Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Rapid Detection of *Olea Europaea Geminivirus*. *Plants*, 11(5), 660. DOI: 10.3390/plants11050660

Indice delle figure

FIGURA 1.. TRATTO DA: BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. E JONES, R. EDI. (2000) BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, P. 1104	13
FIGURA 2. LE PRINCIPALI RISPOSTE DI RESISTENZA DELLA PIANTA INDOTTE A LIVELLO SISTEMICO. LA SAR È ATTIVATA IN TESSUTI SANI, DISTANTI DAL SITO D'INFEZIONE, ED È MEDIATA DA SA (ACIDO SALICILICO). L'ISR È ATTIVATA NELL'INTERA PIANTA ED È MEDIATA DA JA/ET (ACIDO JASMONICO/ETILENE) (TRATTA DA: THE RHIZOSPHERE: MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN MICROORGANISMS AND ROOTS SPRINGERLINK)	15
FIGURA 3. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA PERCEZIONE DELLO STRESS BIOTICO E DELLA SEGNALEZIONE DEL CA ²⁺ PER LA REGOLAZIONE DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE DELLE PIANTE; TRATTA DA: 'ALHORAIBI, H., BIGEARD, J., RAYAPURAM, N., COLCOMBET, J., & HIRT, H. (2019). PLANT IMMUNITY: THE MTI-ETI MODEL AND BEYOND. CURRENT ISSUES IN MOLECULAR BIOLOGY, 30(1), 39-5'	16
FIGURA 4. GLI EFFETTI DEVASTANTI DI X. FASTIDIOSA SU UN CAMPO DELLA PUGLIA.....	19
FIGURA 5. TUMORI DOVUTI A PSEUDOMONASS SAVASTANOI.....	20
FIGURA 6. DANNI DOVUTO A S. OLEAGINA.....	23
FIGURA 7. RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DEL PROCESSO DI AMPLIFICAZIONE RT-LAMP ATTRAVERSO CUI SI FORMANO I LOOP DI AMPLIFICAZIONE.	29
FIGURA 8. ESEMPIO DI TERMOCICLATORE PORTATILE CAPACE DI ESEGUIRE ANALISI PCR-RT E LAMP CONSENTENDO L'APPLICAZIONE DI TECNICHE DIAGNOSTICHE CHE PREVEDONO L'USO DI BIOMARCATORI.	31
FIGURA 9. SVILUPPO E VALIDAZIONE DEL SAGGIO LAMP.	32
FIGURA 10. SCHEMATIZZAZIONE DI UN ESPERIMENTO TIPODI TRASCRITTOMICA.....	34
FIGURA 11. ELETTROFORESI CHE MOSTRA IL PROGRESSIVO DANNEGGIAMENTO DELL'RNA.....	35
FIGURA 12. IL NUMERO DI RIN, ALGORITMO SVILUPPATO DA ILLUMINA, MOSTRA LA QUALITÀ DELL'RNA ESTRATTO.	36
FIGURA 13. BANCHE DEI DATI BIOINFORMATICI COLLEGAATE TRA LORO IN DIVERSI PAESI	39
FIGURA 14. FLOWCHART DEL FLUSSO DI LAVORO BIOINFORMATICO CON ALCUNI ESEMPI DI PROGRAMMI IMPIEGABILI PER I DIVERSI STEP DI ANALISI	40
FIGURA 15. ESEMPIO DI NORMALIZZAZIONE PER IL SEQUENZIAMENTO DELLE DIFFERENZE DI PROFONDITÀ	42
FIGURA 16. ESEMPI DI MAPPE DI CALORE DEI CONTEGGI DI LETTURA TRASFORMATI DA RLOG PER I GENI CON VALORI P REGOLATI <0,05 NELL'ANALISI DGE.	43
FIGURA 17. SCREENING CULTIVAR INFETTE DA S.OLEAGINA.	63
FIGURA 18. LIVELLI DI INFEZIONE DA S. OLEAGINA ALLO STADIO 0.	65
FIGURA 19. LIVELLI DI INFEZIONE DA S. OLEAGINA ALLO STADIO 1.	65
FIGURA 20. LIVELLI DI INFEZIONE DA S. OLEAGINA ALLO STADIO 2.	65
FIGURA 21. REGRESSIONE LINEARE DELLA QUANTITÀ DI POLIFENOLI TOTALI IN CONFRONTO ALLA PERCENTUALE DI FOGLIE MALATE ALLO STADIO T3 PRENDENDO IN CONSIDERAZIONE I VALORI DEI PT DELLE TRE DISTANZE INTERFILARI 4x2,4x3, 4x4 (GIALLO: KORONEIKI; ROSSO: ABUNARA; VERDE SCURO: CALATINA; VERDE CHIARO: NOCELLARA DEL BELICE) - P-VALUE: 0,001; R ² : 0,621.....	68
FIGURA 22. INTERFACCIA ONLINE DEL TERMOCICLATORE PORTATILE BCUBE CHE MOSTRA ALCUNI DEI RISULTATI OTTENUTI TESTANDO ALCUNI DEI PRIMER OLEST (BENITEZ ET AL., 2005). LE CULTIVAR MOSTRATE SONO: NB- NOCELLARA DEL BELICE, K- KORONEIKI, ABB- ABUNARA. I RISULTATI DEI CT VALUE RELATIVI ALL'ANALISI MOSTRATA SONO RIPORTATI IN TABELLA 9.....	70
FIGURA 23. IL DIAGRAMMA TRACCIA I GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI PER TUTTI E QUATTRO I CONFRONTI A) KT1 VS. KT3 B) NBT1 VS. KT1 C) NBT1 VS. NBT3 E D) NBT3 VS.KT3. L'ASSE X MOSTRA IL FOLD CHANGE LOG ₂ NELL'ESPRESSIONE GENICA TRA DIVERSI CAMPIONI E L'ASSE Y MOSTRA IL SIGNIFICATO STATISTICO DELLE DIFFERENZE. I GENI SIGNIFICATIVAMENTE UP E DOWN-REGOLATI SONO STATI FILTRATI (LOG ₂ (FOLD CHANGE) >= 2, P VALUE <= 0,01) ED EVIDENZIATI RISPETTIVAMENTE IN PUNTI ROSSI E VERDI, MENTRE I GENI NON SIGNIFICATIVI SONO STATI INDICATI DA PUNTI GRIGI.	73
FIGURA 24. DIAGRAMMA DI VENN CHE MOSTRA IL NUMERO DI GENI SPECIFICAMENTE E COMUNEMENTE REGOLATI IN TUTTI E QUATTRO I CONFRONTI A) KT1 RISPETTO A KT3 B) NBT1 RISPETTO A KT1 C) NBT1 RISPETTO A NBT3 E D) NBT3 RISPETTO A KT3. I GENI SONO STATI SELEZIONATI APPLICANDO IL FILTRO: LOG ₂ (FOLD CHANGE)>=2 E P-VALUE<=0.01.	73
FIGURA 25. GENI DIFFERENZIALMENTE IN 'KORONEIKI' ALLO STADIO T1 VS. T3 SOTTOPOSTI ALLO STRESS BIOTICO DA INFEZIONE A SPILOCEA OLEAGINA. IL GRADIENTE ROSSO MOSTRA I GENI SOVRAREGOLATI E IL GRADIENTE VERDE RAPPRESENTA I GENI SOTTOREGOLATI. I GENI MODULATI SIA IN 'KORONEIKI' CHE IN 'NOCELLARA DEL BELICE' SONO EVIDENZIATI IN GIALLO. STRESS BIOTICO AMBIENTALE PUTATIVO(A); VIE METABOLICHE SECONDARIE(B).	78

FIGURA 26. GENI DIFFERENZIALMENTE IN 'NOCELLARA DEL BELICE' ALLO STADIO T1 VS. T3 SOTTOPOSTI ALLO STRESS BIOTICO DA SPILOCEA OLEAGINA. IL GRADIENTE ROSSO MOSTRA I GENI SOVRAREGOLATI E IL GRADIENTE VERDE RAPPRESENTA I GENI SOTTOREGOLATI. I GENI COMUNI IN 'KORONEIKI' E IN 'NOCELLARA DEL BELICE' SONO EVIDENZIATI IN GIALLO. STRESS BIOTICO AMBIENTALE PUTATIVO(A); VIE METABOLICHE SECONDARIE (B).	81
FIGURA 27. HEATMAP GRAFICO CHE MOSTRA L'ESPRESSIONE DI 61 GENI COMUNI PRESENTI IN TUTTI E QUATTRO I CONFRONTI; KT1 CONTRO KT3, NBT1 CONTRO KT1, NBT1 CONTRO NBT3 E NBT3 CONTRO KT3. I GENI SONO STATI RAGGRUPPATI GERARCHICAMENTE IN BASE A UNA MATRICE DI CORRELAZIONE DI PEARSON UTILIZZANDO DATI FPKM E COLLEGAMENTO MEDIO..	86
FIGURA 28. LA FIGURA RAPPRESENTA LE DIFFERENZE CHIAVE NELL'ESPRESSIONE GENICA TRA 'KORONEIKI' INFETTA T3 E 'NOCELLARA DEL BELICE' T3. I GENI REGOLATI IN 'KORONEIKI' SONO EVIDENZIATI DA BOX NERI, MENTRE I GENI DI 'NOCELLARA DEL BELICE' DA BOX GRIGI. È EVIDENTE LA DIVERSA TIPOLOGIA DI FATTORI DI TRASCRIZIONE NELLA REGOLAZIONE DELLA SEGNALAZIONE DELLO STRESS, CHE POI INNESCANO UNA DIVERSA RISPOSTA DI DIFESA DOWN-STREAM. IL GRADIENTE ROSSO MOSTRA I GENI SOVRAREGOLATI E IL GRADIENTE VERDE RAPPRESENTA I GENI SOTTOREGOLATI. LA LISTA DI ALCUNI GENI COMUNI NUMERATI È FORNITA.	87
FIGURA 29. CURVE DI MELTING OTTENUTE DALL'AMPLIFICAZIONE DEL PRIMER DISEGNATO SU LOC111384845 RELATIVE AI CAMPIONI KT1, KT3, NBT1, NBT3.....	88
FIGURA 30. CURVE RT-PCR DEL SET DI PRIMER LOC111401947 SU NOCELLARA DEL BELICE E KORONEIKI (STADI 0,1 E 2)..	89
FIGURA 31. VALIDAZIONE qRT-PCR DI SEI GENI MIGLIORI ESPRESI IN MODO DIFFERENZIALE (LOC111408132 (GENE BIFUNZIONALE SIMILE ALLA PINORESINOL-LARICRESINOLO REDUTTASI), LOC111384845 (GENE DELLA RESISTENZA ALLA PERONOSPORA 6), LOC111401947 (SIMILE ALLA DEIDRINA DHN1), LOC111380489 (SIMILE ALLA TAUMATINA), LOC11141097 1 (RADIALE-COME 2) E LOC111385280 (PROTEINA SIMILE A MLO 6).	90

Indice delle tabelle

TABELLA 1. LE PRINCIPALI MALATTIE CRITTOGAMICHE DELL'OLIVO.	20
TABELLA 2. I PRINCIPALI VIRUS PRESENTI IN OLIVO.	21
TABELLA 3. CONDIZIONE DI REAZIONE SAGGIO LAMP.	53
TABELLA 4. SOLVENTI DI REAZIONE SAGGIO LAMP.	53
TABELLA 5. SEQUENZE DEI PRIMERDISEGNATI PER LAMP.	54
TABELLA 6. GENI MARCATORI CANDIDATI SENSIBILI SELEZIONATI DA STUDI DI RIFERIMENTO.	59
TABELLA 7. QUANTIFICAZIONE DEI PT ESPRESSI IN MG DI ACIDO GALLICO SU G DI FOGLIE SECCHIE; ABB: ABUNARA; CAL.: CALATINA; KOR: KORONEIKI; NB: NOCELLARA DEL BELICE.	66
TABELLA 8. SOMMARIO RIASSUNTIVO DEI GRUPPI INDIVIDUATI DALL'ANALISI DI TURKEY.	68
TABELLA 9. SONO MOSTRATI I CT VALUE DI UNA DELLE ANALISI EFFETATE UTILIZZANDO IL bCUBE. NELLA PRIMA COLONNA È ILLUSTRATO IL NUMERO DEL PLATE, NELLA SECONDA COLONNA L'IDENTIFICATIVO ASSEGNATO E NELLA TERZA IL RISULTATO. IN QUESTA ANALISI SONO STATI TESTATI I PRIMER OLEST08, OLEST72 E OLEST30 RISPETTO ALL'HOUSE KEEPING OLEST34.	70
TABELLA 10. INFORMAZIONI DI LETTURA GREZZE E INFORMAZIONI DI ALLINEAMENTO DI TUTTI I CAMPIONI (NB: NOCELLARA DEL BELICE,KT : KORONEIKI, T1 : NO SIGNS OF DISEASE, T3 : EVIDENT PRESENCE OF DISEASE, R : REPLICHE	71
TABELLA 11. LISTA DEI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI (DEG) IN KORONEIKI (STADIO SANO VS. STADIO INFETTO).	76
TABELLA 12. LISTA DEI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI (DEG) IN NOCELLARA DEL BELICE (STADIO SANO VS. STADIO INFETTO).	80
TABELLA 13. GENI DE COMUNI SIA IN KORONEIKI CHE IN NOCELLARA DEL BELICE.	84
TABELLA 14. GENI SELEZIONATI PER ESSERE TESTATI COME BIOMRCATORI.	88
TABELLA 15. QUANTIFICAZIONE RELATIVA DELL'ESPRESSIONE GENICA DEI PUTATIVI GENI DI RESILIENZA SCELTI PER LA VALIDAZIONE RT-PCR; NB: NOCELLARA DEL BELICE; K: KORONEIKI; N: NESSUN RISULTATO APPREZZABILE; IL SIMBOLO (+) INDICA UNA RISPOSTA MAGGIORMENTE INDOTTA (>10 VOLTE); IL SIMBOLO (-) INDICA UNA REPRESSIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA.	90

Bibliografia

- Abdul Malik, N.A., Kumar, I.S., Nadarajah, K., 2020. Elicitor and receptor molecules: orchestrators of plant defense and immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 963.
- Acharya, K., Pal, A.K., Gulati, A., Kumar, S., Singh, A.K., Ahuja, P.S., 2013. Overexpression of *Camellia sinensis* thaumatin-like protein, CsTLP in potato confers enhanced resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* infection. *Mol. Biotechnol.* 54, 609–622.
- Agosteo, G.E., Zappia, R., 2007. Epidemiological study of olive scab in Calabria. *IOBC WPRS Bull.* 30, 233.
- Agrios, G.N., 2005. *Plant pathology*. Elsevier.
- Ahmed, G.J., Li, X., Liu, A., Chen, S., 2020. Brassinosteroids in plant tolerance to abiotic stress. *J. Plant Growth Regul.* 39, 1451–1464.
- Ahn, I.-P., Lee, S.-W., Suh, S.-C., 2007. Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 759–768.
- Ali, M.A., Abbas, A., Azeem, F., Javed, N., Bohlmann, H., 2015. Plant-nematode interactions: from genomics to metabolomics. *Int. J. Agric. Biol.* 17.
- Ali, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Islam, S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* 212, 29–37.
- Arnholdt-Schmitt, B., 2004. Stress-induced cell reprogramming. A role for global genome regulation? *Plant Physiol.* 136, 2579–2586.
- Aumer, T., Voisin, S.N., Knobloch, T., Landon, C., Bulet, P., 2020. Impact of an antifungal insect defensin on the proteome of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J. Proteome Res.* 19, 1131–1146.

- Azeri, T., 1993. Research on olive leaf spot, olive knot and *verticillium* wilt of olive in Turkey 1. EPPO Bull. 23, 437–440.
- Azevedo-Nogueira, F., Rego, C., Gonçalves, H.M.R., Fortes, A.M., Gramaje, D., Martins-Lopes, P., 2022. The road to molecular identification and detection of fungal grapevine trunk diseases. Front. Plant Sci. 13, 960289.
- Backer, R., Engelbrecht, J., Van den Berg, N., 2022. Differing Responses to *Phytophthora cinnamomi* Infection in Susceptible and Partially Resistant *Persea americana* (Mill.) Rootstocks: A Case for the Role of Receptor-Like Kinases and Apoplastic Proteases. Front. Plant Sci. 13, 928176.
- Báidez, A.G., Gómez, P., Del Río, J.A., Ortuño, A., 2007. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. J. Agric. Food Chem. 55, 3373–3377.
- Balint-Kurti, P., 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. Mol. Plant Pathol. 20, 1163–1178.
- Barba, M., 1993. Viruses and virus-like diseases of olive 1. EPPO Bull. 23, 493–497.
- Barbosa, I.C.R., Rojas-Murcia, N., Geldner, N., 2019. The Casparian strip—one ring to bring cell biology to lignification? Curr. Opin. Biotechnol. 56, 121–129.
- Bari, R., Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol. Biol. 69, 473–488.
- Batalia, M.A., Monzingo, A.F., Ernst, S., Roberts, W., Robertus, J.D., 1996. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. Nat. Struct. Biol. 3, 19–22.
- Bendini, A., Cerretani, L., Di Virgilio, F., Belloni, P., Bonoli-Carbognin, M., Lercker, G., 2007. Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. J. Food Qual. 30, 424–437.
- Benitez, Y., Botella, M.A., Trapero, A., Alsalimiya, M., Caballero, J.L., Dorado, G., Muñoz-Blanco, J., 2005. Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the

- biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. *Mol. Plant Pathol.* 6, 425–438.
- Benny, J., Giovino, A., Marra, F.P., Balan, B., Martinelli, F., Caruso, T., Marchese, A., 2022. Transcriptomic Analysis of the *Pistacia vera* (L.) Fruits Enable the Identification of Genes and Hormone-Related Gene Linked to Inflorescence Bud Abscission. *Genes (Basel)*. 13, 60.
- Benny, J., Marchese, A., Giovino, A., Marra, F.P., Perrone, A., Caruso, T., Martinelli, F., 2020. Gaining insight into exclusive and common transcriptomic features linked to drought and salinity responses across fruit tree crops. *Plants* 9, 1059.
- Berenguer, M.J., Vossen, P.M., Grattan, S.R., Connell, J.H., Polito, V.S., 2006. Tree irrigation levels for optimum chemical and sensory properties of olive oil. *HortScience* 41, 427–432.
- Bernard, G.C., Egnin, M., Bonsi, C., 2017. The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. *Nematol. diagnosis Control* 1, 121–151.
- Bernaschina, Y., Leoni, C., Alaniz, S., 2020. Genetic diversity evidence a mixed reproduction mode in *Venturia oleaginea* populations in Uruguay. *J. Plant Pathol.* 102, 123–133.
- Bertolini, E., Penyalver, R., García, A., Olmos, A., Quesada, J.M., Cambra, M., López, M.M., 2003. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *J. Microbiol. Methods* 52, 261–266.
- Bhuiyan, N.H., Liu, W., Liu, G., Selvaraj, G., Wei, Y., King, J., 2007. Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. *Plant Mol. Biol.* 64, 305–318.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., Mumford, R., 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res.* 186, 20–31.
- Boyko, A., Kovalchuk, I., 2008. Epigenetic control of plant stress response. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 61–72.
- Bronner, I.F., Quail, M.A., Turner, D.J., Swerdlow, H., 2013. Improved protocols for illumina sequencing. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 79, 12–18.

- Buonaurio, R., Almadi, L., Famiani, F., Moretti, C., Agosteo, G.E., Schena, L., 2023. Olive leaf spot caused by *Venturia oleaginea*: An updated review. *Front. Plant Sci.* 13, 1061136.
- Caarls, L., Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6, 170.
- Capretti, P., Ragazzi, A., 2009. *Elementi di patologia forestale*. Pàtron.
- Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., De Stradis, A., Loconsole, G., Nigro, F., Porcelli, F., Potere, O., Martelli, G.P., 2014. Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *J. Plant Pathol.* 96, 1–5.
- Carlucci, A., LoPs, Fra., Marchi, G., Mugnai, L., Surico, G., 2013. Has *Xylella fastidiosa* "chosen" olive trees to establish in the Mediterranean basin? *Phytopathol. Mediterr.* 541–544.
- Charoenvilaisiri, S., Seepiban, C., Bhunchoth, A., Warin, N., Luxananil, P., Gajanandana, O., 2014. Development of a multiplex RT-PCR-ELISA to identify four distinct species of tospovirus. *J. Virol. Methods* 202, 54–63.
- Chatterjee, A., Ahn, A., Rodger, E.J., Stockwell, P.A., Eccles, M.R., 2018. A guide for designing and analyzing RNA-Seq data. *Gene Expr. Anal. methods Protoc.* 35–80.
- Czulpinska, M., Rurek, M., 2018. Plant glycine-rich proteins in stress response: an emerging, still prospective story. *Front. Plant Sci.* 9, 302.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- Dangl, J.L., McDowell, J.M., 2006. Two modes of pathogen recognition by plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8575–8576.
- Danks, C., Barker, I., 2000. On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *EPPO Bull.* 30, 421–426.
- de Jesús-Pires, C., Ferreira-Neto, J.R.C., Pacifico Bezerra-Neto, J., Kido, E.A., de Oliveira Silva, R.L., Pandolfi, V., Wanderley-Nogueira, A.C., Binneck, E., da Costa, A.F., Pio-Ribeiro, G., 2020. Plant thaumatin-like proteins: function, evolution and biotechnological applications.

Curr. Protein Pept. Sci. 21, 36–51.

De Marzo, L., Frisullo, S., Lops, F., Rossi, V., 1993. Possible dissemination of *Spilocaea oleagina* conidia by insects (*Ectopsocus briggsi*) 1. Eppo Bull. 23, 389–391.

De Vleeschauwer, D., Xu, J., Höfte, M., 2014. Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to *Arabidopsis*. Front. Plant Sci. 5, 611.

Desmedt, W., Jonckheere, W., Nguyen, V.H., Ameye, M., De Zutter, N., De Kock, K., Debode, J., Van Leeuwen, T., Audenaert, K., Vanholme, B., 2021. The phenylpropanoid pathway inhibitor piperonylic acid induces broad-spectrum pest and disease resistance in plants. Plant. Cell Environ. 44, 3122–3139.

Dodds, P.N., Rathjen, J.P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. Nat. Rev. Genet. 11, 539–548.

Dündar, F., Skrabanek, L., Zumbo, P., 2018. Introduction to differential gene expression analysis. Appl. Bioinforma. Core 1–86.

El-Garhy, H.A.S., Abdel-Rahman, F.A., Shams, A.S., Osman, G.H., Moustafa, M.M.A., 2020. Comparative analyses of four chemicals used to control black mold disease in tomato and its effects on defense signaling pathways, productivity and quality traits. Plants 9, 808.

El-Modafar, C., El-Boustani, E.S., 2005. The role of phenols in plant defence mechanisms. Biopestic. plant Orig. 157–171.

El-Salam, A., Ezzat, A.M., Salem, S.A.-W., Abdel-Rahman, R.S., El-Behery, H.H., Magd Elden, M.A., 2019. Effects of climatic changes on olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) population dynamic with respect to the efficacy of its larval parasitoid in Egyptian olive trees. Bull. Natl. Res. Cent. 43, 1–9.

El Aabidine, A.Z., Baissac, Y., Moukhli, A., Jay-Allemand, C., Khadari, B., El Modafar, C., 2010. Resistance of olive tree to *Spilocaea oleagina* is mediated by the synthesis of phenolic compounds. Int. J. Agric. Biol 12, 61–67.

Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H., 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. Plant

Physiol. 109, 813–820.

Ercolani, G.L., 1978. *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. Microbiology 109, 245–257.

Fabbri, A., Pedrazzini, M., 2001. L'olivo come pianta erboristica. Erbor. Domani 4, 58–71.

Farrell Jr, R.E., 2009. RNA Methodologies: laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press.

Fischbach, J., Xander, N.C., Frohme, M., Glökler, J.F., 2015. Shining a light on LAMP assays? A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. Biotechniques 58, 189–194.

Franceschini, A., Longo, S., Moricca, S., Ciancio, O., 2008. Avversità biotiche e mutamenti climatici in ambienti forestali, in: Atti Del Terzo Congresso Nazionale Di Selvicoltura per Il Miglioramento e La Conservazione Dei Boschi Italiani. pp. 16–19.

Frisullo, S., Rossi, V., Lops, F., 1994. *Spilocaea oleagina*: epidemiologia e lotta, in: Atti: Convegno Innovazioni e Prospettive Nella Difesa Fitosanitaria. pp. 233–236.

Fu, Z.Q., Dong, X., 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. Annu. Rev. Plant Biol. 64, 839–863.

Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S., 2013. Plant defense against insect herbivores. Int. J. Mol. Sci. 14, 10242–10297.

Giampetruzzi, A., Baptista, P., Morelli, M., Cameirão, C., Lino Neto, T., Costa, D., D'Attoma, G., Abou Kubaa, R., Altamura, G., Saponari, M., 2020. Differences in the endophytic microbiome of olive cultivars infected by *Xylella fastidiosa* across seasons. Pathogens 9, 723.

Giraldo-González, J.J., de Souza Carvalho, F.M., Ferro, J.A., Herai, R.H., Bedoya, G.C., Mendoza, E.F.R., 2021. Transcriptional changes involved in kumquat (*Fortunella* spp) defense response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in early stages of infection. Physiol. Mol. Plant Pathol. 116, 101729.

Girelli, C.R., Angilè, F., Del Coco, L., Migoni, D., Zampella, L., Marcelletti, S., Cristella, N.,

- Marangi, P., Scortichini, M., Fanizzi, F.P., 2019. ¹H-NMR metabolite fingerprinting analysis reveals a disease biomarker and a field treatment response in *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*-Infected Olive Trees. *Plants* 8, 115.
- Glaus, P., Honkela, A., Rattray, M., 2012. Identifying differentially expressed transcripts from RNA-seq data with biological variation. *Bioinformatics* 28, 1721–1728.
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.
- Godson, A., van der Hoorn, R.A.L., 2021. The front line of defence: a meta-analysis of apoplastic proteases in plant immunity. *J. Exp. Bot.* 72, 3381–3394.
- Goldsmith, C.S., Bell-Pedersen, D., 2013. Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks. *Adv. Genet.* 84, 1–39.
- Gómez-Rodríguez, M.V., Beuzon, C., González-Plaza, J.J., Fernández-Ocaña, A.M., 2021. Identification of an olive (*Olea europaea* L.) core collection with a new set of SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 68, 117–133.
- Gouveia, B.C., Calil, I.P., Machado, J.P.B., Santos, A.A., Fontes, E.P.B., 2017. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Front. Microbiol.* 7, 2139.
- Graniti, A., 1993. Olive scab: a review 1. *Eppo Bull.* 23, 377–384.
- Grant, M., Lamb, C., 2006. Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 414–420.
- Grenier, J., Potvin, C., Trudel, J., Asselin, A., 1999. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1, 3-glucans. *Plant J.* 19, 473–480.
- Gu, Z., Eils, R., Schlesner, M., 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849.
- Harper, S.J., Ward, L.I., Clover, G.R.G., 2010. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100, 1282–1288.
- Hernández, M.E.S., Davila, A.R., De Algaba, A.P., López, M.A.B., Casas, A.T., 1998.

- Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. plant Pathol.* 104, 347–357.
- Hesketh, A.R., 2019. RNA sequencing best practices: experimental protocol and data analysis. *Yeast Syst. Biol. Methods Protoc.* 113–129.
- Hoegen, E., Strömberg, A., Pihlgren, U., Kombrink, E., 2002. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Mol. Plant Pathol.* 3, 329–345.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., Ravnikar, M., 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathol.* 56, 785–796.
- Hu, Y., Dong, Q., Yu, D., 2012. Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 185, 288–297.
- Huang, W., Wu, Z., Tian, H., Li, X., Zhang, Y., 2021. Arabidopsis CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60b plays dual roles in plant immunity. *Plant Commun.* 2.
- Hulbert, S.H., Webb, C.A., Smith, S.M., Sun, Q., 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 285–312.
- I Finkina, E., N Melnikova, D., V Bogdanov, I., V Ovchinnikova, T., 2017. Plant pathogenesis-related proteins PR-10 and PR-14 as components of innate immunity system and ubiquitous allergens. *Curr. Med. Chem.* 24, 1772–1787.
- Iannotta, N., Loconsole, G., Noce, M.E., Saponari, M., Savino, V.N., 2012. Principali patogeni e difesa.
- Iannotta, N., Monardo, D., Perri, L., 2000. Effects of Different Treatments against *Spilococea oleagina* (Cast.) Hugh., in: IV International Symposium on Olive Growing 586. pp. 741–744.
- Ilias, F., Medjdoub, K., Gaouar, N., 2017. Phenolics compounds of olive and olive leaves

identified in the resistance to prays oleae (Bernard). Plant Archives 2017 Vol.17 No.2 pp.1761-1764 ref.17

Iqbal, Z., Iqbal, M.S., Hashem, A., Abd_Allah, E.F., Ansari, M.I., 2021. Plant defense responses to biotic stress and its interplay with fluctuating dark/light conditions. Front. Plant Sci. 12, 631810.

Issa, T., Almadi, L., Jarrar, S., Tucci, M., Buonauro, R., Famiani, F., 2019. Factors affecting *Venturia oleaginea* infections on olive and effects of the disease on floral biology. Phytopathol. Mediterr. 58, 221–230.

Jadalla, N.M., Behiry, S.I., Adam, M.A.M., 2018. Molecular Detection and Pathogenic Capability of *Agrobacterium tumefaciens* Isolates from Olive. Alexandria Sci. Exch. J. 39, 521–526.

Jain, D., Khurana, J.P., 2018. Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. Mol. Asp. plant-pathogen Interact. 265–281.

Janse, J.D., Obradovic, A., 2010. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. J. Plant Pathol. S35–S48.

Jayaraj, J., Punja, Z.K., 2007. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. Plant Cell Rep. 26, 1539–1546.

Jiang, C.-H., Huang, Z.-Y., Xie, P., Gu, C., Li, K., Wang, D.-C., Yu, Y.-Y., Fan, Z.-H., Wang, C.-J., Wang, Y.-P., 2016. Transcription factors WRKY70 and WRKY11 served as regulators in rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156-induced systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 67, 157–174.

Johnson, M.T.J., Carpenter, E.J., Tian, Z., Bruskiwich, R., Burris, J.N., Carrigan, C.T., Chase, M.W., Clarke, N.D., Covshoff, S., Depamphilis, C.W., 2012. Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. PLoS One 7, e50226.

Kaloshian, I., 2004. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. J. Chem. Ecol. 30, 2419–2438.

- Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., Suzutani, T., 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 499–501.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., Fritig, B., 1987. Biological function of ‘pathogenesis-related’ proteins: four PR proteins of tobacco have 1, 3- β -glucanase activity. *EMBO J.* 6, 3209–3212.
- Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12, 357–360.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14, 1–13.
- Ku, Y.-S., Sintaha, M., Cheung, M.-Y., Lam, H.-M., 2018. Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3206.
- Kubota, R., Alvarez, A.M., Su, W.W., Jenkins, D.M., 2011. FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biol. Eng. Trans.* 4, 81–100.
- Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., Pareek, N., 2018. Chitinases—potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. *Agriculture* 8, 88.
- Kumar, R., Ichihashi, Y., Kimura, S., Chitwood, D.H., Headland, L.R., Peng, J., Maloof, J.N., Sinha, N.R., 2012. A high-throughput method for Illumina RNA-Seq library preparation. *Front. Plant Sci.* 3, 202.
- Kusch, S., Panstruga, R., 2017. mlo-based resistance: an apparently universal “weapon” to defeat powdery mildew disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, 179–189.
- Lambert, I., Paysant-Le Roux, C., Colella, S., Martin-Magniette, M.-L., 2020. DiCoExpress: a tool to process multifactorial RNAseq experiments from quality controls to co-expression analysis through differential analysis based on contrasts inside GLM models. *Plant Methods* 16, 1–10.

- Lanza, B., Ragnelli, A.M., Priore, M., Aimola, P., 2017. Morphological and histochemical investigation of the response of *Olea europaea* leaves to fungal attack by *Spilocaea oleagina*. *Plant Pathol.* 66, 1239–1247.
- Lavee, S., Hanoch, E., Wodner, M., Abramowitch, H., 2007. The effect of predetermined deficit irrigation on the performance of cv. Muhasan olives (*Olea europaea* L.) in the eastern coastal plain of Israel. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 112, 156–163.
- Lazebnik, J., Frago, E., Dicke, M., van Loon, J.J.A., 2014. Phytohormone mediation of interactions between herbivores and plant pathogens. *J. Chem. Ecol.* 40, 730–741.
- Leannec-Rialland, V., Atanasova, V., Chereau, S., Tonk-Rügen, M., Cabezas-Cruz, A., Richard-Forget, F., 2022. Use of defensins to develop eco-friendly alternatives to synthetic fungicides to control phytopathogenic fungi and their mycotoxins. *J. Fungi* 8, 229.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B., 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 6750–6754.
- Lievens, B., Grauwet, T.J.M.A., Cammue, B.P.A., Thomma, B.P.H.J., 2005. Recent developments in diagnostics of plant pathogens: a review. *Recent Res. Dev. Microbiol.* Vol. 9, Part I 57–79.
- LIU, P., Bhattacharjee, S., Klessig, D.F., Moffett, P., 2010. Systemic acquired resistance is induced by R gene-mediated responses independent of cell death. *Mol. Plant Pathol.* 11, 155–160.
- Loprieno, N., Tenerini, I., 1959. Metodo per la diagnosi precoce dell'«cchio di pavone» dell'olivo (*Cycloconium oleaginum* Cast.). *J. Phytopathol.* 34, 385–392.
- Lops, F., Frisullo, S., Rossi, V., 1993. Studies on the spread of the olive scab pathogen, *Spilocaea oleagina* 1. *EPPO Bull.* 23, 385–387.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A., Santos, C., 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54, 21–25.

- Luvisi, A., Aprile, A., Sabella, E., Vergine, M., Nicoli, F., Nutricati, E., Miceli, A., Negro, C., De Bellis, L., 2017. *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (CoDiRO strain) infection in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars: Profile of phenolic compounds in leaves and progression of leaf scorch symptoms. *Phytopathol. Mediterr.* 259–273.
- Madlung, A., Comai, L., 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann. Bot.* 94, 481–495.
- Martelli, G.P., 2016. The current status of the quick decline syndrome of olive in southern Italy. *Phytoparasitica* 44, 1–10.
- Martelli, G.P., 1999. Infectious diseases and certification of olive: an overview. *EPPO Bull.* 29, 127–133.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* 17, 10–12.
- Martinelli, F., Marchese, A., Giovino, A., Marra, F.P., Della Noce, I., Caruso, T., Dandekar, A.M., 2019. In-field and early detection of *Xylella fastidiosa* infections in olive using a portable instrument. *Front. Plant Sci.* 9, 2007.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L.R., 2015. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 1–25.
- Marusina, K., 2017. Positioning Digital PCR for Sharper Genomic Views. *Genet. Eng. Biotechnol. News* 37, 1–8.
- Masoodi, K.Z., Ahmed, N., Mir, M.A., Bhat, B., Shafi, A., Mansoor, S., Rasool, R.S., Yaseen, M., Dar, Z.A., Mir, J.I., 2022. Comparative transcriptomics unravels new genes imparting scab resistance in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Funct. Integr. Genomics* 22, 1315–1330.
- Mastouri, F., Björkman, T., Harman, G.E., 2012. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol. plant-microbe Interact.* 25, 1264–1271.

- McDermaid, A., Monier, B., Zhao, J., Liu, B., Ma, Q., 2019. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Brief. Bioinform.* 20, 2044–2054.
- Mekuria, G.T., Collins, G., Sedgley, M., Lavee, S., 2001. Identification of genetic markers in olive linked to olive leaf spot resistance and susceptibility. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126, 305–308.
- Mirmajlessi, S.M., Destefanis, M., Gottsberger, R.A., Mänd, M., Loit, E., 2015. PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: a systematic review. *Syst. Rev.* 4, 1–11.
- Misra, R.C., Kamthan, M., Kumar, S., Ghosh, S., 2016. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 6, 1–14.
- Monaghan, J., Zipfel, C., 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 349–357.
- Morrison, D.A., Morgan, M.J., Kelchner, S.A., 2015. Molecular homology and multiple-sequence alignment: an analysis of concepts and practice. *Aust. Syst. Bot.* 28, 46–62.
- Munis, M.F.H., Tu, L., Deng, F., Tan, J., Xu, L., Xu, S., Long, L., Zhang, X., 2010. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 38–44.
- Mur, L.A.J., Laarhoven, L.J.J., Harren, F.J.M., Hall, M.A., Smith, A.R., 2008. Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiol.* 148, 1537–1546.
- Muthamilarasan, M., Prasad, M., 2013. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J. Biosci.* 38, 433–449.
- Muzzalupo, I., Vendramin, G.G., Chiappetta, A., 2014. Genetic biodiversity of Italian olives (*Olea europaea*) germplasm analyzed by SSR markers. *Sci. World J.* 2014.

- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16, 223–229.
- Nagashima, Y., Niyakan, S., He, K., Singh, J., Metrani, R., Crosby, K.M., Jifon, J., Jayaprakasha, G., Patil, B., Qian, X., 2022. Differential Expression of Transcription Factors in Developing Melon Fruits, in: *Melon Breeding and Genetics: Developments in Food Quality & Safety*. ACS Publications, pp. 3–21.
- Nguyen, D., Rieu, I., Mariani, C., van Dam, N.M., 2016. How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. *Plant Mol. Biol.* 91, 727–740.
- Niessen, L., 2015. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 553–574.
- Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 38–46.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtpong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M., Nielsen, J., 2012. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 40, 10084–10097.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63–e63. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.12.E63>
- Notomi, Tsugunori, Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63–e63.
- Novelli, S., Gismondi, A., Di Marco, G., Canuti, L., Nanni, V., Canini, A., 2019. Plant defense factors involved in *Olea europaea* resistance against *Xylella fastidiosa* infection. *J. Plant Res.* 132, 439–455.
- O’Sullivan, M., 2018. The pterosaur assemblage of the Oxford Clay Formation (Jurassic,

Callovian–Oxfordian) from the UK. Geol. Soc. London, Spec. Publ. 455, 171–180.

- Obanor, E.O., Walter, M., Jones, E.E., Jaspers, M. V, 2005a. Sources of variation in a field evaluation of the incidence and severity of olive leaf spot. New Zeal. Plant Prot. 58, 273–277.
- Obanor, E.O., Walter, M., Jones, E.E., Jaspers, M. V, 2005b. In vitro effects of fungicides on conidium germination of *Spilocaea oleagina* the cause of olive leaf spot. New Zeal. Plant Prot. 58, 278–282.
- Obanor, F.O., Walter, M., Jones, E.E., Jaspers, M. V, 2008. Effect of temperature, relative humidity, leaf wetness and leaf age on *Spilocaea oleagina* conidium germination on olive leaves. Eur. J. Plant Pathol. 120, 211–222.
- Obied, H.K., Bedgood Jr, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., 2007. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 603, 176–189.
- Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S., Cheong, H., Park, O.K., 2005. Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. Plant Cell 17, 2832–2847.
- Ouerghi, F., Rhouma, A., Rassaa, N., Hennachi, I., Nasraoui, B., 2016. Factors affecting resistance of two olive cultivars to leaf spot disease in the north west of Tunisia. Eur. J. Adv. Res. Biol. Life Sci. Vol 4.
- Owens, R.A., Doyle, S., 2021. Effects of antifungal agents on the fungal proteome: informing on mechanisms of sensitivity and resistance. Expert Rev. Proteomics 18, 185–199.
- Pallas, V., García, J.A., 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. J. Gen. Virol. 92, 2691–2705.
- Palmeri, R., Parafati, L., Trippa, D., Siracusa, L., Arena, E., Restuccia, C., Fallico, B., 2019. Addition of olive leaf extract (OLE) for producing fortified fresh pasteurized milk with an extended shelf life. Antioxidants 8, 255.
- Patel, J.S., Brennan, M.S., Khan, A., Ali, G.S., 2015. Implementation of loop-mediated isothermal amplification methods in lateral flow devices for the detection of *Rhizoctonia*

solani. Can. J. plant Pathol. 37, 118–129.

Pépin, N., Hebert, F.O., Joly, D.L., 2021. Genome-wide characterization of the MLO gene family in *Cannabis sativa* reveals two genes as strong candidates for powdery mildew susceptibility. Front. Plant Sci. 12, 729261.

Pichersky, E., 2023. Biochemistry and Genetics of Floral Scent—A Historical Perspective. Plant J.

Pieterse, C.M.J., Ton, J., Van Loon, L.C., 2001. Cross-talk between plant signalling pathways: boost or burden. AgBiotechNet 3, 1–8.

Pott, D.M., Osorio, S., Vallarino, J.G., 2019. From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. Front. Plant Sci. 835.

Purcell, A.H., Hopkins, D.L., 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 34, 131–151.

Quail, M.A., Kozarewa, I., Smith, F., Scally, A., Stephens, P.J., Durbin, R., Swerdlow, H., Turner, D.J., 2008. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. Nat. Methods 5, 1005–1010.

Rahioui, B., Aissam, S., Messaouri, H., Moukhli, A., Khadari, B., El Modafar, C., 2013. Role of phenolic metabolism in the defense of the olive-tree against leaf-spot disease caused by *Spilocaea oleagina*. Int. J. Agric. Biol. 15.

Rahioui, B., El-Aabidine, A.Z., Baissac, Y., El-Boustani, E., Khadari, B., Jay-Allemand, C., El-Modafar, C., 2009. Phenolic compounds of olive-tree leaves and their relationship with the resistance to the leaf-spot disease caused by *Spilocaea oleaginea*. Am. J. Agric. Environ. Sci. 5, 204–214.

Ramirez-Tortosa, M.C., Granados, S., Quiles, J.L., 2006. Chemical composition, types and characteristics of olive oil. Olive Oil Heal. 45–61.

Rapaport, F., Khanin, R., Liang, Y., Pirun, M., Krek, A., Zumbo, P., Mason, C.E., Socci, N.D., Betel, D., 2013. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods

for RNA-seq data. *Genome Biol.* 14, 1–13.

Reymond, P., Farmer, E.E., 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404–411.

Ricciardi, V., Marcianò, D., Sargolzaei, M., Fassolo, E.M., Fracassetti, D., Brillì, M., Moser, M., Vahid, S.J., Tavakole, E., Maddalena, G., 2022. Dissecting the susceptibility/resistance mechanism of *Vitis vinifera* for the future control of downy mildew, in: *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences, p. 4002.

Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D.I., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K., 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47–e47.

Roca, L.F., Moral, J., Viruega, J.R., Ávila, A., Oliveira, R., Trapero, A., 2007. Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea* 26, 48–50.

Roppolo, D., Boeckmann, B., Pfister, A., Boutet, E., Rubio, M.C., Déneraud-Tendon, V., Vermeer, J.E.M., Gheyselinck, J., Xenarios, I., Geldner, N., 2014. Functional and evolutionary analysis of the CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN family. *Plant Physiol.* 165, 1709–1722.

Rossmann, A.Y., Crous, P.W., Hyde, K.D., Hawksworth, D.L., Aptroot, A., Bezerra, J.L., Bhat, J.D., Boehm, E., Braun, U., Boonmee, S., 2015. Recommended names for pleomorphic genera in Dothideomycetes. *IMA Fungus* 6, 507–523.

Rugini, E., De Pace, C., Gutiérrez-Pesce, P., Muleo, R., 2010. *Olea*, in: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits*. Springer, pp. 79–117.

Sabella, E., Luvisi, A., Aprile, A., Negro, C., Vergine, M., Nicoli, F., Miceli, A., De Bellis, L., 2018. *Xylella fastidiosa* induces differential expression of lignification related-genes and lignin accumulation in tolerant olive trees cv. Leccino. *J. Plant Physiol.* 220, 60–68.

Sadder, M.T., Alshomali, I., Ateyyeh, A., Musallam, A., 2021. Physiological and molecular responses for long term salinity stress in common fig (*Ficus carica* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 27, 107–117.

- Safi, H., Saibi, W., Alaoui, M.M., Hmyene, A., Masmoudi, K., Hanin, M., Brini, F., 2015. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 89, 64–75.
- Saijo, Y., Loo, E.P., 2020. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol.* 225, 87–104.
- Saintenac, C., Lee, W.-S., Cambon, F., Rudd, J.J., King, R.C., Marande, W., Powers, S.J., Bergès, H., Phillips, A.L., Uauy, C., 2018. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nat. Genet.* 50, 368–374.
- Sanei, S.J., Razavi, S.E., 2011. Survey of *Spilocaea oleagina*, causal agent of olive leaf spot, in the north of Iran. *J. Yeast Fungal Res.* 2, 33–38.
- Saponari, M., Boscia, D., Altamura, G., Loconsole, G., Zicca, S., D’Attoma, G., Morelli, M., Palmisano, F., Saponari, A., Tavano, D., 2017. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy. *Sci. Rep.* 7, 1–13.
- Saponari, M., Manjunath, K., Yokomi, R.K., 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *J. Virol. Methods* 147, 43–53.
- Schaad, N.W., Frederick, R.D., 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. plant Pathol.* 24, 250–258.
- Schena, L., Agosteo, G.E., Cacciola, S.O., Sergeeva, V., 2011. Olive diseases and disorders. Kerala, India Transw. Res. Netw. 1–21.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U., Boller, T., 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324, 365–367.
- Scibetta, S., Agosteo, G.E., Abdelfattah, A., Li Destri Nicosia, M.G., Cacciola, S.O., Schena, L., 2020. Development and application of a quantitative PCR detection method to quantify *Venturia oleaginea* in asymptomatic olive (*Olea europaea*) leaves. *Phytopathology* 110, 547–555.

- Sebastiani, L., Marchi, S., Guidotti, D., Niccolai, M., Ricciolini, M., 2006. Sviluppo e applicazione di un sistema informativo on-line per il monitoraggio della maturazione dell'olive della cultivar. Riv. Ital. DI Agrometeorol. 124–125.
- Sgamma, T., Forgione, I., Luziatelli, F., Iacona, C., Mancinelli, R., Thomas, B., Ruzzi, M., Muleo, R., 2021. Monochromic radiations provided by light emitted diode (LED) modulate infection and defense response to fire blight in pear trees. Plants 10, 1886.
- Silva, P.M., Gonçalves, S., Santos, N.C., 2014. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. Front. Microbiol. 5, 97.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C., Wichers, H.J., 2000. Oleuropein and related compounds. J. Sci. Food Agric. 80, 1013–1023.
- Solgi, T., Moradyar, M., Zamani, M.R., Motallebi, M., 2015. Transformation of canola by chit33 gene towards improving resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Prot. Sci. 51, 6–12.
- Souza, T.P., Dias, R.O., Silva-Filho, M.C., 2017. Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. Genet. Mol. Biol. 40, 360–372.
- Spoel, S.H., Dong, X., 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. Nat. Rev. Immunol. 12, 89–100.
- Steijger, T., Abril, J.F., Engström, P.G., Kokocinski, F., Hubbard, T.J., Guigó, R., Harrow, J., Bertone, P., 2013. Assessment of transcript reconstruction methods for RNA-seq. Nat. Methods 10, 1177–1184.
- Struyfs, C., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2021. Membrane-interacting antifungal peptides. Front. cell Dev. Biol. 9, 649875.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2006. Secondary metabolites and plant defense. Plant Physiol. 4, 315–344.
- Tanner, N.A., Zhang, Y., Evans Jr, T.C., 2012. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. Biotechniques 53, 81–89.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F., 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. Plant Cell 15, 317–330.

- Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A., Conesa, A., 2011. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* 21, 2213–2223.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., Stitt, M., 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37, 914–939.
- Thomidis, T., Michos, K., Chatzipapadopoulos, F., Tampaki, A., 2021. Evaluation of two predictive models for forecasting olive leaf spot in northern Greece. *Plants* 10, 1200.
- Thor, K., Jiang, S., Michard, E., George, J., Scherzer, S., Huang, S., Dindas, J., Derbyshire, P., Leitão, N., DeFalco, T.A., 2020. The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity. *Nature* 585, 569–573.
- Tomlinson, J.A., Barker, I., Boonham, N., 2007. Faster, simpler, more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4040–4047.
- Trapnell, C., Hendrickson, D.G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., Pachter, L., 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat. Biotechnol.* 31, 46–53.
- Vaghela, B., Vashi, R., Rajput, K., Joshi, R., 2022. Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme Microb. Technol.* 159, 110055.
- Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R.C., Crous, P.W., Thomma, B.P.H.J., 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 239–277.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70, 1581–1588.
- Van Gent-Pelzer, M.P.E., Krijger, M., Bonants, P.J.M., 2010. Improved real-time PCR assay for detection of the quarantine potato pathogen, *Synchytrium endobioticum*, in zonal centrifuge extracts from soil and in plants. *Eur. J. plant Pathol.* 126, 129–133.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related

proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.

Van Loon, L.C., Van Kammen, A., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’: II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 199–211.

Van Loon, L.C., Van Strien, E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85–97.

Vazquez Roncero, A., Janer Del Valle, L., Janer Del Valle, C., 1976. Componentes fenólicos de la aceituna. III. Polifenoles del aceite. *Grasas Aceites* 27, 185–191.

Vergine, M., Meyer, J.B., Cardinale, M., Sabella, E., Hartmann, M., Cherubini, P., De Bellis, L., Luvisi, A., 2019. The *Xylella fastidiosa*-resistant olive cultivar “Leccino” has stable endophytic microbiota during the olive quick decline syndrome (OQDS). *Pathogens* 9, 35.

Viruega, J.R., Moral, J., Roca, L.F., Navarro, N., Trapero, A., 2013. *Spilocaea oleagina* in olive groves of southern Spain: survival, inoculum production, and dispersal. *Plant Dis.* 97, 1549–1556.

Viruega, J.R., Trapero, A., 2000. Effect of temperature, wetness duration and leaf age on infection and development of olive leaf spot, in: IV International Symposium on Olive Growing 586. pp. 797–800.

Viruega, J.R., Trapero, A., 1997. Epidemiology of leaf spot of olive tree caused by *Spilocaea oleagina* in southern Spain, in: III International Symposium on Olive Growing 474. pp. 531–534.

Voelkerding, K. V., Dames, S.A., Durtschi, J.D., 2009. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* 55, 641–658.

Wallis, C.M., Wallingford, A.K., Chen, J., 2013. Grapevine rootstock effects on scion sap phenolic levels, resistance to *Xylella fastidiosa* infection, and progression of Pierce’s disease. *Front. Plant Sci.* 4, 502.

Ward, E., Foster, S.J., Fraaije, B.A., McCartney, H.A., 2004. Plant pathogen diagnostics:

immunological and nucleic acid-based approaches. *Ann. Appl. Biol.* 145, 1–16.

Wendl, M.C., Barbazuk, W.B., 2005. Extension of Lander-Waterman theory for sequencing filtered DNA libraries. *BMC Bioinformatics* 6, 1–12.

Wolf, J.B.W., 2013. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 559–572.

Xu, Y.I., Chang, P.-F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6, 1077–1085.

Yadav, V., Wang, Z., Wei, C., Amo, A., Ahmed, B., Yang, X., Zhang, X., 2020. Phenylpropanoid pathway engineering: An emerging approach towards plant defense. *Pathogens* 9, 312.

Yang, B., Song, Z., Li, C., Jiang, J., Zhou, Y., Wang, R., Wang, Q., Ni, C., Liang, Q., Chen, H., 2018. RSM1, an *Arabidopsis* MYB protein, interacts with HY5/HYH to modulate seed germination and seedling development in response to abscisic acid and salinity. *PLoS Genet.* 14, e1007839.

Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., Wang, C., 2019. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 10, 1349.

Yang, Y., Shah, J., Klessig, D.F., 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11, 1621–1639.

Ye, X.Y., Wang, H.X., Ng, T.B., 1999. First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 130–134.

Yoshioka, H., Mase, K., Yoshioka, M., Kobayashi, M., Asai, S., 2011. Regulatory mechanisms of nitric oxide and reactive oxygen species generation and their role in plant immunity. *Nitric Oxide* 25, 216–221.

- Zamora-Macorra, M., de Castro, E.F.A., Ávila-Funes, J.A., Manrique-Espinoza, B.S., López-Ridaura, R., Sosa-Ortiz, A.L., Shields, P.L., Del Campo, D.S.M., 2017. The association between social support and cognitive function in Mexican adults aged 50 and older. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 68, 113–118.
- Zeilmaker, T., Ludwig, N.R., Elberse, J., Seidl, M.F., Berke, L., Van Doorn, A., Schuurink, R.C., Snel, B., Van den Ackerveken, G., 2015. DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR 6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. *Plant J.* 81, 210–222.
- Zhang, L., Guo, X., Zhang, Z., Wang, A., Zhu, J., 2021. Cold-regulated gene LeCOR413PM2 confers cold stress tolerance in tomato plants. *Gene* 764, 145097.
- Zhang, Y., Xu, S., Ding, P., Wang, D., Cheng, Y.T., He, J., Gao, M., Xu, F., Li, Y., Zhu, Z., 2010. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18220–18225.
- Zhang, Z.H., Jhaveri, D.J., Marshall, V.M., Bauer, D.C., Edson, J., Narayanan, R.K., Robinson, G.J., Lundberg, A.E., Bartlett, P.F., Wray, N.R., 2014. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data. *PLoS One* 9, e103207.
- Zhu, X., Li, Z., Xu, H., Zhou, M., Du, L., Zhang, Z., 2012. Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistances to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. *Funct. Integr. Genomics* 12, 481–488.

Publicazioni scientifiche

Trippa, D., Scalenghe, R., Basso, M.F., Panno, S., Davino, S., Morone, C., Giovino, A., Oufensou, S., Luchi, N., Yousefi, S. and Martinelli, F., 2023. Next-generation methods for early disease detection in crops. A review. *Pest Management Science*. DOI: 10.1002/ps.7733

Marchese, A., Balan, B., Trippa, D.A., Bonanno, F., Caruso, T., Imperiale, V., Marra, F.P., Giovino, A. (2023). NGS transcriptomic analysis uncovers the possible resistance mechanisms of olive to *Spilocaea oleagina* leaf spot infection. *Frontiers in Plant Science*, 14:1219580. doi: 10.3389/fpls.2023.1219580

Marchese, A., Bonanno, F., Marra, F.P., Trippa, D.A., Zelasco, S., Rizzo, S., Giovino, A., Imperiale, V., Ioppolo, A., Sala, G. Granata, I., Caruso, T. (2023). Recovery and genotyping ancient Sicilian monumental olive trees. *Frontiers in Conservation Science*, 4, p.1206832. doi: 10.3389/fcosc.2023.1206832

Bertacca, S., Caruso, A.G., Trippa, D., Marchese, A., Giovino, A., Matic, S., Noris, E., Ambrosio, M.I.F.S., Alfaro, A., Panno, S., Davino, S. (2022). Development of a Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Rapid Detection of *Olea Europaea Geminivirus*. *Plants*, 11(5), 660. DOI: 10.3390/plants11050660

Imperiale, V., Cutuli, M., Marchese, A., Trippa, D. A., Caruso, T., Marra, F. P. (2021). Estimation of chilling and heat requirements of six sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*, 1342, 115-122 DOI: 10.17660/ActaHortic.2022.1342.16 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2022.1342.16>

Atti a Convegno

Marchese A., Balan B., Bonanno F., Caruso T., Giovino A., Imperiale V., Marino G., Trippa D. A., Marra F.P. (2023). RNA-Seq analyses reveal the possible molecular bases of resistance against leaf spot infection in olive and candidate genes underlying the resistance”. Book of Abstracts Oral Presentations Convegno Internazionale “IX International Olive Symposium 10-14 settembre 2023, Davis (USA).

Caruso T., Marra F.P., Zelasco S., Giovino A., Bonanno F., Imperiale V., Ioppolo A., Trippa D. A., Sala G., Marchese A. (2023). Exploring the genetic diversity of monumental olive trees from South-Western Sicily. Book of Abstracts Oral Presentations Convegno Internazionale “IX International Olive Symposium 10-14 settembre 2023, Davis (USA).

Lee C., Mena-Morales A., Marchese A., Giovino A., Trippa D., Martínez E., Marra F.P., Marchante Cuevas L., Cattivelli L., Bagnaresi P., Carbonell-Bejerano P., Monroe G.J. (2023). Recent progress on genome assemblies and annotation of six pistachio cultivars. VIII International Symposium on Almonds and Pistachios - UC Davis – USA, 7-11, maggio 2023.

Lee C., Carbonell-Bejerano P., Mena Morales, A., Marchese A., Giovino A., Trippa D., Martínez E., Marra F.P., Marchante Cuevas L., Cattivelli L., Bagnaresi P., Monroe G. J. (2023). Haplotype-

Resolved Genome Assemblies and a Pan-Genome of Six Pistachio Cultivars. International Plant and Animal Genome Conference, San Diego, CA, USA, 13-18 gennaio 2023.

Chaehee Lee, Pablo Carbonell-Bejerano, Adela Mena-Morales, Annalisa Marchese, Antonio Giovino, Daniela Trippa, Esaú Martínez, Francesco Paolo Marra, Lourdes Marchante Cuevas, Luigi Cattivelli, Paolo Bagnaresi, Grey J. Monroe. Chromosome-scale Haplotype-resolved Genome Assemblies and a Pan-Genome of Six Pistachio Cultivars. International Plant and Animal Genome Conference. https://plan.core-apps.com/pag_2023/abstract/7d686e5d4c7cd9f48449347cbcf7d23–

Trippa D. A., Marra F. P., Marchese A., Bonanno F., Davino S., Caruso T., Imperiale V., Campisi G., Giovino A. (2022). Screening preliminare del germoplasma di olivo siciliano per l'identificazione di presunti genotipi resilienti a *Spilotea oleagina* mediante metodi di rilevamento classico e tecniche molecolari di diagnosi precoce. V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio, Alghero, 26-28 ottobre.

Marchese A., Bonanno F., Trippa D. A., Zelasco S., Imperiale V., Fretto S., Sala G., Festosi S., Carta M., Giovino A., Marra F. P., Caruso T. (2022). Indagine della diversità genetica di alberi monumentali siciliani mediante l'uso di marcatori morfologici e Simple Sequence Repeat (SSR). V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio, Alghero 26-28 ottobre 2022.