

Rendiconto OLEA A – I Anno

U.O. CRA-OLI

Responsabile: Samanta Zelasco

WorkPackage 8: Tolleranza e resistenza agli stress abiotici e biotici

Obiettivi della ricerca

Acquisizione di maggiori conoscenze sulla variabilità genetica delle cultivar di olivo in relazione alla risposta all'infezione di differenti patotipi di *Verticillium dahliae* e dei meccanismi di risposta della pianta all'infezione del patogeno attraverso approcci ultrastrutturali, metabolomici e molecolari

Attività svolte (Max 15.000 caratteri spazi inclusi)

Prova sperimentale di suscettibilità genotipica al *Verticillium dahliae*

La prova sperimentale è stata condotta utilizzando 6 cultivar (Arbequina, Arbosana, Frantoio, Ottobratica, Sant Agostino e Urano) e 4 ceppi non defoglianti (ND) e 1 ceppo defogliante (D) di *V. dahliae*, denominati "F ND Sicilia", "ND M Puglia", "D Puglia", "ND Calabria" e "ND Umbria". Ad eccezione del ceppo "ND M" che è stato isolato da mandorlo gli altri sono stati ottenuti da olivo mediante isolamento su PDA (**Patata-Destrosio Agar**) a pH 5.5. Dieci piantine per ogni varietà sono state inoculate artificialmente con i cinque ceppi di *V. dahliae*, mentre altre dieci piante per varietà sono state utilizzate come controllo. È stata adottata la **tecnica della ferita su fusto**. Le piantine di circa 18 mesi di età e alte circa 160 cm, sono state infettate mediante inoculo a ferita. Un tassello di agar, prelevato da una colonia di ceppi di *Verticillium dahliae* di 30 gg di età, è stato collocato sul fusto dopo aver rimosso la corteccia, poi il sito di inoculazione è stato coperto con cotone umido e avvolto con parafilm per prevenire l'essiccamento. Le piante controllo sono state inoculate allo stesso modo utilizzando tasselli di solo PDA. Dopo l'inoculazione tutte le piantine sono state collocate in serra, in condizioni assolutamente controllate, e tenute in osservazione per circa un anno.

Ottenimento di RNA idoneo al sequenziamento con piattaforma ILLUMINA GAIIX

Nel mese di agosto è stata avviata una prova sperimentale utilizzando talee autoradicate di circa 8 mesi di età delle cultivar Leccino e Dolce Agogia ed un ceppo defogliante di *Verticillium dahliae*. L'inoculo è stato preparato mediante lavaggio della rispettiva colonia allevata su PDA per 7 gg. a 25°C. La concentrazione della relativa sospensione conidica ottenuta è stata aggiustata a 10^7 conidi/ml. Le piantine sono state inoculate artificialmente per **immersione dell'apparato radicale nella sospensione conidica** di *V. dahliae* per 30 min. Con la stessa tecnica utilizzando, al posto della sospensione conidica, acqua deionizzata sterilizzata, sono state inoculate altre piantine testimone per ciascuna varietà. Dopo l'inoculazione tutte le piantine sono state collocate in serra climatizzata a 23 -26 °C. Le piantine sono state monitorate quotidianamente e sono stati effettuati reisolamenti settimanalmente per il monitoraggio dell'infezione fungina a livello dell'apparato

radicale e del fusto con lo scopo di prelevare tessuto vegetale infetto dal patogeno per l'estrazione di RNA, a partire dal mese di ottobre.

Parallelamente sullo stesso materiale vegetale sono state eseguite prove di estrazione di RNA totale con lo scopo di ottenere un'elevata resa e qualità dell'RNA come richiesto per la preparazione delle librerie nell'approccio di RNAseq. Sono stati messi a confronto due kit commerciali (Ambion e QIAGEN) e testate differenti condizioni sperimentali nel trattamento e conservazione del campione prima dell'estrazione. E' stato testata l'efficienza di RNA later (Ambion) per la stabilizzazione dell'RNA in fusto di olivo rispetto al congelamento diretto in azoto liquido.

Analisi dei biofenoli nel fusto in risposta all'infezione di *V.dahliae*

Non avendo ottenuto infezione nelle talee radicate della prova sperimentale condotta su Leccino e Dolce Agogia, si è comunque proceduto ad un'analisi preliminare dei biofenoli presenti in fusto, con lo scopo di mettere a punto le condizioni sperimentali idonee. Per l'identificazione dei composti presenti negli estratti fenolici da talea di olivo, è stata impiegata la tecnica LC-MS/MS utilizzando come interfaccia la ionizzazione elettrospray (ESI); tale tecnica di ionizzazione, più soft rispetto ad altre tecniche quali la ionizzazione chimica a pressione atmosferica, determina una frammentazione molto blanda dei composti ionizzati, fornendo spettri di massa in cui in genere il picco base è rappresentato dallo ione pseudomolecolare [M-H]. Le analisi di spettrometria di massa sono state realizzate con lo strumento API 4000 QTRAP (AB Sciex Instrument). L'acquisizione è stata condotta in modalità negativa in quanto ha consentito di ottenere spettri più puliti e più semplici da interpretare e l'identificazione dei composti è stata basata sulla ricerca dello ione pseudo molecolare [M-H] e dall'interpretazione dei suoi frammenti indotti per collisione. Gli spettri di massa sono stati ottenuti alle condizioni seguenti: ion spray voltage -4500 V, potenziale di declustering (DP) -70 V, energia di collisione della cella in uscita (CXP) -5 V, gas di collisione (CAD) medium, curtain gas (CUR) 20, ion source gas 1 (GS1) 30, ion source gas 2 (GS2) 45.

Localizzazione ultrastrutturale dei livelli di avanzamento dell'infezione all'interno degli organi epigei delle cultivar in esame

Nel corso della prova di infezione radicale, 4 campioni di fusto derivanti da piante controllo della cultivar Leccino, sono stati prelevati ed immediatamente fissati in glutaraldeide 3% in tampone cacodilato (Na-arseniato) 0.05 M pH 7.2, lavati nello stesso tampone, disidratati in etanolo a crescente concentrazione (10-100%), essiccati mediante *critical point drying*, ricoperti con uno strato di oro di 25nm ed infine osservati al microscopio elettronico a scansione (Philips XL 20 SEM).

Risultati ottenuti(Max 6.000 caratteri spazi inclusi)

Prova sperimentale di suscettibilità genotipica al *Verticillium dahliae*

La cultivar Arbequina si è dimostrata suscettibile al ceppo "D Puglia" e al ceppo isolato da mandorlo "ND M Puglia", Sant'Agostino e Ottobratica hanno mostrato suscettibilità nei confronti di 3 ceppi "F ND Sicilia", "ND M Puglia", "D Puglia" confermando i dati già presenti in letteratura sulla loro suscettibilità. La cultivar Arbosana ha mostrato una certa suscettibilità solo nei confronti del ceppo "ND M Puglia". Le cultivar Frantoio e Urano si sono dimostrate tolleranti a tutti e cinque i ceppi. Anche per la cultivar Frantoio si è avuto una conferma del dato già presente in bibliografia. Per l'urano invece questi sono i primi dati relativi al comportamento della cultivar nei confronti del *Verticillium*. E' importante sottolineare che il saggio condotto con la tecnica dell'infezione al fusto ha confermato i risultati ottenuti con altre tecniche di inoculo prevalentemente eseguite mediante l'infezione dell'apparato radicale, perciò è da considerarsi un buon sistema anche se richiede piante

di grandi dimensioni (almeno 18 mesi) e quindi anche i tempi di risposta della pianta necessariamente si allungano. Alcuni autori sostengono che questo metodo di inoculo scavalca eventuali risposte di resistenza messi in atto dalla pianta a livello radicale. I risultati della prova sembrano indicare che i meccanismi di resistenza confinati ai tessuti legnosi siano sufficienti a contrastare l'avanzamento del fungo.

Ottenimento di RNA idoneo al sequenziamento con piattaforma ILLUMINA GAIIx

I reisolamenti sistematici condotti settimanalmente fino al mese di gennaio sulle talee di Leccino e Dolce Agogia inoculate con il ceppo defogliante di *V. dahliae*, non hanno rilevato la presenza del patogeno.

Pertanto è stata avviata all'inizio di febbraio, una prova sperimentale utilizzando lo stesso materiale vegetale, ma adottando il sistema di inoculo radicale del "pane di terra" e la tecnica della ferita al fusto. Al momento non è ancora stata rilevata alcuna sintomatologia.

E' stato poi eseguito un monitoraggio dell'infezione su alcune piante precedentemente utilizzate nella prova di suscettibilità genotipica sopra descritta con la tecnica di inoculo al fusto, attraverso il prelievo di porzioni di fusto e radice in diverse zone della pianta ed isolamento del patogeno. Il monitoraggio visivo delle porzioni di fusto ha permesso di individuare presumibilmente l'area di infezione del fungo. Nella cultivar Urano (resistente, senza alcuna sintomatologia) è stata osservata un'area necrotica che interessa un numero ridotto di vasi xilematici e non estesa al di sopra di 2 cm rispetto al punto di infezione, mentre per la cultivar Sant'Agostino (suscettibile e con sintomatologia estesa) è stata osservata un'area necrotica che ha interessato un numero maggiore di vasi xilematici, ma comunque anch'essa non estesa al di sopra di 2 cm dalla zona di infezione. I reisolamenti condotti sulle piante non hanno tuttavia rilevato la presenza di patogeno dimostrando una mancata attività metabolica, probabilmente dovuta al fatto che *V. dahliae* non ha più trovato le condizioni per la sopravvivenza (alla fine della prova le piante sono state allevate in condizioni ambientali non più termicamente idonee ad un ulteriore sviluppo del fungo, inoltre pur mostrando una certa sintomatologia, le piante sembra che abbiano confinato l'infezione). Nel secondo anno del progetto si eseguirà una *detection in planta* a livello molecolare. Con questo metodo è possibile rilevare la presenza del patogeno anche se non più metabolicamente attivo e si condurrà l'analisi ultrastrutturale anche per individuare la presenza di ife fungine.

Sulla base dei risultati ottenuti complessivamente, il metodo di infezione al fusto è risultato essere affidabile e più efficiente del sistema di inoculo radicale per immersione. Inoltre ha consentito di monitorare l'area di infezione del fungo per il prelievo di tessuto infetto da cui estrarre l'RNA. Di conseguenza si è orientati ad utilizzare questa metodologia nelle successive prove finalizzate al sequenziamento del trascrittoma.

Con lo scopo di avere una quantificazione più accurata dell'inoculo fungino rispetto al sistema che prevede il tassello di micelio, si sta mettendo a punto un metodo di infezione del fusto che prevede l'assorbimento xilematico di una sospensione conidica a concentrazione nota attraverso l'attività traspiratoria della pianta.

Il protocollo di estrazione di RNA totale messo a punto per il fusto in olivo prevede l'impiego di RNA later per la conservazione del campione prima dell'estrazione, la decorticazione del fusto e l'impiego del kit commerciale della QIAGEN. Quest'ultimo dato però è in attesa di conferma. La resa di RNA ottenuta è buona (circa 100 ng/ul) ma la qualità è assestata su un RIN pari a 7, non ancora sufficiente per la preparazione della libreria ILLUMINA.

Analisi dei biofenoli nel fusto in risposta all'infezione di *V.dahliae*

In **Tabella 1** sono riassunti i risultati ottenuti e la possibile interpretazioni degli stessi. Per alcuni picchi la specie ionica [M-H]⁻ non è stata osservata e/o identificata (NI) in quanto il solvente e/o le condizioni MS non erano favorevoli alla sua ionizzazione. L'oleuropeina aglicone nelle sue varie forme tautomeriche è stata identificata nell'estratto eluito a 13.39 min. Lo spettro ESI/MS/MS mostra uno ione pseudomolecolare a m/z 539 e una frammentazione coerente con quella riportata

per l'oleuropeina: riarrangiamento di McLafferty della funzione estere. Al tempo di eluizione di 12.88 min è eluito il composto a m/z 319 relativo alla dialdeide dell'oleuropeina e ai tempi di 14.55 e 15.29 min il composto a m/z 377 molecola originatasi dalla rottura del legame glicosidico dell'oleuropeina che in esperimenti ESI-MS produce lo ione a m/z 307 dalla perdita di un frammento C_4H_6O , mentre il frammento a m/z 275 potrebbe derivare da un riarrangiamento di altri frammenti. Il picco eluito a 9.44 min è stato caratterizzato dallo ione a m/z 623 (molecola deprotonata del verbascoside). Il Verbascoside, estere eterosidico di acido caffeico e idrossitirosolo, è abbastanza consistente nella polpa delle olive. Lo spettro di massa ottenuto per questo composto ha mostrato un intenso picco corrispondente alla molecola deprotonata $[M-H]^-$ a m/z 623 e due frammenti ionici caratteristici a m/z 461 e 161 (Figura 5). La perdita di acido caffeico produce, infatti, uno ione a m/z 461 e un frammento neutro, mentre il picco a m/z 161 risulta da un trasferimento protonico e dalla produzione di un chetene anionico. Dai risultati ottenuti in questo studio si è potuto costatare come la talea di olivo sia fonte di composti antiossidanti ad alto potere bioattivo.

Localizzazione ultrastrutturale dei livelli di avanzamento dell'infezione all'interno degli organi ipogei ed epigei delle cultivar in esame (analisi SEM)

L'analisi ultrastrutturale condotta preliminarmente su campioni di fusto non infetti, non ha rilevato come atteso, la presenza di gel e gomme sotto forma di granuli. La messa a punto del sistema ci consentirà successivamente, una rapida analisi SEM dei campioni di fusto infetti.

Tempo di ritenzione (min)	Ione pseudo molecolare [M-H] ⁻	Frammenti principali	Composto
4,46	227	181	-
4,87	227	181	-
5,39	289		-
7,94	463		-
8,22	389	315	-
8,72	640	583	
9,25	389	121	Oleoside
9,44	623		Verbascoside
10,46	623	377	Verbascoside e oleuropeina aglicone
10,88	535	581	Ligstroside
11,21	315	153, 121	Idrossitirosolo glucoside
11,34	415		Acetossi pinoresinolo
12,23	349	183	-
12,88	319		Dialdeide oleuropeina aglicone
13,39	539	377, 307, 275	Oleuropeina
13,73	303	285	Oleocantale
13,90	447 e 609	285	Luteolina-7-O-glucoside e Rutina
14,55	377	307, 275	Oleuropeina aglicone
14,88	447	285	Luteolina-4-O-glucoside
15,31	361	291, 101	-
15,29	377	307, 275	Oleuropeina aglicone
15,51	365	229	-
15,90	285		Luteolina
16,74	539	307, 275, 377	Oleuropeina
17,45	523	361	Ligstroside
18,90	335	199	Oleuropeina derivato
19,42	555		-

Tab.1 Composti fenolici trovati nell'estratto di talea (C29) con i tempi di ritenzione (min), valore di massa/carica (m/z) dello ione pseudo molecolare [M-H]⁻ e frammenti di massa principali.

Ostacoli incontrati e azioni correttive

(Max 6.000 caratteri spazi inclusi)

Il sistema di inoculo che prevede l'infezione dell'apparato radicale attraverso la sua immersione in una sospensione conidica ad elevata concentrazione, non ha dato luogo ad alcuna infezione e pertanto sono stati testati e messi a confronto altri metodi di inoculo. La messa a punto di un sistema sperimentale idoneo consentirà le analisi molecolari, ultrastrutturali e metabolomiche previste.

Pubblicazioni / Eventi divulgativi / Eventi formativi

Vizzarri V., Ferrara M., Salimonti A., Zelasco S., Iannotta N., Santilli E., Perri E., Nigro F.: 2011. Studio della resistenza di genotipi di olivo a *Verticillium dahliae* Kleb. e relativa risposta della pianta. (presentazione orale) Convegno Olivo e Olio. PG, 21-23 settembre.

Timbro Istituzione	Firma Responsabile Scientifico U.O.