

Progetto di Ricerca Interregionale - OLIVIVA

QUALIFICAZIONE DEL VIVAISMO OLIVICOLO:
CARATTERIZZAZIONE VARIETALE, SANITARIA
E INNOVAZIONI NELLA TECNICA VIVAISTICA



MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE
ALIMENTARI E FORESTALI



REGIONE PUGLIA
Area Politiche
per lo Sviluppo Rurale



CONFERENZA DELLE REGIONI
E DELLE PROVINCE AUTONOME

TEMATICA II

MANUALE PER LA DIAGNOSI FITOPATOLOGICA E PER IL RISANAMENTO DA VIRUS DELL'OLIVO

Soggetto capofila:

Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale
dell'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

A cura di:

Giuliana LOCONSOLE,
Maria SAPONARI, Giovanna BOTTALICO,
Giacomina MONDELLI, Vito SAVINO





Conferenza delle Regioni e delle
Province Autonome



MINISTERO POLITICHE
AGRICOLE E FORESTALI



Regione Puglia
Area Politiche per lo Sviluppo Rurale



*Qualificazione del vivaismo olivicolo: Caratterizzazione varietale,
sanitaria e innovazioni nella tecnica vivaistica*

Soggetto capofila: Dipartimento di Biologia e Chimica
Agroforestale ed Ambientale dell'Università degli Studi di Bari
"Aldo Moro"

Tematica II

***MANUALE PER LA DIAGNOSI FITOPATOLOGICA E PER IL
RISANAMENTO DA VIRUS DELL'OLIVO***

A cura di: Giuliana Loconsole, Maria Saponari, Giovanna Bottalico,
Giacomina Mondelli, Vito Savino

REDAZIONE

Giuliana Loconsole¹, Maria Saponari², Vito Savino¹

¹Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

²Istituto di Virologia Vegetale, CNR UOS di Bari

ISBN 978-88-88793-92-4

EDITORE

Università degli Studi di Bari “Aldo Moro” - Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale

Tutti i diritti riservati – All rights reserved

Nessuna parte del presente volume può essere riprodotta con qualsiasi mezzo (fotocopia compresa) senza il permesso scritto dell'editore.

**L. 499/99 - PROGRAMMI INTERREGIONALI
PROGRAMMA "SVILUPPO RURALE"
SOTTOPROGRAMMA "INNOVAZIONE E RICERCA"
D.M. n. 25279 del 23/12/03**

Miglioramento e qualificazione del vivaismo olivicolo. Diagnosi delle malattie da virus e virus simili, loro ruolo eziologico e tecniche di risanamento. Miglioramento delle tecniche di propagazione dell'olivo. Identificazione e riordino del patrimonio olivicolo mediante analisi e descrizione del loro DNA

Deliberazione della Giunta Regionale n. 173/05

**PROGETTO
QUALIFICAZIONE DEL VIVAISMO OLIVICOLO: CARATTERIZZAZIONE
VARIETALE, SANITARIA E INNOVAZIONI NELLA TECNICA VIVAISTICA
- OLVIVA -**



Unità di Ricerca coinvolte nel Progetto e Gruppo di Lavoro

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale, Sez. Patologia Vegetale 	V. Savino, G. Loconsole, G. Bottalico, A. Campanale, G. Mondelli, F. Nigro, M. Ferrara
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale Sez. Patologia Vegetale 	M. Cirulli, M. Amenduni, G. Bubici, C. Colella, M. D'Amico A.
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale Sez. di Genetica e Miglioramento Genetico 	Blanco, C. Montemurro, W. Sabetta, V. di Rienzo, R. Simeone, V. Alba
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali 	G. Ferrara, A. Pacifico, P. Simeone, S. Camposeo, M. Palasciano, A. Gallotta, A. Godini
Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Via Amendola, 165/A, 70126 Bari		
	Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento "S. Anna" Piazza Martiri della Libertà, 33, 56127 Pisa	L. Sebastiani, T. Bracci
	Istituto di Genetica Vegetale – CNR	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ U.O.S. di Perugia, Via Madonna Alta, 130, 06128 Perugia 	L. Baldoni, N.G.M. Cultrera, S. Pandolfi, R. Mariotti
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ U.O.S. di Palermo, Corso Calatafimi, 414, 90128 Palermo 	F. Carimi, M. Siracusa, L. Abbate
	Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Sezione di Arboricoltura e Protezione delle Piante, Università degli Studi di Perugia, Borgo XX Giugno 74, 06121 Perugia	F. Famiani, A. Baldicchi, L. Nasini, P. Proietti
	Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali, Università Politecnica delle Marche, via Breccie Bianche, 1, 60131 Ancona	G. Romanazzi, L. Landi, S. Murolo
	Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti", Università degli Studi di Siena – Facoltà di Agraria, Via Banchi di sotto, 55, 53100 Siena	M. Cresti, A. Autino, R. Rizzello
	Istituto per la valorizzazione del legno e delle specie arboree - CNR – IVALSA, Via Madonna del Piano, 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI)	A. Leva, C. Cantini, G. Sani
	Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle specie Legnose "G. Scaramuzzi", Università di Pisa, Via del Borghetto, 80, 56124 Pisa	S. Morini, G. Fiaschi, F. Rocco, A. Materazzi, H. Bouyahia

	<i>Dipartimento di Protezione delle Piante, Sez. di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Sassari, Via De Nicola, 1, 07100 Sassari</i>	<i>R. Garau, V. Prota, P. Sedda</i>
	<i>Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE), Università degli Studi della Tuscia - Facoltà di Agraria, Via San Camillo De Lellis, 01100 Viterbo</i>	<i>E. Rugini, R. Muleo, M.C. Colao, F. Colli, P. Gutierrez-Pesce, M. Zecchini</i>
	<i>CRA-Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma</i>	<i>M. Barba, F. Faggioli, M. Luigi</i>
	<i>Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Università 100 Portici, 80055 Napoli</i>	
	<i>▪ Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale</i>	<i>C. Di Vaio, S. Nocerino</i>
	<i>▪ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali</i>	<i>R. Rao</i>
	<i>Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise, Via F. De Sanctis, 86100 Campobasso</i>	<i>G. Lima, D. Vitullo, F. De Curtis, V. De Cicco</i>
	<i>Università degli Studi della Basilicata, Viale dell'Ateneo Lucano, 10, 85100 Potenza</i>	
	<i>▪ Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell'Ambiente</i>	<i>C. Xiloyannis, B. Dichio, G. Tataranni</i>
	<i>▪ Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agroforestali</i>	<i>N.S. Iacobellis, M. Nuzzaci, A. Vitti</i>
	<i>Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli Studi di Foggia – Facoltà di Agraria, Via Napoli, 25 71100 Foggia</i>	<i>S. Frisullo, A. Carlucci, F. Lops</i>
	<i>Centro di Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura "Basile Caramia", Via Cisternino, 281, 70010 Locorotondo (BA)</i>	<i>M. Saponari, N. Trisciuzzi, M.R. Silletti, A. Saponari</i>
	<i>Istituto Agronomico Mediterraneo, Via Ceglie, 9, 70010 Valenzano (BA)</i>	<i>M. Digiario, T. El Beaino</i>
	<i>Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari e Forestali, Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria, Località Feo di Vito, 89122 Reggio Calabria</i>	<i>G. Magnano di San Lio, G.E. Agosteo, G. Albanese, R. Mafrica, P. Pellegrino, A. Roschetti, L. Schena, R. Zappia</i>



*CRA - Centro di ricerca per
l'Olivicoltura l'Industria e Olearia,
Rende (CS),
c.da Li Rocchi, 87030 Rende (CS)*

*E. Perri, C. Briccoli Bati, I.
Muzzalupo, E. Santilli*



*Dipartimento DEMETRA, Università
degli Studi di Palermo,
Viale delle Scienze
90128 Palermo*

*T. Caruso, G. Campisi, F.P. Marra,
G. Occorso*

Comitato di Progetto

	<p><i>Luigi Trotta</i> <i>Luigi Scamarcio</i> <i>Area Politiche per lo Sviluppo Rurale</i> <i>Servizio Agricoltura</i> <i>Ufficio Innovazione e Conoscenza in Agricoltura</i> REGIONE PUGLIA</p>
	<p><i>Vincenzo Castoro</i> <i>Assessorato Agricoltura, Sviluppo Rurale, Economia Montana</i> <i>Ufficio Fitosanitario</i> REGIONE BASILICATA</p>
	<p><i>Benito Scazziotta</i> <i>Agenzia Regionale per lo Sviluppo e per i Servizi in Agricoltura</i> REGIONE CALABRIA</p>
	<p><i>Carlo Sardo</i> <i>Assessorato all'Agricoltura e alle Attività Produttive</i> <i>Area Sviluppo Attività Settore Primario</i> <i>Sperimentazione, Informazione, Ricerca e Consulenza in Agricoltura</i> REGIONE CAMPANIA</p>
	<p><i>Giovanna Sinatra</i> <i>Direzione Regionale Agricoltura</i> <i>Servizio Fitosanitario Regionale e Innovazione Agricoltura</i> REGIONE LAZIO</p>
	<p><i>Beatrice Pesenti</i> <i>Servizio Ispettorato Funzioni Agricole</i> <i>Centro di Agrometeorologia Applicata Regionale</i> REGIONE LIGURIA</p>
	<p><i>Sandro Nardi</i> <i>Agenzia per i Servizi nel Settore Agroalimentare delle Marche</i> <i>Servizio Fitosanitario Regionale</i> REGIONE MARCHE</p>
<p>REGIONE TOSCANA</p> 	<p><i>Marco Toma</i> <i>Area Sviluppo Rurale</i> <i>Settore Promozione dell'Innovazione e Sistemi della Conoscenza</i> REGIONE TOSCANA</p>
	<p><i>Maurizio Corbo</i> <i>Agenzia Regionale per l'Innovazione e lo Sviluppo dell'Agricoltura</i> <i>"Giacomo Sedati"</i> REGIONE MOLISE</p>
	<p><i>Carla Mura</i> <i>Settore Produzioni Vegetali</i> REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA</p>



Leonardo Catagnano
Assessorato delle Risorse Agricole ed Alimentari
Unità Operativa Specializzata Olivicoltura e Colture Mediterranee
REGIONE SICILIANA



Giuseppe Antonelli
Sezione Sviluppo Produzioni Arboree
REGIONE UMBRIA

Indice

1. Malattie e patogeni trasmissibili con i materiali di propagazione dell'olivo	Pag. 12
1.1 Introduzione	Pag. 12
1.2 Virus e virosi	Pag. 13
1.3 La verticilliosi	Pag. 15
1.3.1 La sintomatologia	Pag. 15
1.3.2 Cenni di biologia ed epidemiologia del patogeno	Pag. 16
1.3.3 Lotta	Pag. 17
1.3.4 Diagnosi	Pag. 18
1.4 I Fitoplasmi	Pag. 20
1.5 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Pag. 22
1.5.1 Dannosità della malattia	Pag. 23
1.5.2 Aspetti epidemiologici	Pag. 23
1.5.3 Strategie di lotta	Pag. 24
2. Tecniche di diagnosi fitopatologica	Pag. 37
2.1 Protocollo per la diagnosi dei virus	Pag. 37
2.1.1 Protocollo di amplificazione genica in singolo tubo	Pag. 37
2.2 Protocollo per la diagnosi di <i>Verticillium dahliae</i>	Pag. 41
2.2.1 Protocollo di nested-PCR	Pag. 41
2.3 Protocollo per la diagnosi dei fitoplasmi	Pag. 45
2.3.1 Protocollo di nested-PCR	Pag. 45
2.4 Protocollo per la diagnosi di <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Pag. 49
2.4.1 Protocollo di nested-PCR in singolo tubo	Pag. 49
3. Tecniche di risanamento	Pag. 53
3.1 Protocollo per la coltura <i>in vitro</i> di apici meristemati	Pag. 53
3.2 Protocollo per la termoterapia	Pag. 54
3.3 Verifica sanitaria	Pag. 55
4. Approfondimenti tecnici	Pag. 60
4.1 Normative di riferimento per le produzioni vivaistiche olivicole	Pag. 60
4.1.1 Normative nazionali ed europee	Pag. 60
4.1.2 La certificazione volontaria: aspetti tecnici	Pag. 61
4.1.3 Produzioni vivaistiche di categoria CAC: requisiti e punti critici	Pag. 70
4.2 Programma di selezione sanitaria e clonale	Pag. 79
4.2.1 Fasi della selezione	Pag. 79

Autori

Malattie e patogeni trasmissibili con i materiali di propagazione dell'olivo

Virus e virosi

Giuliana Loconsole¹, Maria Saponari², Vito Savino¹

¹ Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale – Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

² Istituto di Virologia Vegetale, CNR – UOS Bari

La Verticilliosi

Franco Nigro, Massimo Ferrara

Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale – Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

I Fitoplasmi

Francesco Faggioli¹, Gianfranco Romanazzi²

¹ CRA-Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

² Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi

Nicola Sante Iacobellis

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Potenza

Tecniche di diagnosi fitopatologica

Protocollo per la diagnosi dei virus

G. Loconsole¹, M. Saponari², F. Faggioli³, G. Albanese⁴, H. Bouyahia⁵, T. Elbeaino⁶, A. Materazzi⁵, M. Nuzzaci⁷, V. Prota⁸, G. Romanazzi⁹, N. Trisciuzzi¹⁰, V. Savino¹

¹ Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale – Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

² Istituto di Virologia Vegetale del CNR – UOS Bari

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

⁴ Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari e Forestali, Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria

⁵ Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle specie Legnose “G. Scaramuzzi”, Università di Pisa

⁶ Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari

⁷ Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agroforestali, Università degli Studi della Basilicata

⁸ Dipartimento di Protezione delle Piante, Sez. di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Sassari

⁹ Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali, Università Politecnica delle Marche

¹⁰ Centro di Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura "Basile Caramia"

Protocolli per la diagnosi di *Verticillium dahliae*

F. Nigro, M. Ferrara

Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale – Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

Protocollo per la diagnosi dei fitoplasmi

F. Faggioli¹, G. Romanazzi²

¹ CRA-Centro di ricerca per la Patologia vegetale, Roma

² Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Protocolli per la diagnosi di *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Nicola Sante Iacobellis

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Potenza

Tecniche di risanamento

Eddo Rugini¹, Giovanna Bottalico²

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l’Agricoltura, le Foreste, la Natura e l’Energia (DAFNE), Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

² Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale – Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

Approfondimenti tecnici

Giuliana Loconsole¹, Maria Saponari², Giovanna Bottalico¹, Vito Savino¹

¹ Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale – Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

² Istituto di Virologia Vegetale, CNR – UOS Bari

1. Malattie e patogeni trasmissibili con i materiali di propagazione dell'olivo

1.1 Introduzione

L'olivo è ospite di una serie di patogeni di origine fungina, batterica, virale e fitoplasmatica e di parassiti quali nematodi ed insetti, trasmissibili con il materiale di propagazione (Tab.1) che rivestono una notevole importanza economica sia per i danni diretti (*Verticillium dahliae*) che per quelli indiretti (i virus in particolare). Tali agenti causali, persistendo nel materiale di propagazione, assumono un ruolo epidemiologico di primaria importanza, sia come fonti di inoculo per altre specie, a livello locale, che per la diffusione sulle lunghe distanze, costituendo in tal modo un ostacolo alla libera commercializzazione dei materiali di propagazione, considerato che alcuni di essi sono da quarantena per molti paesi extraeuropei. Si riportano qui di seguito le informazioni più importanti (sintomatologia, epidemiologia, lotta e diagnosi) per i diversi patogeni dell'olivo.

Tabella 1: Patogeni e parassiti trasmissibili con i materiali di propagazione.

PATOGENO/PARASSITA
FUNGH
<i>Verticillium dahliae</i>
BATTERI
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>
VIRUS
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) Arabis mosaic virus (ArMV) Cherry leafroll virus (CLRV) Cucumber mosaic virus (CMV) Tobacco mosaic virus (TMV) Tobacco necrosis virus (TNV-D) Olive latent virus 1(OLV - 1) Olive latent ringspot virus (OLRSV) Olive latent virus 2 (OLV - 2) Olive latent virus 3 (OLV-3) Olive vein yellowing associated virus (OVYaV) Olive yellow mottling and decline-associated virus (OYMDaV) Olive semilaten virus (OSLV) Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV) Olive mild mosaic virus (OMMV)
FITOPLASMI
Giallume dell'astro (Aster Yellows, gruppo 16SrI) Malattia X del pesco (X Disease, gruppo 16SrIII) Giallume dell'olmo (Elm Yellows, gruppo 16SrV) Stolbur (gruppo 16SrXII)
NEMATODI
<i>Meloidogyne</i> spp. <i>Pratylenchus vulnus</i> <i>Xiphinema diversicaudatum</i>
INSETTI
<i>Euzophera pinguis</i> <i>Saissetia oleae</i>

1.2 Virus e virosi

Malgrado la scarsa reattività sintomatica, l'olivo si è rivelato insospettato ospite di numerosi virus in tutte le aree olivicole del mondo sottoposte ad indagine. A tutt'oggi 15 specie virali, appartenenti a 7 diversi generi, sono state isolate da olivo. Di queste, il virus del mosaico dell'Arabis (ArMV), il virus della maculatura anulare latente della fragola (SLRSV) (Savino *et al.*, 1979), il virus dell'accartocciamento fogliare del ciliegio (CLRV) (Savino e Gallitelli, 1981), il virus del mosaico del tabacco (TMV) (Triolo *et al.*, 1996), il virus della necrosi del tabacco (TNV-D) (Varanda *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2009) e il virus del mosaico del cetriolo (CMV) (Savino e Gallitelli, 1983) sono ubiquitari, polifagi ed importanti per altre colture (es. ortive, pesco, vite, ecc.). Altri virus invece sono stati, per il momento, ritrovati solo su olivo, da cui hanno derivato il proprio nome: virus della maculatura anulare latente dell'olivo (OLRSV) (Savino *et al.*, 1983), virus latente 2 dell'olivo (OLV-2) (Savino *et al.*, 1984), virus associato all'ingiallimento nervale (OVYaV) (Faggioli e Barba, 1995), virus semilattente dell'olivo (OSLV) (Materazzi *et al.*, 1996), virus associato alla maculatura gialla e deperimento dell'olivo (OYMDaV) (Savino *et al.*, 1996), virus associato all'ingiallimento fogliare dell'olivo (OLYaV) (Sabanadzovic *et al.*, 1999), virus del mosaico blando dell'olivo (OMMV) (Cardoso *et al.*, 2005) e il recente virus latente 3 dell'olivo (OLV-3) (Alabdullah *et al.*, 2009). Fa eccezione il virus latente 1 (OLV-1) (Martelli *et al.*, 1996) isolato anche da agrumi e da tulipano. Ciò fa ritenere non improbabile che anche altri virus, di cui sopra, abbiano una gamma d'ospiti naturale più ampia.

Dal punto di vista epidemiologico, è noto che quattro dei virus dell'olivo sono in grado di infettare la coltura attraverso il terreno o con nematodi (SLRSV e ArMV) o direttamente senza l'intervento di vettori (TMV e OLV-1).

Che però questi meccanismi operino anche nel caso dell'olivo non è stato dimostrato anzi, per almeno tre virus (ArMV, SLRSV e TMV), ciò appare poco probabile considerata la rarità delle infezioni di pieno campo e, nel caso dei nepovirus, l'assenza dei vettori e dei tipici focolai d'infezione. Parimenti sconosciuto è il comportamento epidemiologico degli altri virus, anche se di alcuni è nota la trasmissibilità per afidi (CMV), attraverso il polline (CLRV) (Saponari *et al.*, 2002) e recentemente anche attraverso il fungo *Olpidium brassicae* (OMMV) (Varanda *et al.*, 2011); per l'olivo non vi sono pertanto dati epidemiologici, anche orientativi, né è facile ipotizzare le vie attraverso cui riescono ad entrare in contatto con le piante ed invaderle. Rimane tuttavia il fatto che i virus, invadendo sistemicamente le piante, permangono nel materiale di propagazione che così rappresenta il principale veicolo di diffusione degli agenti virali.

Probabilmente l'elevato numero di specie virali che l'olivo ospita è la conseguenza di diversi fattori tra cui, innanzitutto, la diffusa latenza delle infezioni virali, che non permette di poter distinguere, su base sintomatologica, le piante sane da quelle infette. A fronte dell'elevato numero di specie virali descritte e caratterizzate, non vi è una altrettanta corrispondenza di virosi accertate.

Infatti ben poche sono le sintomatologie alle quali può essere chiaramente attribuita un'eziologia virale, mentre diversi sono i casi di malattie ad eziologia ignota (Saponari *et al.*, 2003). Sembra di poter attribuire con una qualche certezza un'eziologia virale solo alle seguenti sindromi:

- Frutti bitorzoluti: sintomatologia descritta in Italia su piante della cv Ascolana tenera infette da SLRSV, e in Portogallo sulla cv Negrinha. Si manifesta con alterazioni a carico delle foglie (laciniature, riduzioni del lembo) e delle drupe (piriformi, più piccole della norma, bitorzolute, con noccioli malformati) (Fig. 1). Alterazioni fogliari simili sono state riscontrate anche in piante della cultivar Raggiola (Faggioli *et al.*, 2002).

- Complesso dei giallumi fogliari: al complesso dei giallumi fogliari sono riferibili le sintomatologie descritte da Faggioli e Barba (1995), caratterizzate da vivaci ingiallimenti delle foglie (Fig. 2) e scarsa produttività delle piante, a cui talora si accompagnano necrosi fogliari e defogliazioni che possono portare al deperimento della pianta. Ad essi è stata associata la presenza di OYVaV, OLYaV e OYMDaV. Deperimenti accompagnati da ingiallimenti e schiarimenti delle

nervature sono stati osservati in Toscana su cultivar diverse, dalle quali sono stati isolati TMV e OSLV.

Le sindromi invece alle quali ad oggi non è stato possibile associare un agente eziologico virale sono le seguenti:

- Paralisi parziale: è stata la prima delle presunte virosi descritte su olivo in Argentina, consistente di mosaici, anulature e maculature fogliari e rosettamento. Alcuni di questi sintomi sono stati riprodotti mediante trasmissione su *Ligustrum sinense*.
- Malformazioni fogliari: è caratterizzata da eteromorfo fogliare, concrescimento e parziale saldatura di due o più lembi spesso accompagnata da fasciazioni e biforcazioni dei rami (Fig. 3). L'innesto su ligustro lucido di materiale con questa sintomatologia ha prodotto colorazioni perinervali e leggere deformazioni delle foglie delle piante innestate che sono state interpretate come reazione ad una infezione virale.
- Foglie Falciformi: caratteristica di questa alterazione è la deformazione del lembo che fa assumere alla foglia una forma falcata o variamente uncinata (Fig. 4). In prove di innesto fatte in California sia con materiale sintomatico autoctono che israeliano, i sintomi furono riprodotti su olivi. Il che farebbe concludere che alcune delle manifestazioni di falcatura fogliare potrebbero essere provocate da agenti infettivi trasmissibili col materiale di propagazione.
- Sferosi: è un'affezione della cv Manzanilla descritta in Israele, che si manifesta con forte riduzione di crescita e sviluppo di abbondanti sferoblasti su tronco e branche. Essa si trasmette per innesto e si diffonde in campo tanto da far sospettare la presenza di un vettore.
- Fessurazione della corteccia: è in ordine di tempo una delle ultime alterazioni virus-simili riscontrate su olivo. L'affezione è presente in Giordania sulla cv Nabali, su cui produce nanismo, riduzione di produzione e, soprattutto, un anomalo ispessimento e suberificazione della corteccia della parte basale del tronco che si fessura profondamente. La malattia si diffonde col materiale di propagazione, ma il suo agente non è stato individuato.
- Vaiolatura e gibbosità dei frutti: affezioni dei frutti descritte in Grecia, consistenti in depressioni brunastre sulla superficie e a vari livelli. A differenza della sintomatologia dei frutti bitorzoluti a cui è stato associato l'SLRV la natura infettiva di queste alterazioni non è stata comunque dimostrata.

L'accertamento della presenza di virus nell'olivo presenta difficoltà dovute alla scarsa reattività sintomatica, latenza delle infezioni e similarità tra alcuni quadri sintomatologici. Inoltre per l'olivo, a causa della mancanza di indicatori in grado di manifestare una sintomatologia specifica associata alle infezioni virali, non è stato messo a punto l'indexaggio che rappresenta, invece, un valido strumento di identificazione dei principali agenti virali per altre specie frutticole.

L'accertamento dello stato sanitario è stato basato per svariati anni esclusivamente sulla trasmissione meccanica ad ospiti erbacei: una tecnica con forti limitazioni dovute principalmente al fatto che non tutti i virus sono trasmissibili meccanicamente a specie vegetali erbacee da saggio. Non diverso è il problema per la diagnosi su base sierologica che, almeno nel caso dell'olivo, ha mostrato forti limitazioni sotto il profilo della sensibilità.

In definitiva la diagnosi dei virus dell'olivo poggia principalmente su tecniche di tipo molecolare. L'intensificarsi degli studi di caratterizzazione dei virus dell'olivo, ha permesso di sviluppare approcci molecolari quali le tecniche di ibridazione molecolare e di amplificazione genica (PCR) che assieme all'analisi degli RNA bicatenari, ormai da qualche anno rappresentano un valido strumento diagnostico (Grieco *et al.*, 2000; Bertolini *et al.*, 2001; Faggioli *et al.*, 2005; Loconsole *et al.*, 2010).

La selezione sanitaria propedeutica alla certificazione è al momento l'unica strategia di lotta adottata contro i virus dell'olivo e più in generale contro i patogeni sistemici. Se fino a qualche anno addietro, in mancanza di efficienti supporti diagnostici, la selezione, per quanto accurata, non garantiva livelli di sanità tranquillizzanti, oggi in virtù delle nuove acquisizioni, essa rappresenta un valido strumento nel miglioramento sanitario della specie. Resta tuttavia ancora da ottimizzare il

contributo che potrebbe derivare dall'impiego delle tecniche di risanamento mediante termoterapia, coltura *in vitro* di apici vegetativi e meristemati. Da specifiche sperimentazioni in corso è emerso che trattamenti di termoterapia (38°C per 3-4 mesi) su piante vegetanti sono in grado di eliminare virus quali il CLRV dagli apici vegetativi. Mentre la coltura *in vitro* di apici vegetativi si è rivelata la tecnica più promettente nel risanamento di piante infette da OLYaV (Bottalico *et al.*, 2002). Le piante ottenute attraverso la selezione sanitaria e/o il risanamento (Fonti Primarie) rappresentano il punto di partenza per produzioni vivaistiche certificate. In definitiva, l'impiego di materiale di propagazione (marze, talee, semi) virus-esente rappresenta la più efficace misura preventiva di lotta contro gli agenti patogeni sistemici ed in particolare contro i virus.

1.3 La verticilliosi

L'agente causale della verticilliosi è il fungo mitosporico *Verticillium dahliae* Kleb., caratterizzato dalla presenza di conidiofori ramificati a verticillo e di piccoli conidi ialini, unicellulari, di forma ovale. Caratteristica della specie, che la differenzia da *V. albo-atrum*, è la produzione di microsclerozi (20-90 × 10-50 µm) di colore bruno intenso, che nel terreno possono persistere vitali, superando avverse condizioni ambientali, fino ad oltre dieci anni. I conidi vengono prodotti da fialidi per gemmazione e spesso rimangono conglobati entro una goccia di materiale mucoso opalescente. Essi misurano, in genere, 2.5-8 × 1.4-3 µm ed hanno forma ovoidale. *V. dahliae* è un agente di tracheomicosi di numerose specie vegetali, soprattutto erbacee (solanaceae, carciofo, cotone) ma può parassitizzare anche erbe infestanti, che possono comportarsi da ospiti muti.

La verticilliosi dell'olivo è diventata particolarmente grave negli ultimi decenni, in seguito al diffondersi dell'irrigazione e delle tecniche di coltivazione intensiva nell'olivicoltura. La gravità, inoltre, risulta accentuata dalle notevoli difficoltà tuttora esistenti in merito alla lotta (Cirulli, 1981; Cirulli *et al.*, 1981; Tjamos, 1993). Recenti sopralluoghi condotti in numerose aree olivicole della Puglia hanno evidenziato un preoccupante aumento della diffusione della malattia, soprattutto nei giovani impianti (Nigro *et al.*, 2002b; Nigro *et al.*, 2005). L'impatto della malattia, inoltre, è particolarmente evidente negli oliveti consociati o che seguono colture notoriamente suscettibili a *V. dahliae* come solanaceae, carciofo, etc.

1.3.1 Sintomatologia

La malattia si manifesta con una complessa forma di deperimento con evoluzioni differenti, croniche ed acute, rispettivamente su piante in età avanzata e su piante giovani.

Tipicamente l'alterazione si presenta con seccumi di una o più branche; talora, nelle piante giovani, l'intera chioma può disseccare nel corso di una stagione. Su piante giovani la malattia può manifestarsi come apoplezia, ovvero un rapido disseccamento dell'intera pianta non sempre accompagnato dalla perdita delle foglie, che possono restare attaccate per molto tempo. Al contrario, in piante secolari ed in coltura asciutta, la malattia si manifesta come deperimento cronico, con disseccamenti, defogliazione ed arresto di sviluppo limitati a poche branche o rametti. I primi sintomi si manifestano in primavera sui rametti apicali di un anno e consistono in una attenuazione del normale colore delle foglie fino all'imbrunimento. Spesso il lembo fogliare si ripiega a doccia verso il basso e in seguito cade, lasciando defogliati lunghi tratti del ramo, specie nella parte basale e mediana. Le ultime 3-4 foglie apicali, anche se secche, possono rimanere attaccate ai rametti. I fiori dei rami infetti cadono precocemente e così anche le drupe, se i sintomi si manifestano tardivamente. La corteccia dei rami colpiti si può presentare di aspetto apparentemente normale, ma spesso sui rami di 2-3 anni di giovani piante sofferenti essa presenta striature

necrotiche di colore grigio-bruno, leggermente depresse, più o meno larghe, in alcuni casi sino a circondare i rami. In corrispondenza di tali striature il legno presenta imbrunimenti, che possono interessare settorialmente o interamente il cilindro legnoso.

Le manifestazioni più gravi della malattia sono visibili in estate ed in autunno, quando gli alberi affetti si distinguono chiaramente per le intere branche seccate, i ciuffi di polloni alla base del tronco o, meno frequentemente, per la presenza di nuovi getti (succhioni) all'inserzione delle branche deperite. Su detti alberi la malattia si estende a settori sempre più ampi della chioma; dopo 1-3 anni dalla comparsa dei primi sintomi piante di 5-15 anni possono avvizzire interamente. La malattia è meno grave su piante secolari, dove, pur non risultando letale, essa determina riduzioni della vegetazione e parziali defogliazioni.

A queste forme "classiche" della malattia ne è stata aggiunta una terza, in cui piante del tutto asintomatiche risultano positive all'isolamento del fungo, rappresentato da ceppi di debole virulenza (Al-Ahmad e Mosli, 1993). Questa forma risulta particolarmente importante ai fini della produzione delle marze e del relativo materiale di propagazione, qualora non vengano effettuati i necessari controlli sanitari.

1.3.2 Cenni di biologia ed epidemiologia del patogeno

Il ciclo vitale di *V. dahliae* può essere suddiviso in tre fasi: fase dormiente, fase parassitaria e fase saprofitaria (Fradin e Thomma, 2006).

Nella fase di dormienza, la germinazione delle strutture di resistenza, presenti nel terreno, è inibita per fenomeni di micostasi. La disponibilità nell'ambiente tellurico di fonti di carbonio e di azoto in eccesso, derivate da essudati radicali di piante ospiti e non ospiti specifiche, favorisce la germinazione dei microsclerozi (Mol, 1995). Il microsclerozio può germinare numerose volte, essendo costituito da molte cellule, ciascuna con la capacità di germinare, aumentando così le possibilità per il patogeno di realizzare un'infezione. Guidate dal gradiente di nutrienti, le ife che si originano dai microsclerozi possono coprire brevi distanze (non più di 300 µm) (Huisman, 1982) per raggiungere un potenziale ospite. L'infezione si realizza attraverso la penetrazione delle ife, che avviene principalmente a livello delle porzioni apicali delle giovani radichette, dove la suberificazione dell'epidermide è ancora incompleta (Bishop e Cooper, 1983), o attraverso ferite causate da operazioni colturali (trapianto e lavorazioni), nematodi o insetti (Bowers *et al.*, 1996; Huisman, 1982). La penetrazione diretta in assenza di ferite, invece, è caratteristica di ceppi virulenti. L'invasione dell'ospite avviene attraverso il trasferimento del micelio e dei conidi nel sistema vascolare xilematico, mediante la linfa (Rodriguez *et al.*, 2008). In questa fase del ciclo vitale, il patogeno si trova in uno stadio parassitario, caratterizzato principalmente dalla colonizzazione dell'ospite e dalla produzione dei conidi. In diversi studi è stato accertato che al fungo sono necessari da 2 a 4 giorni per entrare nei vasi xilematici della radice ed un altro giorno per la sporulazione e la diffusione negli elementi xilematici vicini (Chen *et al.*, 2004).

La pianta reagisce alla diffusione del patogeno rilasciando nei vasi legnosi sostanze gommose, le quali si impregnano di composti fenolici rapidamente estrusi dalle cellule annesse ai vasi, e formando tulle. L'espressione di queste reazioni morfologiche e biochimiche da parte dell'ospite, nonché la possibile produzione di tossine da parte del fungo, è costituita dall'imbrunimento dei vasi; tale manifestazione sintomatologica è caratteristica della malattia ed è determinata anche dall'ossidazione rapida dei fenoli a chinoni. La conseguente riduzione del trasporto idrico nello xilema, cui concorre anche la presenza delle ife del patogeno all'interno del sistema vascolare, determina perdita di turgore, appassimento e avvizzimento delle foglie, delle branche o dell'intera pianta.

Durante la senescenza e la necrosi della pianta o di suoi organi, il fungo entra nello stadio saprofitico. In questa fase sono prodotte grandi quantità di microsclerozi (Xiao *et al.*, 1997),

rilasciati nel suolo con il materiale vegetale in decomposizione e in grado di sopravvivere per 10-15 anni (Wilhelm, 1955). Alcuni studi indicano che anche le foglie di piante di olivo infette contribuiscono alla formazione di microsclerozi ed incrementano la densità di inoculo nel terreno, oltre a rappresentare un ulteriore mezzo di disseminazione del patogeno (Tjamos, 1993). L'olivo consociato a specie vegetali suscettibili, come pomodoro, melanzana, peperone, etc., trova nel terreno abbondanti popolazioni del fungo che possono determinare una maggiore diffusione della malattia (Thanassouloupoulos *et al.*, 1979; Tjamos, 1993; Rodriguez Jurado *et al.*, 1993).

1.3.3 Lotta

La lotta chimica contro la verticilliosi dell'olivo risulta al momento impraticabile a causa sia della localizzazione xilematica del patogeno nella pianta, che della capacità di *V. dahliae* di produrre microsclerozi, organi di sopravvivenza molto resistenti. Di rilievo risultano, invece, le pratiche agronomiche, l'impiego di cultivar e di portinnesti resistenti e le misure preventive e di certificazione fitosanitaria.

A. Pratiche agronomiche

Le tecniche di irrigazione (soprattutto quelle per scorrimento) e di coltivazione concorrono alla diffusione del patogeno, o predispongono la pianta all'infezione per le frequenti e talora profonde fresature del suolo, che causano ferite al sistema radicale superficiale.

Gli agricoltori usano asportare le parti secche o in disseccamento e capitozzano le piante malate. Tali interventi, però, pur mostrandosi di una qualche utilità sugli alberi adulti cronicamente malati, sono poco consigliabili sulle piante giovani. È utile, comunque, mantenere le piante piuttosto indurite perché meno suscettibili.

Le consociazioni con ospiti erbacei suscettibili allo stesso *V. dahliae* devono essere evitate, sia nei nuovi sia nei vecchi impianti. Inoltre, non devono essere trascurate le specie erbacee spontanee, spesso implicate nel mantenimento e nell'incremento dell'inoculo. In quest'ultimo caso l'applicazione di diserbanti risulterebbe più vantaggiosa di quella meccanica (Thanassouloupoulos *et al.*, 1981; Mesturino, 1990; Tjamos, 1993).

B. Impiego di cultivar e di portinnesti resistenti

L'impiego di cultivar o di portinnesti resistenti costituisce un mezzo efficace e concreto di lotta contro la verticilliosi dell'olivo. Numerosi sono i dati in letteratura sul comportamento di cvs o cloni, sebbene non sempre concordi a causa della elevata variabilità della virulenza che caratterizza le popolazioni di *V. dahliae*. Ad oggi, sono noti due patotipi del patogeno, defogliante e non-defogliante, caratterizzati rispettivamente da una maggiore e minore virulenza. Numerose sono le fonti di resistenza alla verticilliosi dell'olivo sia nelle varietà coltivate che nel germoplasma selvatico (Colella *et al.*, 2008). Limitatamente alla situazione italiana, in cui non sono ancora state segnalate infezioni naturali causate dal patotipo defogliante, è ormai comunemente ammesso che le cvs 'Ascolana', 'Ascolana Tenera', 'Leccino', 'Cellina di Nardò', 'Cassanese', 'Cima di Melfi', 'Nocellara del Belice', 'Nocellara Etnea', 'Uovo di Piccione', 'Pendolino', 'Tonda Iblea', 'Ogliarola del Bradano', 'Palmarola' sono suscettibili o molto suscettibili alla malattia. Le cvs 'Coratina', 'Frantoio', 'Frangivento', 'Rotondella', 'Nociara', 'Cima di Bitonto' e 'Yusti' possiedono una certa resistenza. Anche le cvs 'Carolea' e 'Cipressino' sono state riportate come tolleranti, sebbene il comportamento dipenda molto dal patotipo del patogeno (Cirulli e Montemurro, 1976; Graniti e Laviola, 1981; Pennisi *et al.*, 1993; Martos-Moreno *et al.*, 2006; Cirulli *et al.*, 2008). Relativamente a recenti varietà come Arbequina ed Arbosana, utilizzate in

impianti intensivi e superintensivi, non sembra siano disponibili risultati circa la resistenza a *V. dahliae* nei nostri ambienti. Prove effettuate in Spagna utilizzando entrambi i patotipi, indicano queste varietà come suscettibili o molto suscettibili (López-Escudero *et al.*, 2004, Martos-Moreno *et al.*, 2006).

Riguardo ai portinnesti, invece, studi condotti in California hanno messo in evidenza buoni indici di resistenza delle cvs ‘Oblonga’, ‘Frantoio’ e del clone di Arbequina ‘Allegra’, (Hartman *et al.*, 1971; Wilhelm, 1981). Risultati di più recenti ricerche, inoltre, dimostrano che la cv ‘Frantoio’ conferisce una parziale o totale resistenza quando in combinazione rispettivamente con Coratina e Leccino (Cirulli *et al.*, 2009).

C. Misure preventive e di certificazione fitosanitaria

Gli interventi contro la verticilliosi dovranno essere attivati già al momento della programmazione del nuovo impianto, puntando alla verifica ed alla selezione di terreni non infestati, evitando quelli già coltivati con specie arboree o erbacee suscettibili al patogeno e determinando la densità di inoculo di microsclerozi nel terreno. L'utilizzo di materiale di propagazione esente da *V. dahliae* e l'adozione di interventi che consentono il mantenimento dello stato sanitario di partenza, risultano fondamentali. Tra le condizioni indispensabili per conseguire questo obiettivo l'applicazione delle norme legislative che definiscono lo stato sanitario dei materiali di moltiplicazione, le caratteristiche del ciclo produttivo e delle strutture utilizzate per la produzione, nonché i controlli fitosanitari a cui il materiale di propagazione deve essere sottoposto per poter essere commercializzato, risultano fondamentali. Il DM 14/04/1997 ha fornito un primo concreto contributo, introducendo una nuova categoria di materiale di propagazione – C.A.C. (*Conformitas Agricola Comunitaria*) – e fornendo indicazioni sulle caratteristiche dei materiali di moltiplicazione, sui punti critici del processo produttivo in vivaio e sulla professionalità dei vivaisti.

Considerate le difficoltà in merito all'accertamento della malattia e la possibilità, ormai più volte riportata da vari autori, circa la regressione dei sintomi, risulta evidente la necessità di disporre di saggi diagnostici accurati e più rapidi, in grado di consentire il saggio di un numero elevato di campioni.

1.3.4 Diagnosi

Considerata la difficoltà della lotta contro la malattia, la prevenzione mediante la produzione e l'impiego di materiale di propagazione sano, così come la realizzazione dei nuovi impianti in terreni non infestati dal patogeno, assumono una importanza fondamentale. Pertanto, l'accertamento della malattia e della presenza del patogeno riguardano la pianta ed il terreno.

A. Metodi classici

La diagnosi della verticilliosi nei tessuti vegetali è definita con l'isolamento del patogeno da porzioni di legno, in coltura artificiale (Agar-Acqua, Agar Patata Saccarosio, etc.). Questa operazione risulta tecnicamente semplice, ma non sempre fornisce con continuità risultati positivi. La presenza del patogeno nei rametti d'olivo è discontinua nel corso dell'anno (Blanco-Lopez *et al.*, 1984; Tosi e Zizzerini, 1998) e, talvolta, la difficoltà del suo reperimento si prolunga tanto da far considerare la possibilità, anche per la concomitante remissione dei sintomi, che le piante affette vadano incontro ad una guarigione naturale (Rodriguez-Jurado *et al.*, 1993).

L'accertamento della presenza di *V. dahliae* nel terreno mediante i metodi classici, ovvero la determinazione della densità di inoculo dei microsclerozi del patogeno, presenta qualche difficoltà. Le tecniche tradizionali comportano una procedura lunga e laboriosa, che richiede periodi di oltre 4-

6 settimane (Harris *et al.*, 1993). I campioni di terreno vengono asciugati all'aria a 25°C per circa un mese per favorire la formazione degli sclerozi e ridurre al contempo la carica d'inoculo di altri funghi. Il terreno asciutto consente, inoltre, di facilitare lo sgretolamento e di mescolare il campione; questo viene passato ad un setaccio sterile, con maglia di 2 mm, così da ottenere la terra fine. Esistono svariate procedure di determinazione della densità d'inoculo di microsclerozi nel suolo, molte delle quali prevedono l'impiego di un substrato agarizzato semiselettivo su cui viene distribuito il campione ad incubare, e la successiva conta delle colonie che si sviluppano (Ashworth *et al.*, 1972; Butterfield e DeVay, 1977; Goud e Termorshuizen, 2003; Kabir *et al.*, 2004). Una delle tecniche è nota come Wet Plating (WP) e prevede la semina sul substrato di una sospensione del campione in acqua distillata; il metodo WP talvolta può prevedere una fase preliminare di wet-sieving per allontanare le particelle di terreno indesiderate. Per tale metodo esiste anche un'alternativa in asciutto, che prevede l'uso di un campionatore di Andersen per la distribuzione uniforme delle particelle di terreno sul substrato agarizzato.

B. Metodi molecolari

Nel corso dell'ultimo decennio sono state sviluppate diverse tecniche molecolari per la diagnosi di *Verticillium* spp. nell'ospite e nel terreno, tra le quali quelle basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) sono risultate sensibili ed affidabili (Nazar *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1999; Mercado Blanco *et al.*, 2001; Nigro *et al.* 2001; Lievens e Thomma, 2005). Un ulteriore miglioramento dei tempi di esecuzione delle analisi, della sensibilità e della affidabilità è stato ottenuto utilizzando tecniche di PCR in real-time (Nigro *et al.*, 2002a; Mahuku e Platt, 2002; Mercado Blanco *et al.*, 2003). Utilizzando un formato di nested-Scorpion di PCR in tempo reale sono stati analizzati oltre 300 campioni di terreno, naturalmente infetti o artificialmente inoculati con un numero definito di microsclerozi. I dati ottenuti con la tecnica molecolare sono stati confrontati con quelli ottenuti col metodo classico di diagnosi. Dalla valutazione dei risultati ottenuti è emerso che tutti i campioni risultati positivi per la presenza di *V. dahliae* col metodo classico di diagnosi sono risultati tali anche alla Real Time PCR. Alcuni campioni rivelatisi non contaminati con il metodo classico sono risultati positivi con la real-time PCR. In nessun campione di terreno risultato negativo con la metodica molecolare sono stati osservati microsclerozi del patogeno. Questo dato conferma l'elevata sensibilità della tecnica molecolare nel rilevare i microsclerozi. La regressione lineare tra i risultati ottenuti col metodo classico di diagnosi (espresso come microsclerozi per grammo di terreno secco) e con la Scorpion PCR (espressi come ciclo soglia) è risultata altamente significativa, con un valore di R^2 aggiustato pari 0,80 (Nigro *et al.*, dati non pubblicati).

1.4 I Fitoplasmii

I fitoplasmii sono organismi procarioti unicellulari, patogeni per le piante, simili ai batteri Gram positivi, ma privi di parete cellulare, che si possono sviluppare esclusivamente all'interno di tessuti viventi. Dal punto di vista morfologico consistono in cellule pleomorfe (per lo più rotondeggianti), con un diametro di circa 0,2-1,0 μm e quindi molto piú piccoli delle tipiche cellule batteriche (grandi circa 1,2-2,0 μm). Non hanno un vero nucleo anche se contengono sia DNA sia RNA. La loro riproduzione, peraltro non ancora perfettamente conosciuta, è simile a quella dei batteri (scissione binaria e gemmazione). L'assenza di parete cellulare rende questi microrganismi molto sensibili alle variazioni di pressione osmotica; inoltre avendo esigenze nutrizionali complesse ed essendo presenti in basse concentrazioni nei tessuti delle piante, non si è ancora riusciti ad isolarli, né a coltivarli in purezza su substrati artificiali.

I fitoplasmii si localizzano nei tessuti floematici della pianta e tendono ad accumularsi nei vasi cribrosi. Questa localizzazione non è però uniforme e completamente sistemica, cosicché, in una medesima pianta, si possono trovare parti colpite accanto a germogli o branche in cui la vegetazione non mostra alcun sintomo.

I fitoplasmii sono stati trovati associati a centinaia di malattie che colpiscono piú di 200 specie vegetali (McCoy *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000) e la distribuzione geografica delle stesse va dalle zone temperato-calde fino ai tropici. Attaccano sia piante legnose sia erbacee, specialmente se appartenenti al gruppo delle dicotiledoni, ma colpiscono anche alcune monocotiledoni (per es. le palme da cocco). Non giocano un ruolo importante come patogeni per le aghifoglie, ma si presentano frequentemente su latifoglie (per es. olmi, querce, salici, pioppi, robinie, ontani, frassini, eucalpti, ginestre) (Marcone, 2002). Dal punto di vista economico, nel Centro-europa rivestono notevole importanza i danni causati da fitoplasmii su vite, drupacee e pomacee. In generale, le piante erbacee infettate non pongono problemi di natura economica, ma possono contribuire, al pari delle infestanti, come serbatoio di fitoplasmii ed in tal modo giocare un ruolo importante nella diffusione di malattie.

I sintomi che inducono sulle piante ospiti sono correlati all'alterazione delle capacità di conduzione dei vasi floematici e a squilibri ormonali, che provocano malformazioni e anomalie durante lo sviluppo vegetativo, anche se i dettagli sulla patologia riguardante l'attacco da fitoplasmii sono ancora argomenti abbastanza ignoti. Si ritiene infatti che i fitoplasmii siano in grado di mutare il bilancio ormonale della pianta ospite, tanto da comportare variazioni nello sviluppo vegetativo. Oltre a questo, i fitoplasmii sicuramente prelevano dall'ospite numerosi prodotti metabolici, fatto che potrebbe portare ad una modifica dell'equilibrio fisiologico della pianta.

Originariamente, data la loro caratteristica di trasmettersi con il materiale di propagazione, i fitoplasmii furono assimilati ai virus; in un secondo tempo, dopo la loro osservazione al microscopio elettronico, furono denominati MLOs (Mycoplasma-like organisms) per la loro somiglianza con i micoplasmii; infine, nel 1994, vennero identificati come fitoplasmii (Murray e Shleifer, 1994; Sears e Kirkpatrick, 1994). Oggi, da un punto di vista tassonomico, i fitoplasmii appartengono alla classe dei *Mollicutes*, ordine *Mycoplasmatales*, correlati filogeneticamente, come detto, con i batteri Gram positivi.

La loro classificazione si basa sulle differenze a livello del gene codificante per l'RNA ribosomiale 16S (Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1998). Le tecniche di digestione enzimatica (RFLP) hanno consentito di classificare i fitoplasmii in 15 gruppi 16Sr e di individuare al loro interno specifici sottogruppi (Lee *et al.*, 1998; Montano *et al.*, 2001). La digestione virtuale degli ampliconi del gene 16S ha consentito di classificare i fitoplasmii in 25 gruppi (Wei *et al.*, 2008).

La diagnosi per l'identificazione di fitoplasmii ha subito, come per gli altri patogeni, una evoluzione nel corso degli anni. Inizialmente la diagnosi si è basata sulla sintomatologia manifestata dalle piante infette e la "visualizzazione" dei fitoplasmii all'interno delle piante mediante microscopia elettronica. Questa tecnica diagnostica, di fondamentale importanza per definire la morfologia del patogeno, non ha potuto essere applicata su larga scala per una serie di

problematiche sia di sensibilità del metodo che di applicabilità su campioni massali. Il passaggio successivo è stato l'applicazione del saggio biologico, dal momento che è stata individuata una pianta indicatrice molto sensibile quale la pervinca (*Catharanthus roseus*). Ma a dispetto dell'elevata sensibilità e affidabilità del metodo, il tempo di attesa per la risposta (da 1 a 3 mesi) ha reso la tecnica non utilizzabile per l'ottenimento di diagnosi rapide. Anche i successivi tentativi di utilizzare le tecniche sierologiche, sia da sole che associate alla microscopia ottica (DAPI), non hanno dato i risultati attesi. Di conseguenza, a tutt'oggi, le metodologie molecolari sono gli unici strumenti diagnostici a disposizione che rispondano ad una esigenza di diagnosi rapida, sensibile, che dia anche delle informazione sulla caratterizzazione del fitoplasma individuato. In particolare, la tecnica utilizzata consiste nell'amplificazione genica tramite PCR (Polymerase Chain Reaction), e la successiva analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). La maggior parte di queste tecniche si basano sullo studio del gene che codifica per la frazione 16S dell'RNA ribosomale (16Sr). A causa del basso titolo presente nel floema delle piante infette, una corretta diagnosi fitoplasmale normalmente prevede l'esecuzione di una doppia amplificazione genica mediante due diverse coppie di primer, la seconda disegnata internamente alla prima regione amplificata (nested-PCR). La successiva analisi RFLP permette non solo l'individuazione, ma anche la classificazione nei gruppi tassonomici del fitoplasma in studio.

I fitoplasmi, come detto, possono essere trasmessi per moltiplicazione agamica di piante infette (talea, innesto, propaggine, bulbi, rizomi) (Conti, 2001), anche se questo tipo di trasmissione è molto limitata in confronto a quello che avviene per i virus. È stata anche segnalata la trasmissione tramite seme, pur rara, su una fitoplasmosi che in Oman ha colpito pesantemente le colture di erba medica (Khan *et al.*, 2002). Non si trasmettono invece attraverso ferite, tagli (ad es. di potatura), sfregamento o contatto fra organi e, pare, nemmeno per polline. Invece gli insetti vettori con apparato pungente succhiatore (cicadellidi, psille) che si nutrono nel floema delle piante infette svolgono un importantissimo ruolo per la diffusione a breve e medio raggio dei fitoplasmi; la trasmissione generalmente è di tipo persistente-propagativo.

La difesa contro le malattie da fitoplasmi è principalmente di tipo indiretto, tramite la lotta agli insetti vettori e la prevenzione mediante l'uso di materiale di propagazione sano. Non possedendo la parete cellulare, i fitoplasmi non sono controllabili con antibiotici (ad eccezione delle tetracicline) o altri composti chimici. Una tecnica di controllo che sembra avere un certo effetto è la termoterapia del materiale infetto (45 minuti in bagno d'acqua calda a 50-52°C) (Mannini e Marzachi, 2007). Esistono però delle controindicazioni sia per quanto riguarda alcune ripercussioni fitotossiche del trattamento, sia per l'alto impegno economico e tecnico che rende il trattamento conveniente solo in particolari casi. Viste le limitate possibilità di lotta a disposizione, si sta sperimentando, a volte con successo, la possibilità di incrementare le difese della pianta (Romanazzi *et al.*, 2009).

L'impiego delle tecniche molecolari di diagnosi ha permesso di individuare la presenza di fitoplasmi anche in piante arboree nelle quali la concentrazione di questi procarioti è solitamente molto ridotta. E' proprio grazie all'impiego di queste tecniche sensibili che a partire dagli anni '90 è stata individuata la presenza di fitoplasmi in piante di olivo localizzate in diverse regioni dell'Italia centrale e settentrionale ed affette da disordini vegetativi (Danielli *et al.*, 1996; Del Serrone *et al.*, 1996; Poggi Pollini *et al.*, 1996). Le sintomatologie più frequentemente riscontrate sono state raccorciamento degli internodi, scopazzi, ingiallimenti e clorosi fogliari, caduta delle gemme, formazione di sferoblasti con rosettamento dei germogli (Fig. 5). Nelle piante che presentavano tali anomalie vegetative furono identificati fitoplasmi appartenenti ai gruppi tassonomici del giallume dell'astro (Aster Yellows, gruppo 16SrI), della malattia X del pesco (X Disease, gruppo 16SrIII) del giallume dell'olmo (Elm Yellows, gruppo 16SrV) e dello stolbur (gruppo 16SrXII). Dopo queste prime segnalazioni, diversi studi hanno confermato l'associazione tra disordini fogliari in piante di olivo e la presenza di fitoplasmi appartenenti ai sottogruppi 16SrI-

B, 16SV-A e 16SXII-A in Spagna, Italia e Iran (Font *et al.*, 1998; Pasquini *et al.*, 2000; Ahangaran *et al.*, 2006).

Indagini analoghe sono state ripetute nel tempo su campioni di diversa provenienza ma non sempre hanno permesso di confermare la presenza di fitoplasmi in associazione con le sintomatologie sopra descritte. Infatti, in alcuni casi è stata osservata la presenza di fitoplasmi anche in piante asintomatiche, mentre l'associazione tra disordini vegetativi e fitoplasmi non sempre è correlata al 100%, confermando quanto riportato in letteratura. In alcuni casi, specialmente quando i sintomi osservati erano su piante di olivo non coltivate in oliveti specializzati, ma presenti lungo viali o altre zone antropizzate, la sindrome è stata associata all'utilizzo improprio di erbicidi ormonali che causano in olivo disordini simili a quelli indotti dai fitoplasmi. Anche la presenza di forti attacchi di acari può causare sintomatologie riferibili a quelle associate alla presenza di fitoplasmi.

Per quanto riguarda l'individuazione di possibili vettori di fitoplasmi in olivo, al momento non è stato provato il ruolo di insetti specifici, anche se in un caso la presenza di *Hyalesthes obsoletus*, cicadellide vettore di fitoplasmi, è stata riscontrata su un olivo sintomatico ed affetto da fitoplasmi (Del Serrone *et al.*, 1996), mentre la malattia è risultata diffondere, anche se lentamente, in un oliveto dove è stata osservata una massiccia infestazione di *Metcalfa pruinosa* che è risultata in grado di trasmettere a vite fitoplasmi del gruppo 16SrI-C (Mori *et al.*, 2000).

Alla luce di quanto sopra emerge che le indagini fino ad ora condotte hanno evidenziato con certezza la presenza di fitoplasmi in piante di olivo, ma ancora non chiariscono se l'eziologia dei disordini vegetativi osservati sia da imputare unicamente alla presenza di uno o più fitoplasmi. Sono inoltre stati notati in alcuni casi fenomeni di regressione dei sintomi a seguito di drastica potatura simili a quelli descritti in altre affezioni associate alla presenza di fitoplasmi (fenomeno del "recovery") che in qualche modo supporta l'ipotesi di quest'ultimi come possibili agenti eziologici della malattia. Risulta quindi necessario condurre ulteriori sperimentazioni per chiarire l'effettivo ruolo patogenetico dei fitoplasmi in olivo e individuarne i possibili vettori al fine di impedire che una problematica per ora localizzata a piccoli focolai, divenga un problema di maggiore rilevanza fitopatologica, minacciando la coltura dell'olivo.

1.5 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

L'olivo (*Olea europea* L.) in tutte le aree olivicole subisce attacchi e danni di rilevante importanza economica da parte di numerosi parassiti tra cui il batterio *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Young *et al.*, 1996; sinonimo *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*) che è l'agente causale della rogna dell'olivo.

La malattia si manifesta con escrescenze sferoidali - denominate tubercoli le cui dimensioni variano da pochi millimetri ad alcuni centimetri, frutto dell'alterazione degli equilibri ormonali nella nicchia di infezione (Surico e Iacobellis, 1992) - che si formano prevalentemente sui giovani rami dove possono perdurare continuando ad accrescersi di anno in anno per poi disgregarsi. In caso di infezioni gravi, i tubercoli possono anche confluire e, quando circondano interamente un ramo, possono determinarne il deperimento, la defogliazione e, anche, l'avvizzimento. Le infezioni possono interessare le soluzioni di continuità a carico degli organi assili esito di: caduta delle foglie (cicatrici fogliari), eventi traumatici quali gelate e grandinate, pratiche agronomiche come le potature, ecc (Ciccarone, 1950) (Fig. 6).

Sebbene non molto frequentemente anche le foglie, i frutti e i loro peduncoli possono essere interessati dalla malattia. Sulle drupe la malattia può manifestarsi con alterazioni neoplastiche del mesocarpo e alla base del peduncolo che causano l'arresto dello sviluppo del frutto e la sua deformazione o come numerose tacche circolari, necrotiche e depresse, in corrispondenza delle lenticelle, di 0.5-2.5 mm (Iacobellis, 2001).

1.5.1 Dannosità della malattia

La dannosità della rogna dell'olivo in pieno campo è stata poco studiata e la condizione endemica della malattia - già descritta dal filosofo greco Teofrasto (IV secolo a.C.) e quindi apparentemente presente nel bacino del Mediterraneo da millenni, ed il fatto che la malattia generalmente non causa la morte della pianta - sembra portare gli addetti ai lavori a sottovalutare la eventuale dannosità della malattia o, comunque, alla sua accettazione. In ogni caso i pochi e sporadici studi effettuati in tal senso (Schroth *et al.*, 1973) indicano chiaramente che piante moderatamente infette (0,5-1 tubercolo per ogni 30 cm di ramo) presentano una riduzione della produzione del 28% rispetto a piante lievemente infette (0,1-0,3 tubercoli per 30 cm di ramo). Inoltre, è noto (Schroth *et al.*, 1968) che le olive verdi da mensa provenienti da piante malate presentano, sulla base di valutazioni sensoriali, caratteristiche organolettiche alterate e sgradevoli. Niente si conosce sulle alterazioni metaboliche delle piante malate responsabili di tali effetti sui frutti e sugli effetti della malattia sulla resa in olio e qualità dell'olio ottenuto da olive di piante malate.

Pesanti attacchi a giovani piante in pieno campo, esito di gelate e/o grandinate, possono risultare altamente dannosi sia per i necessari interventi di potatura di sanificazione (Fig. 7) che per gli effetti di indebolimento che le infezioni possono determinare sulle branche che andranno a costituire la struttura della pianta matura.

Sicuramente dannosa può risultare la malattia nel caso delle produzioni vivaistiche (Fig. 8). Semenzali o talee di olivo messe a radicare con sintomi di rogna non possono essere messe in commercio sulla base delle norme per la certificazione del materiale vivaistico olivicolo in riferimento a quanto stabilito dal DM 14 aprile 1997. Comunque, sulla base della letteratura nota, non sono attualmente disponibili dati quantitativi sull'incidenza e dannosità della malattia nella pratica vivaistica.

1.5.2 Aspetti epidemiologici

L'inoculo che da origine al processo infettivo può provenire dai tubercoli e, in particolare, dalla popolazione del patogeno residente sul filloplano della pianta ospite (Ercolani, 1971). Infatti, diversi studi epidemiologici condotti al più in Italia hanno dimostrato che *P. savastanoi* pv. *savastanoi* nella sua fase saprofitaria risiede sul filloplano (foglie, rami) e carpoplano dell'olivo. I livelli delle popolazioni del patogeno sono particolarmente elevati in primavera ed autunno (Ercolani, 1971; Ercolani, 1983; Lavermicocca e Surico, 1987; Surico e Marchi, 2003) quando le piante sono altamente suscettibili, per la intensa attività meristemica che è coinvolta nel processo patogenetico (Surico e Iacobellis, 1992 e bibliografia ivi contenuta), e recettive per la possibile presenza sulle stesse di soluzioni di continuità in seguito ad eventi di filloptosi dovuti al ricambio fisiologico delle stesse o ad altri eventi patologici (per. es. dovuti all'occhio di pavone o alla cercosporiosi) o eventi traumatici (p.es. ferite esito di gelate o grandine, ecc.,) che si possono determinare nelle menzionate stagioni.

Le piogge abbondanti e l'umidità relativa dell'aria, tipiche delle suddette stagioni, sicuramente facilitano il patogeno e lo rendono disponibile per gli eventi patologici. La colonizzazione del filloplano da parte del patogeno è apparentemente influenzata dall'età delle foglie, dalla cultivar e ad alcune pratiche agronomiche con particolare riferimento alla concimazione (Ercolani, 1983; Varvaro e Ferulli, 1983; Balestra e Varvaro, 1995). Eventuali effetti di tali fattori sugli aspetti quantitativi e, possibilmente, qualitativi delle popolazioni del patogeno residenti sul filloplano possono costituire aspetti epidemiologici importanti da tenere di conto nella gestione della malattia.

La presenza del patogeno sul filloplano e quindi l'insediamento della malattia sembra apparentemente dipendere dalla presenza della stessa (presenza di tubercoli) sulla stessa pianta e/o piante malate nello stesso campo (Quesada *et al.*, 2010) o in campi limitrofi sopravvento (Iacobellis, osservazioni non pubblicate). L'inoculo è apparentemente diffuso ad opera della pioggia e da possibili aerosol che si formano in seguito a piogge accompagnate da vento. Altre indagini a tale riguardo hanno indicato che piante di olivo sane della cv Maiatica di Ferrandina, ovvero che non mostrano i tipici sintomi della rogna, non presentano sul filloplano batteri riconducibili a *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Iacobellis *et al.*, 2005a).

Inoltre, il batterio è diffuso, anche a grandi distanze, mediante materiale di propagazione asintomatico ma potenzialmente infetto (p.es. infezioni latenti con il patogeno in posizione sistemica) e/o contaminato (nel senso di popolazioni del patogeno associate al filloplano).

La possibilità di infezioni latenti e la capacità sistemica del patogeno - che possono determinarsi naturalmente al momento della caduta delle foglie o della preparazione delle talee da radicare o quando le piante sono innestate, ecc, già riportate nel passato da diversi autori (Petri 1915; Wilson, 1935) - sono state dimostrate da indagini recenti (Marchi *et al.*, 2004; Penyalver *et al.*, 2006). L'importanza epidemiologica di infezioni latenti e, in particolare, la capacità sistemica del patogeno, per le implicazioni fitosanitarie che ne derivano, determinano la necessità di ulteriori e più approfondite indagini allo scopo di valutare il fenomeno e l'intensità del fenomeno in condizioni naturali.

Inoltre, il batterio è diffuso mediante pratiche agronomiche (p.es. potatura, innesto, ecc).

Nel passato, la mosca dell'Olivo [*Bracocera (Dacus) oleae*] era considerata specificamente importante nella diffusione di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* in quanto il batterio era ritenuto simbiote dell'insetto ma tale evenienza non è stata mai confermata (Luthy *et al.*, 1983a; 1983b; Belcari *et al.*, 2003; Girolami, comunicazione personale).

1.5.3 Strategie di lotta

La resistenza dell'olivo alla rogna non è oggetto di studi adeguati e quindi le conoscenze a riguardo sono limitate. Considerata l'importanza della coltura e della malattia sarebbe auspicabile uno sforzo in tal senso. Allo stato attuale non si conoscono varietà di olivo resistenti alla malattia sebbene un numero discreto di esse viene considerato tollerante alla stessa sulla base di studi ed osservazioni effettuati in Italia e in altre aree olivicole del Mediterraneo (Bejama *et al.*, 1992; Bejama, 1994; Marcelo *et al.*, 1999; Sisto *et al.*, 2001; Hassani *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda la realtà italiana, risultati di studi basati sull'inoculazione artificiale di 30 cultivar di olivo con ceppi virulenti di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Sisto *et al.*, 2001) hanno indicato che le cvs Carolea, Bella di Spagna, Cerasella, Cima di Melfi, Coratina, Corniola, Dolce Agogia, Leucocarpa, Maiatica di Ferrandina, Nolca e San Felice mostrano una risposta moderata alle infezioni artificiali (peso dei tubercoli inferiore a 50 mg) mentre le cvs Cellina di Nardò, Frantoio, Morcona, Nociara, Ogliarola, Pendolino sono risultate altamente reattive (peso dei tubercoli superiore a 100 mg). Una risposta intermedia è stata ottenuta nel caso delle cvs. Ascolana tenera, Cipressino, Itrana, Kalamata, Leccino, Manzanilla, Nocellara del Belice, Nocellara Etna, Nostrale di Rigali, Pasola di Andria, Picholine, Toscanina e Termite di Bitetto (peso dei tubercoli compreso tra 50 e 100 mg). In un altro recente studio sono stati confermati alcuni dei suddetti risultati e tra gli ibridi, mirati e liberamente impollinati utilizzati, ne è stato riscontrato uno particolarmente poco reattivo alle inoculazioni artificiali (Hassani *et al.*, 2003). Comunque, in agrosistemi caratterizzati da parametri pedoclimatici diversi il comportamento verso la rogna per una stessa cultivar può differire anche in maniera eclatante (Iacobellis, osservazioni non pubblicate). Questo può dipendere al più da fattori pedoclimatici e/o, in particolare, dal verificarsi di eventi meteorici traumatici come grandinate e gelate tardive (Ciccarone, 1950) che causano la formazione di soluzioni di continuità sulle piante e quindi, in presenza del patogeno, la possibilità di

infezioni. Comunque non è escluso che tali comportamenti possano essere dovuti alla presenza di cloni diversi di una stessa cultivar. Tali evenienze, importanti dal punto di vista epidemiologico, meriterebbero di essere approfonditi anche per valutare gli aspetti della resistenza dell'olivo alla malattia. La caratterizzazione varietale e sanitaria delle cultivar di olivo più diffuse nelle regioni olivicole italiane nell'ambito del progetto OLVIVA sicuramente determinerà una chiarezza sul polimorfismo varietale e possibilmente una risposta, anche indiretta, alla osservazione sopra riportata.

Allo stato attuale la lotta alla rogna dell'olivo viene affidata principalmente a trattamenti con formulazioni del rame che riescono a contenere, almeno in parte, la dannosità della malattia e ad interventi agronomici preventivi che tendono a limitare la presenza del patogeno.

I trattamenti con formulati rameici sono particolarmente necessari quando sulla pianta si vengono a determinare ferite/fratture causate da gelate, grandinate, potatura, raccolta del prodotto, altre pratiche agronomiche, cicatrici fogliari, ecc., attraverso le quali il patogeno penetra nella pianta ospite. I trattamenti dovrebbero essere effettuati il più presto possibile dopo i suddetti eventi e questo, per ovvie ragioni, non sempre è possibile. Recenti indagini in California (USA) hanno indicato che le cicatrici fogliari sono infettabili anche sette giorni dopo la loro formazione e che un trattamento dopo la raccolta non è sufficiente per proteggere le piante da attacchi di rogna (Teviotdale e Krueger, 2004). In ogni caso i trattamenti con rameici, oltre a proteggere le possibili nicchie di infezione possono abbassare la densità delle popolazioni del patogeno sul filloplano e quindi sono necessari per il mantenimento in sanità delle piante madri da cui prelevare il materiale di propagazione vegetativa (talee, marze, gemme, ecc).

La potatura di risanamento tesa all'asportazione dei rami che presentano gravi sintomi di rogna e all'eliminazione dei tubercoli, possibilmente seguiti da trattamenti con formulazioni del rame, sono auspicabili per la riduzione delle sorgenti dell'inoculo primario e quindi per ridurre il rischio di infezione.

Altre pratiche agronomiche possono risultare utili per la gestione della malattia. In particolare, la raccolta dovrebbe essere evitata in periodi particolarmente piovosi ed essere eseguita con metodi che riducano le possibilità di causare ferite sulla pianta. Anche la potatura dovrebbe essere eseguita in periodi non molto piovosi ed in tale occasione gli strumenti di potatura dovrebbero essere periodicamente disinfettati.

Ovviamente nel caso di nuovi impianti devono essere utilizzate piante certificate e sane. *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, il fungo *Verticillium dahliae*, e 8 virus trasmissibili meccanicamente, sono inclusi nella lista dei patogeni dell'olivo regolati dal DM del 14 aprile 1997 e conseguentemente il materiale di propagazione olivicolo messo in commercio dovrebbe esserne esente. Le attuali norme della certificazione del suddetto materiale prevedono che solo le piantine con sintomi della rogna non possono essere messe in commercio. La possibile posizione epifitica (Ercolani, 1971) e/o endofitica (Marchi *et al.*, 2004, Penyalver *et al.*, 2006) del patogeno in piante asintomatiche suggerisce che la certificazione sanitaria del materiale di propagazione vegetativa deve essere basata su metodi diagnostici molecolari rapidi, sensibili e specifici già disponibili (Penyalver *et al.*, 2000; Bertolini *et al.*, 2003a; Bertolini *et al.*, 2003b). Il patogeno in tali posizioni può quindi essere facilmente diffuso sia nelle tradizionali aree olivicole che in quelle che solo recentemente hanno avviato tali produzioni (Braithwaite *et al.*, 1999; Young J.M., comunicazioni personali).

Infine, tra i metodi di lotta alla malattia di potenziale interesse e che potrebbero essere utilizzati in futuro, possono essere indicati quelli basati sull'uso di microrganismi antagonisti di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* presenti sul filloplano dell'olivo (Lavermicocca e Surico, 1987; Iacobellis *et al.*, 2005a), o quelli basati sulla distribuzione di sostanze naturali dotate di attività antibatterica (Lavermicocca *et al.*, 2003; Lo Cantore *et al.*, 2004; Iacobellis *et al.*, 2005b). Incoraggianti sembrano i risultati a tale riguardo ottenuti nell'ambito del progetto Olviva sull'uso di batteri isolati dal filloplano di olivo nella lotta alla rogna dell'olivo. Diversi isolati di *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Burkholderia* spp. sono risultati capaci di inibire significativamente la crescita *in vitro* di

ceppi rappresentativi di *P.savastanoi* pv. *savastanoi*. In particolare, alcuni isolati di *Bacillus* spp. sono risultati capaci, in saggi di patogenicità, di rallentare e di ridurre in maniera significativa, e comunque in relazione al ceppo antagonista e alla densità dello stesso, la formazione dei tubercoli tipici della rogna dell'olivo.

In conclusione, la rogna dell'olivo, sebbene da non considerare una emergenza fitopatologica, è una malattia di cui, a parte alcuni aspetti molecolari della interazione ospite-patogeno ed alcuni tratti epidemiologici dell'agente causale *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, poco si conosce. Infatti, è necessario che gli effetti della malattia sugli aspetti quantitativi delle produzioni e, in particolare, gli effetti sulla qualità delle olive e degli oli ottenuti da drupe rivenienti da piante malate siano chiariti e definiti. Inoltre, l'attuale mancanza di specifici battericidi determina di fatto l'adozione di metodi preventivi di lotta per il contenimento delle batteriosi delle piante. In tale senso si rende necessario l'acquisizione di conoscenze sul possibile effetto dello stato nutrizionale della pianta sulla densità delle popolazioni del patogeno sul filloplano, sulla possibile variabilità delle popolazioni del patogeno nelle diverse aree olivicole e sul ruolo degli insetti nella diffusione del patogeno. Di estremo interesse è, inoltre, il fatto che il materiale di riproduzione e vivaistico sia esente dal patogeno. Comunque la possibile certificazione sanitaria di tali materiali non può limitarsi ad osservazioni sulla presenza dei sintomi e, al contrario, deve essere basata su metodi diagnostici rapidi, sensibili e specifici che possano mettere in evidenza la presenza del patogeno nella posizione epifitica ed possibilmente endofitica in piante asintomatiche.

Infine, la disponibilità di varietà di olivo resistenti alla rogna o comunque di fonti di resistenza alla stessa potrebbe risultare importante per il contenimento della malattia e il possibile miglioramento quantitativo e qualitativo delle produzioni olivicole. Di interesse è anche la necessità di comprendere le basi molecolari della tolleranza/resistenza delle cv di olivo all'azione del patogeno. La scelta della varietà da impiantare deve essere particolarmente attenta. In particolari condizioni agro-climatiche, per esempio caratterizzate da gelate primaverili, la selezione di varietà contemporaneamente tolleranti/resistenti alle basse temperature e alla rogna deve essere tenuta di conto. I dati di indagini di campo indicano chiaramente che in certe condizioni agro-climatiche e/o in seguito ad eventi meteorici di particolare intensità e in presenza di un elevato potenziale di inoculo anche varietà ritenute tolleranti/resistenti alla rogna, come è il caso della cv Coratina, possono presentare elevati indici della malattia.

Infine, non da trascurare è la possibilità di utilizzare nel prossimo futuro antagonisti di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* residenti stabili del filloplano dell'olivo per il contenimento delle popolazioni del patogeno e la lotta alla malattia sia in campi commerciali che nelle produzioni vivaistiche.

Bibliografia

- Ahangaran A., Khezri S., Habibi M.K., Alizadeh A., Mohammadi G.M., 2006. The first report of detection of a phytoplasma in olive trees in a botanic collection in Iran. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 7: 1133-1138.
- Al Ahamad M.A. & Mosli M.N., 1993. Verticillium wilt in Syria. *Bulletin OEPP/EPPO bulletin*, 23: 521-535.
- Alabdullah A., Elbeaino T., Minafra A., Digiario M., Martelli G.P., 2009. Detection and variability of olive latent virus 3 in the mediterranean region. *Journal of Plant Pathology* 91 (3), 521–525.
- Ashworth L.J., Waters J. E., George A.G., McCutcheon O.D., 1972. Assessment of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in field soils. *Phytopathology*, 62: 715-719.
- Balestra G.M. & Varvaro L., 1995. Influence of nitrogen fertilization on the colonization of olive phylloplane by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Developments in Plant Pathology*, 9: 88-92.

- Bejama A., Walali L., Janati L., Moukhli A., 1992. Field reaction of different variety of olive (*Olea europea* L.) to olive knot disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Al-Awamia*, 75 : 41-52.
- Bejama A., 1994. Edute de la sensibilité variétale de l'olivier au Maroc vis-à-vis de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, agent de la tuberculose. *Cashiers-Agricultures*, 3 (6): 405-408.
- Belcari A., Sacchetti P., Marchi, Surico G., 2003. La mosca delle olive e la simbiosi batterica. *Informatore fitopatologico*, 9: 55-59.
- Bertolini E., Olmos A., Martinez M.C., Gorriss M.T., Cambra M., 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colorimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods*, 96: 33–41.
- Bertolini E., Peñalver R., García A., Olmos A., Quesada J.M., Cambra M., López, M.M., 2003a. 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.
- Bertolini E., Olmos A., López M.M., Cambra M., 2003b. Multiplex Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in a Single Tube for Sensitive and Simultaneous Detection of Four RNA Viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Trees. *Phytopathology*, 93 (3): 286-292.
- Bishop C.D. & Cooper R.M., 1983. An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 22: 15–27.
- Blanco-López M.A., Jiménez-Díaz R.M., Caballero J.M., 1984. Symptomatology incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive tree in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea* 23:1-8.
- Bottalico G., Rodio M.E., Saponari M., Savino V., Martelli G.P., 2002. Primi risultati sul risanamento di ecotipi di olivo infetti da virus. IX Convegno Nazionale SIPaV, Roma, 1-2 ottobre 2002.
- Bowers J.H., Nameth S.T., Riedel, R.M., Rowe R.C., 1996. Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopathology*, 86: 614–621.
- Braithwaite M., Alexander B.J.R., Young J.M., Ganev S., 1999. Olive knot disease in New Zealand. Twelfth Australasian Plant Pathology Society Conference, Canberra, 1999: 157.
- Butterfield E. J. & DeVay J.E., 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 67:1073-1078.
- Cardoso J.M.S., Felix M.R., Clara M.I.E., Oliveira S., 2005. The complete genome sequences of a new necrovirus from *Olea europa* L. *Archives of Virology*, 150: 815–823.
- Cardoso J.M.S, Felix M.R., Clara M.I.E., Oliveira S., 2009. Complete genome sequence of a Tobacco necrosis virus D isolate from olive trees. *Archives of Virology*, 154: 1169–1172.
- Chen P., Lee B., Robb J., 2004. Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: 283–291.
- Ciccarone A., 1950. Alterazioni da freddo e da rogna sugli olivi, esemplificate dai danni osservati in alcune zone pugliesi negli anni 1949-1950. *Bollettino della stazione di Patologia vegetale Roma*, 6: 141-174.
- Cirulli M. & Montemurro G.A., 1976. Comparison of pathogenic isolates of *Verticillium dahliae* and sources of resistance in olive. *Poljoprivredna Znanstvena Smotra*, 39: 469-476.
- Cirulli M., Laviola C., Roberti D., 1981. Avversità e difesa. In: “*L’Olivo*” collana “Frutticoltura Anni 80”: 142-167. Ed. REDA.
- Cirulli, M. 1981, Attuali cognizioni sulla verticilliosi dell’olivo, *Informatore Fitopatologico*, 31(1/2): 101-105.
- Cirulli M., Bubici G., Frisullo S., 2009. Complete control of *Verticillium* wilt of olive is obtained using resistant rootstocks. In 10th International *Verticillium* Symposium, 16-20 november, 2009, Corfù Island (Hellas). *Book of Abstracts*: 78.

- Cirulli M., Colella C., Marsico A.D., 2008a. La verticilliosi dell'olivo e la valutazione della resistenza di germoplasma olivicolo italiano, Atti del convegno nazionale sulla ricerca scientifica per l'agricoltura biologica, June 23-24, 2008, Roma, Italy: 119-124.
- Colella C., Miacola C., Amenduni M., D'Amico M., Bubici G., Cirulli M., 2008. Sources of verticillium wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. *Plant Pathology*, 57 (3): 533-539.
- Conti M., 2001. Fitoplasmosi della vite: aspetti epidemiologici. *Quaderni di Viticoltura ed Enologia dell'Università di Torino*, 25: 101-107.
- Danielli A., Bertaccini A., Vibio M., Rapetti S., 1996. Identificazione di fitoplasmi associati allo scopazzo dell'ulivo. *Atti Convegno Annuale Società Italiana di Patologia Vegetale*, Udine: C28-C29.
- Del Serrone P., Faggioli F., Arzone A., Tarquini A., Barba M., 1996. L'olivo, nuovo ospite naturale di fitoplasmi. *L'Informatore Agrario*, 52(13): 71-72.
- Ercolani G.L., 1971. Presenza epifitica di *Pseudomonas savastanoi* (E.F. Smith) Stevens sull'olivo in Puglia. *Phytopathologia mediterranea*, 10: 130-132.
- Ercolani G.L., 1983. Variability among isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* from the ptyloplane of the olive. *Journal of General Microbiology*, 129: 901-916.
- Faggioli F. & Barba M., 1995. An elongated virus isolated from olive *Olea europaea* L. *Acta Horticulturae* 386: 593-599.
- Faggioli F., Ferretti L., Pasquini G., Barba M., 2002. Detection of strawberry latent ringspot nepovirus from leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, 150: 636-639.
- Faggioli F., Ferretti L., Albanese G., Sciarroni R., Pasquini G., Lumia V., Barba M., 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step-RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 87 (1): 45-51.
- Font I., Abad P., Dally E.L., Davis R.E., Jordá C., 1998. Nueva enfermedad en el olivar español. *Phytoma España*, 102: 211-212.
- Fradin E. F. & Thomma B. P. H. J., 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7 (2): 71-86.
- Goud J.C. & Termorshuizen A.J., 2003. Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (6): 523-534.
- Graniti A. & Laviola C., 1981. Sguardo generale alle malattie parassitarie dell'olivo. *Informatore Fitopatologico*, 31: 77-92.
- Grieco F., Alkowni R., Saponari M., Savino V., Martelli G.P., 2000. Molecular detection of olive viruses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 29: 127-133.
- Harris D.C., J.R. Yang, M.S. Ridout, 1993. The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil. *Plant Pathology*, 42: 238-250.
- Hartmann H.T., Schnathorst W.C., Wilhelm S., 1971. Oblonga, a clonal olive rootstock resistant to Verticillium wilt. *California agriculture*, 25: 12-15.
- Hassani D., Buonauro R., Tombesi A., 2003. Response of some olive cultivars, hybrid and open pollinated seedlings to *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. In: Iacobellis *et al.* eds., *Pseudomonas syringae* and related pathogens, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland: 489-494.
- Huisman O.C., 1982. Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 303-327.
- Iacobellis N.S., 2001. Olive knot. In: *Encyclopedia of Plant Pathology*, Vol. 2, eds Maloy O.C. and Murray T.D., John Wiley and sons, New York, USA: 713-715.
- Iacobellis N.S., Lo Cantore P., Sileo M., Celano G., Xiloyannis C., 2005a. Preliminary results on the effect of the agronomic practices on the epiphytic bacterial populations of olive. *Journal of Plant Pathology*, 87: 295-296.

- Iacobellis N.S., Lo Cantore P., Capasso F., Senatore F., 2005b. Antibacterial Activity of the *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (1): 57-61.
- Kabir Z., Bhat R.G., Subbarao K.V., 2004. Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. *Plant Disease*, 88: 49-55.
- Khan A.J., Botti S., Paltrinieri S., Al-Subhi A.M., Bertaccini A., 2002. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? In: *14th International Organization of Mycoplasma Conference*, July 07–12, Vienna, Austria: 6.
- Lavermicocca P. & Surico G., 1987. Presenza epifitica di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* ed altri batteri sull'olivo e sull'oleandro. *Phytopathologia mediterranea*, 26: 136-141.
- Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S.L., Lazzaroni S., Evidente A., Visconti A., 2003. Control of olive knot disease with a bacteriocin. In: Iacobellis *et al.* eds., *Pseudomonas syringae* and related pathogens, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London: 451-457.
- Lee I-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
- Lee I-M., Davis R.E., Gundersen D.E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.
- Li K., Rouse D.I., Eyestone E.J., German. T. L., 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. *Mycological Research*, 103 (11): 1361-1368.
- Lievens B. & Thomma B.P.H.J., 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology*, 95: 1374-1380.
- Lo Cantore P., Iacobellis N.S., De Marco A., Capasso F., Senatore F., 2004. Antibacterial Activity of the *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26): 7862-7866.
- Loconsole G., Saponari M., Faggioli F., Albanese G., Bouyahia H., Elbeaino T., Materazzi A., Nuzzaci M., Prota V., Romanazzi G., Trisciuzzi N., Savino V., 2010. Inter-laboratory validation of PCR-based protocol for detection of olive viruses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 40 (3): 423-428.
- Luthy P., Studer D., Yamvrias C., 1983a. The bacterial symbiont of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Experientia*, 39: 12,1436.
- Luthy P., Studer D., Jaquet F., Yamvrias C., 1983b. Morphology and in vitro cultivation of the bacterial symbiont of *Dacus oleae*. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 56, 1-2: 67-72.
- Mahuku G.S. & Platt H.W., 2002. Quantifying *Verticillium dahliae* in soils collected from potato fields using a competitive PCR assay. *American Journal of potato Research*, 79: 107-117.
- Mannini F. & Marzachi C., 2007. Termoterapia in acqua contro i fitoplasmi della vite. *Informatore Agrario*, 63: 62-65.
- Marcelo A., Fernandes M., Potes M.F., Serrano J.F., 1999. Reaction of some cultivars of *Olea europaea* L. to experimental inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Acta Horticulture*, 474: 581-584.
- Marchi G., Mori G., Surico G., 2004. Some notes on the histology of knots produced by *Pseudomonas savastanoi* in micropropagated olive plants. *Atti XI Congresso Nazionale SIPaV*, Milano, 29 settembre - 1 ottobre 2004: 57.
- Marcone C., 2002. Fitoplasmosi di piante forestali, arbustive ed ornamentali legnose in Europa. *Petria*, 12 (3): 381-386.
- Martelli G.P., Yilmaz M.A., Savino V., Baloglu S., Grieco F., Güldür M.A., Greco N., La Fortezza R., 1996. Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a seemingly new necrovirus. *European Journal of Plant Pathology* 102: 527-536.

- Martos-Moreno C., López-Escudero F.J., Blanco-López M.A., 2006. Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*, Horticulturae Science, 41(5): 1313-1316.
- Materazzi A., Toni S., Panattoni A., Osti M., Triolo E., 1996. Some evidences on occurrence of a new isodiametric virus in *Olea europaea* L. Atti Convegno Annuale della Societa` Italiana di Patologia Vegetale, Udine (IT) 1996, University of Pisa (IT): 57-59.
- McCoy R.E., Caudwell A., Chang C.J., Chen T.A., Chiykowski L.N., Cousin M.T., Dale J.L., De Leeuw G.T.N., Golino D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwitz R., Petzold H., Sinha R.C., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M., Seemuller E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: *The mycoplasmas*, Vol. 5. Academic Press Inc.
- Mercado-Blanco J., Rodríguez-Jurado D., Pérez-Artés E., Jiménez-Díaz R.M., 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. Plant Pathology, 50 (5): 609-619.
- Mercado-Blanco J., Collado-Romero M., Parrilla-Araujo S., Rodríguez-Jurado D., Jiménez-Díaz R.M., 2003. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. Physiological and Molecular Plant Pathology, 63, (2): 91-105.
- Mesturino L., 1990. Possibili ospiti di *Verticillium dahliae* tra la vegetazione infestante di un oliveto toscano. Rivista di Patologia Vegetale, 26: 59-67.
- Mol L., 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. II. Quantitative analysis of the luring effect of crops. European Journal of Plant Pathology 101(6): 679-685.
- Montano H.G., Davis R.E., Dally E.L., Hogenhout S.A., Pimentel J.P., Brioso P.T.S., 2001. 'Candidatus Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 1109-1118.
- Mori N., Malagnini V., Bertaccini A., 2000. Individuazione di fitoplasmi in insetti nel Veneto. Petria, 10: 145-146.
- Murray R.G.E. & Schleifer K.H., 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. International Journal of Systematic Bacteriology, 44: 174-176.
- Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D., Robb J., 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of verticillium wilt pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 39, (1): 1-11.
- Nigro F., Schena L., Gallone P., 2002a. Real-time diagnosis of verticillium wilt of olive by Scorpion-PCR. Atti Convegno Internazionale di Olivicoltura-VI Giornate Scientifiche SOI, Spoleto (Pg), 23-25 Aprile: 454-461.
- Nigro F., Romanazzi G., Gallone P., Ippolito A., 2002b. Distribution of verticillium wilt of olive in Apulia and preliminary data on the occurrence of *Verticillium dahliae* in the soil. Atti Convegno Internazionale di Olivicoltura-VI Giornate Scientifiche SOI, Spoleto (Pg), 23-25 Aprile 2002: 367-374.
- Nigro F., Schena L., Gallone P., Romanazzi G., Ippolito A., 2001. Diagnosi nel terreno di *Verticillium dahliae*, agente di tracheomicosi nell'olivo, con l'uso della PCR in tempo reale. In: Savino V., Amenduni T., Bazzoni A., Boscia D., Pollastro S., Saponari M., eds. Proc.: *Convegno Nazionale "Norme fitosanitarie e commercializzazione delle produzioni vivaistiche"*. Locorotondo (BA), Italy, December, 4-7. Vol. II: 785-791.
- Nigro F., Gallone P., Romanazzi G., Schena L., Ippolito A., Salerno M.G., 2005. Incidence of *Verticillium* wilt on olive in Apulia and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from infected trees. Journal of Plant Pathology, 87 (1): 13-23.
- Pasquini G., Marzachi C., Poggi Pollini C., Faggioli F., Ragozzino A., Bissani R., Vischi A., Barba M., Giunchedi L., Boccardo G., 2000. Molecular characterization of phytoplasmas affecting olive trees (*Olea europaea* L.) in Italy. Journal of Plant Pathology, 82: 213-219.
- Pennisi A.M., Cacciola S.O., Magnano di San Lio G., G. Perrotta, 1993. Evaluation of the

- susceptibility of olive cultivars to verticillium wilt. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 23: 537-541.
- Penyalver R., García A., Ferrer A., Bertolini E., López M.M., 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2673-2677.
- Penyalver R., García A., Ferrer A., Bertolini E., Quesada J.M., Salcedo C.I., Piquer J., Pérez-Panadés J., Carbonell E.A., del Río C., Caballero J.M., López M.M., 2006. Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. Phytopathology, 96: 313-319.
- Petri L., 1915. Malattie prodotte da schizomiceti. In :Le malattie dell'olivo, Istituto micrografico Italiano, Firenze: 68-70.
- Poggi Pollini C., Bissani R., Giunchedi L., Vindimian E., 1995. First report of phytoplasma infection in olive trees (*Olea europea* L.). Journal of Phytopathology, 144: 109-111.
- Quesada J.M., Penyalver R., Pérez-Panadés J., Salcedo C.I., Carbonell E.A., López M.M., 2010. Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. Plant Pathology, 59 (2): 262–269.
- Rodríguez E., García Garrido J.M., García P.A., Campos M., 2008. Agricultural factors affecting Verticillium wilt in olive orchards in Spain. European. Journal of Plant Pathology, 122 (2): 287-295.
- Rodríguez-Jurado D., Blanco-Lopez M.A., Rapoport H.F., Jimenez-Diaz R.M., 1993. Present status of verticillium wilt of olive in Andalusia (Southern Spain). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 23: 513-516.
- Romanazzi G., Musetti R., Marzachi C., Casati P., 2009. Induction of resistance for the control of phytoplasma diseases. Petria, 19 (3): 113-129.
- Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N., La Notte P., Savino V., Scarito G., Martelli G.P., 1999. Partial molecular characterisation and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with leaf yellowing. Journal of Plant Pathology, 81: 37–45.
- Saponari M. & Savino V., (2003). Virus ed agenti virus-simili dell'olivo. Informatore Fitopatologico, 12: 26-29.
- Saponari M., Savino V., Martelli G.P., 2002. Trasmissione per seme di virus isolati da olivo. Frutticoltura, 64 (4): 103-105.
- Savino V. & Gallitelli D., 1981. Cherry leafroll virus in olive. Phytopathologia Mediterranea, 20: 202–204.
- Savino V. & Gallitelli D., 1983. Isolation of cucumber mosaic virus from olive in Italy. Phytopathologia Mediterranea, 22: 76–77.
- Savino V., Barba M., Gallitelli D., 1979. Two nepoviruses isolated from olive in Italy. Phytopathologia Mediterranea, 18: 135–142.
- Savino V., Gallitelli D., Barba M., 1983. Olive latent ringspot virus, a newly recognized virus infecting olive in Italy. Annals of Applied Biology, 103: 243–249.
- Savino V., Piazzolla P., Di Franco A., Martelli G.P., 1984. Olive latent virus 2, a newly recognized virus with differently shaped particles. Proceedings of the VI Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Cairo (EG) 1984, 24–26, University of Florence.
- Savino V., Sabanadzovic S., Scarito G., Laviola C., Martelli G.P., 1996. Two olive yellows of possible viral origin in Sicily. Informatore Fitopatologico 46 (5): 55–59.
- Schroth M.N., Hildebrand D.C., O'Reilly H.J., 1968. Off-flavour of olives from trees with olive knot tumors. Phytopathology, 58: 524-525.
- Schroth M.N., Osgood J.W., Miller T.D., 1973. Quantitative assessment of the olive disease on olive yield and quality. Phytopathology, 63: 1064-1065.
- Sears B.B. & Kirkpatrick B.C., 1994. Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. ASM News, 60 (6): 307-312.
- Sisto A., Lo Cantore P., Iacobellis N.S., 2001. Preliminary results on the response of olive cultivars to artificial inoculation with *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. In: Proceedings of 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union: 240-242.

- Surico G. & Iacobellis N.S., 1992. Phytohormones and olive Knot disease. In: Verma D.P.S. ed., *Molecular Signals in Plant- Microbe Communications*, CRC Press, Boca Raton: 209-227.
- Surico G. & Marchi G., 2003. Olive knot disease: new insights into the ecology, physiology and epidemiology of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. In: Iacobellis *et al.* eds., *Pseudomonas syringae* and related pathogens, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 17-28.
- Teviotdale B.L. & Krueger W.H., 2004. Effects of timing of copper sprays, defoliation, rainfall, and inoculum concentration on incidence of olive knot disease. *Plant Disease*, 88: 131-135.
- Thanassoulopoulos C.C., Biris D.A., Tjamos E.C., 1979. Survey of verticillium wilt of olive trees in Greece. *Plant Diseases Reporter*, 63: 936-940.
- Thanassoulopoulos C.C., Biris D.A., Tjamos E.C., 1981. Weed hosts as inoculum source of Verticillium in olive orchards. *Phytopathologia Mediterranea*, 30: 164-168.
- Tjamos E.C., 1993. Prospects and strategies in controlling verticillium wilt of olive trees. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 23: 505-512.
- Tosi L., & Zizzerini A., 1998. An epidemiological study of verticillium wilt of olive in Central Italy. *Olivae*, 71: 50-55.
- Triolo E., Materazzi A., Toni S., 1996. An isolate of tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea* L. *Advances in Horticultural Science*, 10: 39-45.
- Varanda C., Felix M.R.F., Leitao F., Sismeiro R., Clara M.I.E., 2006. Application of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to screen a collection of clones of *Olea europaea* L. for the presence of necroviruses (Tombusviridae). 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology & British Society of Plant Pathology Presidential Meeting 2006, Frederiksberg, Denmark (DK).
- Varanda C., Silva M, Felix M.R.F., Clara M.I.E., 2011. Evidence of *Olive mild mosaic virus* transmission by *Olpidium brassicae*. *European J. of Plant Pathol.*, 130: 165-172.
- Varvaro L. & Ferrulli M., 1983. Sopravvivenza di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Smith) Young *et al.*, sulle foglie di due varietà di Olivo (*Olea europea* L.). *Phytopathologia mediterranea*, 22: 1-4.
- Wei W., Lee I.-M., Davis R.E., Suo X. Zhao Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2368-2377.
- Wilhelm S., 1981. Sources and genetics of host resistance in field and fruit crops. In: M.E. Mace, A.A. Belle, C.H. Beckman (eds.). *Fungal wilt diseases*. Academic Press, New York: 300-369.
- Wilhelm S., 1955. Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and in the field. *Phytopathology*, 45: 180-181.
- Wilson E.E., 1935. The olive knot disease: its inception, development and control. *Hilgardia*, 9 (4): 233-263.
- Xiao C.L., Hao J.J., Subbarao K.V., 1997. Spatial patterns of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil and Verticillium wilt of cauliflower. *Phytopathology*, 87: 325-331.
- Young J.M., Saddler G.S., Takikawa Y., De Boer S.H., Vauterin L., Gardan L., Gvozdyak R.I., Stead D.E., 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. ISPP Subcommittee on Taxonomy of Phytopathogenic Bacteria. *Review of Plant Pathology*, 75: 721-763.



Figura 1 - Frutti bitorzolati (dx) a confronto con frutti asintomatici (sx)



Figura 2 - Sintomi di giallume diffuso



Figura 3 - Biforcazioni su foglie e rami rinvenuti su una pianta infetta dal virus latente 1 dell'olivo (OLV-1)



Figura 4 - Foglie falciformi



Figura 5 - Disordini vegetativi osservati in olivi da cui sono stati isolati fitoplasmi: in alto a sinistra, accecamento delle gemme, formazione di sferoblasti con rosettamento dei germogli; sulla destra, crescita affastellata “cespugliosa”. In basso sulla sinistra, classici scopazzi; sulla destra, clorosi e deformazioni fogliari, aborti fiorali. (Foto CRA-PAV)



Figura 6 - Tubercoli sviluppati in seguito ad infezioni di cicatrici fogliari (A), ferite dovute a danni da gelo (B), grandine (C) e potatura (D)



Figura 7 - A. Estesa formazione di tubercoli su giovani piante di olivo esito di infezioni di ferite causate da grandine; B. Potatura di sanificazione di giovani piante di olivo pesantemente attaccati dalla rogna esito di infezioni di ferite causate da grandine.



Figura 8 - Talee radicate di olivo attaccate dalla rogna.

2. Tecniche di diagnosi fitopatologica

2.1 Protocollo per la diagnosi dei virus

La diagnosi dei virus dell'olivo si basa principalmente su indagini di laboratorio. La scarsa reattività sintomatica della specie alle infezioni virali, la latenza delle infezioni, la mancata individuazione di indicatori legnosi particolarmente suscettibili da utilizzare per l'indexaggio, la bassa affidabilità delle tecniche sierologiche e delle trasmissioni meccaniche su ospiti erbacei, sono tutti fattori che hanno indirizzato la diagnosi dei virus dell'olivo sull'impiego di tecniche molecolari.

Risultano oggi disponibili diversi protocolli diagnostici di amplificazione genica (a singolo o doppio stadio) e ibridazione molecolare basati sull'impiego di primers e ribosonde virus-specifici. Di seguito viene riportato in dettaglio il protocollo di amplificazione in singolo tubo ottimizzato e validato attraverso un ring-test specifico (Loconsole *et al.*, 2010)

2.1.1 PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE GENICA IN SINGOLO TUBO (ONE TUBE RT-PCR)

(i) Campionamento

Prelevare almeno due distinti campioni per ciascuna pianta da sottoporre a saggio, ciascuno costituito da 6-8 rametti di almeno un anno prelevati lungo tutta la chioma. In alternativa prelevare un primo campione e successivamente, solo a seguito di reazioni negative procedere a prelevare un secondo campione di conferma.

In ogni caso sulle piante risultate esenti da infezioni virali, il campionamento deve essere effettuato in almeno due periodi distinti dell'anno:

- primavera (marzo-giugno);
- fine estate- autunno (settembre-novembre);

raccogliendo in ciascun sopralluogo almeno due campioni/pianta.

(ii) Estrazione degli acidi nucleici totali (TNA)

- a. Preparazione del campione: prelevare almeno 1gr di tessuto corticale da diverse porzioni di talee lignificate.
- b. Omogeneizzare il tessuto in un mortaio in presenza di azoto liquido; qualora non si dovesse disporre di azoto liquido omogeneizzare il tessuto in mortaio o in bustina in presenza del tampone di estrazione.
- c. Usare 0,1g di tessuto di ciascun campione per l'estrazione degli RNA totali con il Kit Qiagen "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, cod. 74904) seguendo le istruzioni del manuale relative al capitolo "Purification of Total RNA from Plant Cells and Tissues and Filamentous Fungi (usare buffer di estrazione RLT).
- d. Eluire gli acidi nucleici totali in un volume finale di 50µl di acqua "RNase free Qiagen".
- e. Conservare a -20°C in attesa di eseguire i saggi, a -70°C per tempi più lunghi.

(iii) One Tube RT-PCR

- a. Preparare 25µl di reazione di amplificazione genica in ogni singolo tubo PCR da 0,2ml seguendo lo schema sotto riportato.

A 2 μ l di TNA* (estratti come al punto 2) aggiungere 23 μ l della seguente miscela di reazione:

Reagenti e concentrazioni nella miscela di reazione	
Buffer Go Taq 1X (PROMEGA)	
5mM DTT	
125 μ M dNTPs	
0,2 μ M Primer senso	
0,2 μ M Primer antisenso	
2,5U AMV-RT (PROMEGA)	} \longrightarrow Tabella 1
20U RNase Out (INVITROGEN) o RNase inhibitor (PROMEGA)	
1,25U Go Taq DNA Polimerasi (PROMEGA)	
H ₂ O RNase free fino a 23 μ l	

*In ogni esperimento di amplificazione genica inserire sempre i controlli (TNA) negativi e positivi per ciascun virus.

- b. Seguire il seguente schema di temperature e cicli per la sintesi del cDNA e amplificazione genica:

Condizioni di amplificazione genica	
46°C 30min	
95°C 3min	
94°C 30sec, 55°C 45sec, 72°C 45sec	35 cicli
72°C 7min	
4 o 16°C	

- c. Visualizzare i prodotti di amplificazione genica mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,2%.

Preparazione di 100ml di gel:

- sciogliere in una beuta a 100 °C 1,2 gr di agarosio per analisi di biologia molecolare in 100ml di Buffer TAE 1X (STOCK 1lt 50X: Tris 242g, Acido acetico 57 ml, EDTA 0,5 M-ph8 100ml).
- versarlo nell'apposita vaschetta allestita con il pettine;
- lasciar solidificare il gel (30min circa);
- inserire il gel nell'apparecchio di corsa aggiungendo buffer TAE 1X fino a ricoprire il gel;
- caricare in ogni pozzetto del gel 6 μ l di campione;
- elettroforesi per circa 30min applicando un voltaggio di 120V;
- colorare il gel in soluzione di Etidio bromuro (10 μ l/100 μ l di H₂O distillata) o alternativamente utilizzare il colorante GEL RED aggiunto preventivamente al gel sciolto in beuta (2,5 μ l/100ml di gel);
- osservare il gel su transilluminatore.

Tabella1. Elenco dei primers virus-specifici utilizzati.

Virus	Primer	Frammento amplificato (bp)	Sequenza (5' – 3')	Riferimenti Bibliografici
ArMV	ArMV-1 ArMV-2	302	TACTATAAGAAACCGCTCCC CATCAAAACTCATAACCCAC	Grieco <i>et al.</i> , 2000
CLRV	CLRV-5 CLRV-3	416	TGGCGACCGTGTAACGGCA GTCGGAAAGATTACGTAAAAGC CCCTTGGTTACTTTTACCTCCTCAT	Faggioli <i>et al.</i> , 2005
SLRSV	SLRSV-5D SLRSV-3D	293	TGTCC AGGCTCAAGAAAACACAC	Faggioli <i>et al.</i> , 2005
OLYaV	OLYaV-1 OLYaV-2	383	GGGACGGTTACGGTCGAGAG CGAAGAGAGCGGCTGAAGGCTC	Sabanadzovic <i>et al.</i> , 1999
OLV-1	OLV1-F OLV1-R	747	CTCACCCATCGTTGTGTGG CACCCACCAAATGGC	Grieco <i>et al.</i> , 2000
OLV2	OLV2-H OLV2-C	206	GAAGGTGGCTCGCCTAGAG GCCAGGAGTTTGAGCTTTG	Faggioli <i>et al.</i> , 2005
CMV	CMV-CPN5 CMV-CPN3	280	ACTCTTAACCACCCAACCTT AACATAGCAGAGATGGCGG	Faggioli <i>et al.</i> , 2005
TNV-D e OMMV	TNV- GP1int5 TNV- GP1int3	257	GTGTTTCAGTCATATACATACC GCCTATTGTGCTGTACCAC	Cardoso <i>et al.</i> , 2004



Figura 1 - Preparazione del campione: tessuto corticale prelevato da diverse porzioni di talee lignificate (sopra) e macerato in mortaio con azoto liquido (sotto).

2.2 Protocollo per la diagnosi di *Verticillium dahliae*

2.2.1 Protocollo di nested-PCR

(i) Estrazione degli acidi nucleici totali da legno d'olivo per la diagnosi molecolare di *Verticillium dahliae*

- Raccolta del campione

Prelevare i campioni di tessuto vegetale dal campo avendo cura di conservarli in opportune condizioni (4-6°C per evitare la disidratazione). I periodi ottimali per il prelievo del campione sono primavera/inizio estate ed autunno.

- Estrazione degli acidi nucleici totali (TNA) dal tessuto legnoso

- a. Scortecciare i rametti e ridurre il legno in scaglette; polverizzare in azoto liquido servendosi di un mortaio.
- b. Ri-sospendere 100mg di tale materiale in 1,5ml di tampone di estrazione (0,2M di Tris-HCl, pH 7,5; 0,25M di NaCl, 25mM di EDTA e 0,5% di SDS) ed aggiungere un volume eguale di PVP (Poli-Vinil-Pirrolidone) e due sfere di acciaio di 5mm di diametro.
- c. Omogenare il campione in vibro mulino alla velocità massima per 1 minuto.
- d. Centrifugare a 14000rpm per 5min (4°C).
- e. Recuperare il surnatante ed aggiungere 1 volume di fenolo-cloroformio (1:1).
- f. Omogenare il campione in vibro mulino alla velocità massima per 1 minuto.
- g. Centrifugare a 14000rpm per 10min (4°C).
- h. Recuperare il surnatante ed aggiungere 1 volume di cloroformio
- i. Omogenare il campione su vortex per 3min e centrifugare per 5min a 14000rpm.
- j. Recuperare il surnatante ed aggiungere 1ml isopropanolo (-20°C, IV) ed 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 5,2.
- k. Centrifugare a 14000rpm per 25min (4°C) e lavare il pellet con 0,5ml di etanolo al 70% freddo (-20°C)
- l. Essiccare sottovuoto (500mm di Hg).
- m. Risospendere in *nuclease free water* (NFW).
- n. Purificare l'estratto di acidi nucleici su colonna cromatografica di Sepharose.

(ii) Estrazione degli acidi nucleici totali da terreno contaminato da microsclerozi di *Verticillium dahliae*

- Campionamento

Prelevare il campione di nei primi 10-15cm di terreno. Il campione deve essere costituito da almeno 4 sub-campioni, prelevati da diversi punti (N, S, W, E) sotto la proiezione della chioma, mescolati uniformemente per dare origine ad un unico campione.

- Separazione dei microsclerozi

- a. Lasciare essiccare all'aria il campione di terreno prelevato in campo per circa 20 giorni.
- b. Separare la terra fina servendosi di un setaccio con maglie di 2mm.
- c. Porre 25gr di terra fina in una beuta frangiflutto ed aggiungere 100ml di acqua distillata; agitare per un'ora a 270rpm su agitatore orbitale.

- d. Filtrate la sospensione di terra fina su due setacci impilati con maglie rispettivamente da 150 e 20 μ m, servendosi di un getto d'acqua per favorire il filtraggio.
- e. Raccogliere il materiale presente sul setaccio inferiore (20 μ m) servendosi di un filtro di carta bibula sterile e lasciare essiccare per 24 ore a temperatura ambiente.

- Estrazione degli acidi nucleici totali (TNA)

- a. Prelevare 0,5g di terreno setacciato secco.
- b. Risospendere in 1ml di tampone di estrazione (Na₂HPO₄ 0,12M, NaCl 1,5M, CTAB 2%) ed aggiungere 50mg di glass beads (ϕ 425-600 μ m) e 2 biglie di acciaio da 5mm.
- c. Omogenare il campione in vibro mulino alla velocità massima per 1 minuto.
- d. Centrifugare a 14000rpm per 10min.
- e. Prelevare il surnatante ed aggiungere 1 volume di cloroformio.
- f. Omogenare il campione su vortex per 3min e centrifugare per 5min a 14000rpm.
- g. Prelevare il surnatante ed aggiungere 1ml di isopropanolo(-20°C) e sodio acetato 3M, pH 5,2 (1/10 del volume) e lasciare precipitare il DNA a -20°C per 30min.
- h. Centrifugare per 15min a 14000rpm 4°C.
- i. Lavare il pellet con 0,5ml di etanolo al 70% (-20°C).
- j. Essiccare sottovuoto (500mm di Hg).
- k. Risospendere in *nuclease free water* (NFW).
- l. Purificare l'estratto di acidi nucleici su colonna cromatografica di Sepharose.

(iii) Nested-PCR

- Prima PCR con primer Ver2/Ver3 specifici per il genere *Verticillium*

- a. Preparare 25 μ l di reazione di amplificazione genica in un tubo da PCR (0,2ml), seguendo lo schema sotto riportato:

A 2 μ l di TNA* (estratti come sopra riportato) aggiungere 23 μ l della seguente miscela di reazione:

Reagenti e concentrazioni nella miscela di reazione
Buffer Taq 1X (SIGMA)
1,6mM MgCl ₂
100 μ M dNTPs
0,2 μ M Primer Ver2
0,2 μ M Primer Ver3
1U Taq DNA Polimerasi (SIGMA)
H ₂ O RNase free fino a 23 μ l

*In ogni esperimento di amplificazione genica inserire sempre i controlli negativi e positivi per *V. dahliae*.

b. Seguire le seguenti condizioni per l'amplificazione genica:

Condizioni di amplificazione	
95°C 5min	
95°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min	35 cicli
72°C 5min	
4 °C	

c. Visualizzare i prodotti di amplificazione genica mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5%.

Preparazione di 100ml di gel:

- sciogliere in una beuta a 100 °C 1,5gr di agarosio in 100ml di Buffer TAE 1X (STOCK 1lt 50X: Tris 242g, Acido acetico 57ml, EDTA 0,5M - pH8 100ml).
- versarlo nell'apposita vaschetta allestita con il pettine;
- lasciar polimerizzare il gel fino a che diventa solido (30min circa);
- inserire il gel nell'apparecchio di corsa aggiungendo buffer TAE 1X fino a ricoprire il gel;
- caricare in ogni pozzetto del gel 15µl di campione;
- applicare la corrente per circa 40min con un voltaggio di 100V;
- colorare il gel in soluzione di Etidio bromuro (10µl/100µl di H₂O distillata) o alternativamente utilizzare il colorante GEL RED aggiunto preventivamente al gel (2,5 µl/100 ml di gel);
- osservare il gel su transilluminatore.

- Seconda PCR con primer Vd10/Vd7b specifici per *Verticillium dahliae*

a. Preparare 25µl di reazione di amplificazione genica in un tubo da PCR (0,2ml), seguendo lo schema sotto riportato:

Ad 1 µl del prodotto di amplificazione ottenuto con i primer Ver2/Ver3 aggiungere 24µl della seguente miscela di reazione:

Reagenti e concentrazioni nella miscela di reazione
Buffer Taq 1X (SIGMA)
1,6mM MgCl ₂
100µM dNTPs
0,2µM Primer Vd10
0,2µM Primer Vd7b
1U Taq DNA Polimerasi (SIGMA)
H ₂ O RNase free fino a 24µl

*In ogni esperimento di amplificazione genica inserire sempre i controlli negativi e positivi per *V. dahliae*.

b. Seguire le seguenti condizioni per l'amplificazione genica:

Condizioni di amplificazione genica	
94°C 2min	
94°C 30sec, 55°C 45sec, 72°C 45sec	35 cicli
72°C 5min	
4 °C	

c. Visualizzare i prodotti di amplificazione genica mediante elettroforesi su gel di agarosio 2%.

Preparazione di 100ml di gel:

- sciogliere in una beuta a 100 °C 2gr di agarosio per analisi di biologia molecolare in 100ml di Buffer TAE 1X (STOCK 1lt 50X: Tris 242g, Acido acetico 57ml, EDTA 0,5M - pH8 100ml).
- procedere come descritto precedentemente.

Sequenza dei primer utilizzati

Primer	Frammento amplificato (bp)	Sequenza (5' – 3')	Riferimenti Bibliografici
Ver2	331	ATCGGCAAATTTTAGGA	Nigro <i>et al.</i> , 2002
Ver3		CGGAATTGGTTCAGTGTA	
Vd10	131	GACCGTCTGCAGCTCATCT	
Vd7b		ATTAGTCATAGGCACTGGA	

2.3 Protocollo per la diagnosi dei fitoplasmi

2.3.1 Protocollo di nested-PCR

A causa della bassa concentrazione dei fitoplasmi nei tessuti infetti di piante arboree in generale e di olivo in particolare, solo sofisticate metodologie diagnostiche molecolari sono in grado di identificare la presenza di questi patogeni. In particolare si tratta di una diagnosi indiretta che ha l'obiettivo di identificare una porzione di DNA fitoplasmale all'interno del genoma dell'olivo. Come DNA target è stato scelto il gene più conosciuto e conservato nell'ambito dei procarioti e cioè il gene ribosomiale 16S.

Il protocollo diagnostico prevede diversi passaggi per ottenere una corretta e affidabile identificazione del patogeno in esame:

- estrazione del DNA totale dal campione da analizzare. Si tratta di un passaggio fondamentale che deve mettere a disposizione per le successive tecniche di amplificazione un DNA target sufficientemente pulito e privo di inibitori della polimerasi. A tale scopo è stato scelto un metodo che è risultato in passato il migliore a seguito di un ring test per la diagnosi di fitoplasmi in fruttiferi (Barba *et al.*, 1998).

- prima amplificazione del gene target (PCR). Il passaggio successivo consiste nell'utilizzo di primer specifici per i fitoplasmi, ma universali per i gruppi tassonomici (P1-P7 - Deng e Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995), in grado di amplificare l'intero gene 16S, la regione spaziatrice adiacente e una piccola parte del gene 23S. Il prodotto ottenuto da questa amplificazione generalmente non risulta visibile all'analisi elettroforetica, per questo è necessario ricorrere ad una seconda amplificazione;

- seconda amplificazione del prodotto di PCR (nested-PCR). Questo passaggio consiste nell'utilizzo di una seconda coppia di primer disegnata internamente alle precedenti, in grado di amplificare in modo specifico i fitoplasmi di tutti i gruppi (R16F2/R2 - Lee *et al.*, 1993). La scelta di utilizzare primer universali è dovuta al fatto che in letteratura sono stati identificati in olivo fitoplasmi appartenenti ad almeno quattro gruppi;

- caratterizzazione del prodotto di nested-PCR. Per identificare e classificare il prodotto di amplificazione ottenuto in nested-PCR, il protocollo prevede un ulteriore passaggio di caratterizzazione. Questa può avvenire o attraverso l'analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) ottenuti dopo appropriate digestioni enzimatiche (questo prevede la disponibilità di controlli positivi di differenti gruppi tassonomici di fitoplasmi e di un gran numero di enzimi di restrizione) o attraverso il sequenziamento dell'amplificato e suo confronto con sequenza in banca dati (Blast analysis).

Di seguito viene riportato il dettaglio del protocollo suggerito ed utilizzato nell'ambito del Progetto OLVIVA.

(i) Estrazione del DNA totale (Barba *et al.*, 1998)

1. Lavare accuratamente le foglie. Preparare 1,5gr di nervature centrali da foglie senza necrosi evidenti. Cambiare lama e supporto di taglio per ogni campione. Utilizzando un bisturi, tagliare le nervature e raccoglierle in piccoli pezzi in un mortaio precedentemente raffreddato e mantenuto in ghiaccio, aggiungendo 7-8ml di PGB (Phytoplasma Grinding Buffer) freddo e preparato poco prima dell'uso. Incubare in ghiaccio per 10-15min.
2. Aggiungere 50mg di sabbia di quarzo sterile e sminuzzare accuratamente col pestello. Aggiungere ancora 5ml di tampone freddo nel mortaio e continuare la macerazione fino ad ottenere una miscela omogenea.
3. Trasferire la miscela in una provetta tipo Corex da 15ml e centrifugare (il rotore deve essere stato preventivamente raffreddato) a 2.500g per 5min in centrifuga refrigerata a 4°C. Quindi

trasferire con cautela il supernatante in una provetta Corex da 15 ml pulita e pre-raffreddata in ghiaccio.

4. Centrifugare a 4°C a 18.000g per 20min. Scartare con attenzione il supernatante e far asciugare le provette capovolte per 1-2min.
5. Risospendere bene (senza fare schiuma) il pellet in 3ml di CTAB buffer usando pipette Pasteur monouso con bocca larga. Trasferire 1ml in una provetta Eppendorf da 2ml. Incubare in bagno termostato (60°C) per 60min. Agitare le provette un paio di volte durante il periodo di incubazione.
6. Aggiungere 1ml di cloroformio-alcol isoamilico (24:1), mescolare la soluzione energicamente e passarla al vortex per omogeneizzarla. Centrifugare 6.000 rpm per 10min, a temperatura ambiente, poi prelevare con attenzione la fase acquosa superiore e trasferirla in una nuova provetta Eppendorf.
7. Precipitare gli acidi nucleici aggiungendo un volume di isopropanolo freddo, mescolando. Mettere i tubi a 4°C o in ghiaccio per 30min. Centrifugare 13.000rpm per 10 min. Quindi scartare il supernatante alcolico e lavare attentamente la provetta con etanolo 70%. Lasciare asciugare all'aria per circa 5min.
8. Risospendere gli acidi nucleici nel tubo con 400µl di TE. Precipitarli aggiungendo 40µl di 3M sodio acetato pH 5,2 e 0,9ml di etanolo 95%. Lasciare incubare per almeno 3 ore a -20°C o 30min a -80°C. Centrifugare a 13.000rpm per 15min, quindi scartare il supernatante alcolico e lavare la provetta con etanolo 70%. Lasciare asciugare all'aria per circa 5min, o meglio, fino a che il preparato è inodore.
9. Risospendere il DNA in 100µl di acqua distillata sterile.

TAMPONI UTILIZZATI per l'ESTRAZIONE degli ACIDI NUCLEICI

PGB (Phytoplasma Grinding Buffer) per 1 litro

K ₂ HPO ₄	16,7g (anidro) o 21,7g (idrato)
KH ₂ PO ₄	4,1g
Saccarosio	100g
BSA	1,5g
PVP P.M.10.000	20g
Acido ascorbico	5,3g

PH 7,6 con KOH

Preparare poco prima dell'uso

NON AUTOCLAVARE

2% CTAB buffer

CTAB	2%
Tris pH 8,0	100mM
NaCl	1,4M
EDTA	20mM

TE buffer

10mM Tris-HCl pH 8,0

1mM EDTA pH 8,0

(ii) Amplificazione genica

- PRIMA PCR

Primer: P1-P7 (Deng e Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995).

Primer	Sequenza (5' – 3')
P1	5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'
P7	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

Reagenti e concentrazioni nella miscela di reazione

Buffer Taq 1X

2mM MgCl₂

0,25mM dNTPs

0,4μM P1

0,4μM P7

1U Taq DNA Polimerasi

1-2μl DNA

H₂O RNase free fino a 25μl finali di reazione

Condizioni di amplificazione

94°C 3min

94°C 45sec, 55°C 1min, 72°C 2min

35 cicli

72°C 10min

4 °C

- PCR NESTED

Si utilizzano i primers R16F2/R2 (Lee *et al.*, 1993) le cui sequenze sono:

Primer	Sequenza (5' – 3')
R16F2	ACG ACT GCT AAG ACT GG
R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G

Reagenti e concentrazioni nella miscela di reazione
Buffer Taq 1X
2mM MgCl ₂
0,25mM dNTPs
0,4µM R16F2
0,4µM R16R2
1U Taq DNA Polimerasi
1-2µl Amplicone P1/P7 diluito 1:30
H ₂ O RNase free fino a 25µl finali di reazione

Condizioni di amplificazione	
94°C 3min	
94°C 30sec, 55°C 2min, 72°C 3min	35 cicli
72°C 10min	
4 °C	

Lunghezza dell'amplificato della nested-PCR circa 1.240bp

(iii) Indicazioni per l'interpretazione dei risultati

La dimensione dell'amplicone atteso nei controlli positivi dopo la nested-PCR è di 1.240pb. Nel caso in cui per nessuno dei positivi si osservi la banda attesa, verificare se il problema è nella PCR diretta o nella nested, attraverso un'elettroforesi dei prodotti ottenuti con i primer P1/P7.

Qualora si ottengano reazioni positive nei campioni di olivo, verificare l'esatta corrispondenza della banda ottenuta rispetto a quella dei controlli positivi, e successivamente procedere con il sequenziamento della stessa o in alternativa con analisi RFLP con enzimi specifici.

2.4 Protocolli per la diagnosi di *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Tra le misure preventive per una lotta integrata alle malattie ad eziologia batterica assume, tra le altre e a seconda della combinazione pianta/patogeno, un ruolo significativo l'uso di: piante certificate sane e prive dei patogeni, terreno per la crescita delle piante ed acqua di irrigazione privi dei patogeni. Ovviamente per accertare la presenza/assenza dei patogeni è necessario disporre di metodi di diagnosi che siano altamente sensibili, specifici, rapidi ed affidabili. Attualmente nell'Unione Europea si tende ad utilizzare l'approccio di diagnosi integrata che includa i metodi tradizionali, sierologici e molecolari e il protocollo risultante viene validato in *ring tests*. I protocolli approvati sono disponibili presso il *Central Science Laboratory* (www.csl.gov.uk/prodserv/known/diagpro) attualmente *The Food and Environment Research Agency (Fera)* (<http://www.csl.gov.uk/cslIsNowFera.cfm>) (York, UK) e sono pubblicati dalla *European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)* (www.eppo.org).

Nel materiale olivicolo asintomatico le cellule del batterio *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, l'agente della rogna dell'olivo, possono avere una posizione epifita [batteri associati alle superfici delle piante ed agli organi di propagazione vegetativa (talee, marze e gemme, ecc)] con livelli di popolazioni variabili anche in relazione al periodo stagionale e alla cultivar considerata e, potenzialmente, una posizione endofita (infezioni latenti) con livelli di popolazioni bassi. Indagini sviluppate presso il Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Laboratorios de Virología e Inmunología y Bacteriología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, Spagna, hanno permesso la messa a punto di protocolli per la diagnosi di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* in materiale vegetale olivicolo asintomatico. I protocolli sono basati sulla amplificazione a catena della Polimerasi (PCR) del gene della sintetasi della lisina coniugata dell'acido indolacetico (*indolacetic acid lysine synthetase*) (*iaaL*) (Glass e Kosuge, 1986) apparentemente presente in ceppi di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ma non nel microbiota associato a piante di olivo (Penyalver *et al.*, 2000). In particolare sono stati messi a punto dei metodi di PCR diretti (Penyalver *et al.*, 2000), nested-PCR (Bertolini *et al.*, 2003a) e di multiplex-PCR (Bertolini *et al.*, 2003b). Quest'ultimo permette la diagnosi contemporanea di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* e di quattro virus: Cucumber mosaic virus (CMV), Cherry leaf roll virus (CLRV), Strawberry latent ring spot virus (SLRSV) e arabis mosaic virus (ArMV).

Il metodo è specifico e altamente sensibile in quanto permette la diagnosi di 1-10 CFU/ml del campione da analizzare come da protocollo sopra illustrato. Il lavaggio degli organi (foglie, rametti) permette sicuramente il recupero di eventuali cellule del patogeno presenti sul filloplano ma, apparentemente, non quelle presenti nelle nicchie di infezione (cicatrici fogliari). La fase di arricchimento del patogeno nel substrato semiselettivo è necessaria per una buona sensibilità del metodo permettendo quindi di poter rilevare anche modeste quantità del batterio.

2.4.1 Protocollo per la diagnosi di *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* mediante nested-PCR in singolo tubo (Bertolini *et al.*, 2003a)

i) Campionamento

Prelevare rametti di olivo in primavera ed autunno quando il livello della popolazione epifita di *P. savastanoi* pv. *savastanoi* è più elevato.

ii) Estrazione del DNA batterico dal campione da analizzare (Llop *et al.*, 1999)

Il materiale vegetale da analizzare viene sottoposto a lavaggio in appropriate condizioni. In particolare, 20g di foglie o di sezioni di rametti (ca 0,5cm) di olivo sono posti in 100ml della soluzione di Ringer (Shaad *et al.*, 1990) contenente lo 0,05% di Tween20; il campione è messo ad

agitare per 90min a 200rpm a temperatura ambiente. Quindi 500µl della sospensione vengono aggiunti a 4,5ml di substrato semiselettivo PVF-1 (Surico e Lavermicocca, 1989) e il campione incubato a 25°C per 72h 500µl del campione dopo arricchimento nel substrato semiselettivo sono centrifugati a 10.000g per 10min. Il pellet è risospeso nel tampone di estrazione (200mM Tris-HCl pH 7,5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP), omogeneizzato mediante vortex e lasciato in agitazione per 2h a temperatura ambiente e quindi centrifugato a 5.000g per 5min. A 450µl del supernatante vengono aggiunti 450µl di isopropanolo e la miscela viene agitata lentamente e lasciata a riposare a temperatura ambiente per 1h. La miscela viene centrifugata a 13.000g per 10min e, allontanato il supernatante, il pellet viene disidratato sotto vuoto e successivamente risospeso in 100µl di acqua sterile. In alternativa l'estrazione del DNA può essere effettuata anche mediante kit commerciali.

iii) One tube nested –PCR (Bertolini *et al.*, 2003a)

Primer per la prima PCR: IAALF- IAALR (Penyalver *et al.*, 2000)

Primer per la nested PCR: IAALN1- IAALN2 (Bertolini *et al.*, 2003a)

Primer	Sequenza (5' – 3')
IAALF	GGC ACC AGC GGC AAC ATC AA
IAALR	CGC CCT CGG AAC TGC CAT AC
IAALN1	CTC CCT CTC CAA CGT CTT C
IAALN2	GCC TGA TGA TTT TCT TCT G

Reagenti e concentrazioni nella miscela di reazione

Buffer Taq 1X (invitrogen)
 2mM MgCl₂
 3% formamide
 0,2mM dNTPs (Pharmacia LKB)
 0,005µM IAALF- IAALR
 2µM IAALN1-IAALN2
 2U taq DNA polimerasi (Invitrogen)
 10% Glicerolo
 5µl DNA
 H₂O RNase free fino a 25µl finali di reazione

Condizioni di amplificazione	
94°C 5min	
94°C 30sec, 62°C 30sec, 72°C 30sec	25 cicli
94°C 30sec, 50°C 30sec, 72°C 30sec	40 cicli
72°C 10min	
4 °C	

iv) Analisi del prodotto di amplificazione

Un'aliquota (10µl) del prodotto di amplificazione viene separato mediante elettroforesi (a ca. 100V) in agarosio al 2%TAE, mentre 1µl viene utilizzato per l'ibridazione con sonda (5'CTG CCC GGT GAT CGC TGC GCC AAC CTG TTC ACG ATC AAC CTG TT-3') interna al prodotto di amplificazione e marcata con digoxigenina. Allo scopo il prodotto di amplificazione viene denaturato a 95°C per 5min e successivamente incubato in ghiaccio per qualche minuto prima di essere deposto su una membrana di nylon carica positivamente (Roche). Il campione viene lasciato asciugare a temperatura ambiente e quindi messo a ibridare con la suddetta sonda (10pmol/ml) a 60°C per 2h. Le fasi di pre-ibridazione, ibridazione e colorazione sono effettuate usando il kit DIG (Roche) seguendo le istruzioni del produttore.

Bibliografia

- Barba M., Boccardo G., Carraro L., Del Serrone P., Ermacora P., Firrao G., Giunchedi L., Loi N., Malfitano M., Marcone C., Marzachi C., Musetti R., Osler R., Palmano S., Poggi Pollini C., Ragozzino A., 1998. Confronto di differenti tecniche di diagnosi applicate al rilevamento di fitoplasmi in pomacee. *Notiziario sulla Protezione delle Piante*, 9: 263-278.
- Bertolini E., Peñalver R., García A., Olmos A., Quesada J.M., Cambra M., López M.M., 2003a. 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.
- Bertolini E., Olmos A., López M.M., Cambra M., 2003b. Multiplex Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in a Single Tube for Sensitive and Simultaneous Detection of Four RNA Viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Trees. *Phytopathology*, 93 (3): 286-292.
- Cardoso J.M.S., Felix M.R., Oliveira S., Clara M.I.E., 2004. A Tobacco necrosis virus D isolate from *Olea europea* L.: viral characterization and coat protein sequence analysis. *Archives of Virology* 149: 1129-1138.
- Deng S. & Hiruki C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal Microbiological Methods*, 14: 53-61.
- Faggioli F., Ferretti L., Albanese G., Sciarroni R., Pasquini G., Lumia V., Barba M., 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 87 (1): 49- 55.
- Glass N. L. & Kosuge T., 1986. Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, 166: 598-603.
- Grieco F., Alkowni R., Saponari M., Savino V., Martelli G.P., 2000. Molecular detection of olive viruses. *Bulletin EPPO/OEPP Bulletin*, 29: 127-133.
- Lee I-M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E., 1993. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559-566.

- Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C., López M.M., 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23-31.
- Loconsole G., Saponari M., Faggioli F., Albanese G., Bouyahia H., Elbeaino T., Materazzi A., Nuzzaci M., Prota V., Romanazzi G., Trisciuzzi N., Savino V., 2010. Inter-laboratory validation of PCR-based protocol for detection of olive viruses. *EPP0 Bulletin*, 40 (3): 423-428.
- Nigro F., Schena L., Gallone P., 2002. Real-time diagnosis of verticillium wilt of olive by Scorpion-PCR. *Atti Convegno Internazionale di Olivicoltura-VI Giornate Scientifiche SOI, Spoleto (Pg)*, 23-25 Aprile: 454-461.
- Penyalver R., García A., Ferrer A., Bertolini E., López M.M., 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2673-2677.
- Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N. La Notte P., Savino V., Scarito G., Martelli G.P., 1999. Partial molecular characterisation and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, 81: 37-45.
- Schaad N.W., Süle S., Van Vuurde J.W.L., Vrugink H., Alvarez A.M., Benedict A.A., De Wael L., Van Laere O., 1990. Serology. In: Z. Klement, K. Rudolph, and D.C. Sands (eds), *Methods in phyto bacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest: 153-190.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In: Razin S., Tully J.G., *Coord. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1: 369-380.
- Surico G. & Lavermicocca P., 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Phytopathology*, 79 (2):185-190.

3. Tecniche di risanamento

Per questa specie a differenza dei fruttiferi e della vite, non sono disponibili protocolli già standardizzati e validati; le tecniche che brevemente si riportano sono state impiegate principalmente per il risanamento dal virus dell'accartocciamento fogliare del ciliegio (CLRV) e dal virus associato all'ingiallimento fogliare dell'olivo (OLYaV).

Tecniche utilizzate:

- Coltura *in vitro* di apici meristematici
- Termoterapia: (i) *in vitro* ed (ii) *in vivo*

3.1 Protocollo per la coltura *in vitro* di apici meristematici

I meristemi apicali, normalmente, nel loro tratto distale di 0,1-0,5 mm non contengono patogeni interni, per cui con la loro coltura *in vitro* o con il microinnesto è possibile produrre piante sane. In olivo, sebbene siano stati fatti numerosi tentativi di coltura dei meristemi di gemme prelevate da piante in campo e da serra, non è stato ancora possibile ottenere piante, in quanto questi, indipendentemente dalle dimensioni o dal periodo dell'anno in cui vengono espianati, imbruniscono rapidamente, sia se posti in substrato di coltura sia se micro-innestati su vari tipi di portinnesti. Recenti studi (*in litteris*) hanno dimostrato che è possibile risanare l'olivo da virus ricorrendo alla propagazione *in vitro* per fornire gemme i cui meristemi sono poco soggetti ad imbrunimento.

La coltura *in vitro* di apici meristematici si è rivelata la tecnica più promettente nel risanamento da OLYaV, in quanto consente di ottenere germogli risanati in tempi relativamente brevi.

Essa consiste nell'insediare sterilmente *in vitro* degli espianati prelevati dalle fonti infette che sono sottoposti a brevi e rapide subculture *in vitro* seguendo il protocollo riportato nello schema seguente:

FASE 1: Stabilizzazione *in vitro* del materiale vegetale

Dopo il prelievo di germogli di 5-6cm si procede alla sterilizzazione lavando molto bene i germogli sotto acqua corrente per eliminare la presenza di eventuali contaminanti esogeni; tagliare dai germogli le foglie cercando di mantenere il picciolo e ridurre gli stessi in taleine uninodali (Fig.1). Porre gli espianati in un becker in vetro da circa 250ml, coprire con una garza e lavare sotto acqua corrente, agitare più volte e lasciare in immersione per mezz'ora in acqua distillata sterile.

La sterilizzazione si effettua, in ambiente sterile, immergendo le taleine in una soluzione acquosa allo 0,05%, di cloruro mercurio HgCl₂ per 10 minuti. Successivamente lavare per almeno tre volte con acqua distillata sterile mantenendo in immersione le microtalee per circa 1 minuto ad ogni lavaggio.

Tagliare leggermente gli espianati nella parte sopra e sottostante il nodo ed insediare in piastre Petri di diametro 90-100mm contenenti terreno solido di stabilizzazione la cui composizione, diversa a seconda delle varietà, si riporta nelle tabelle 1 - 2.

Per alcune cultivar, quali Frantoio e Moraiolo, si può aggiungere dikegulac 66,7μM (Mendoza-de Gyves *et al.*, 2008) al substrato di proliferazione per ridurre la dominanza apicale ed aumentare il numero di germogli prodotti (Rugini, comunicazione personale).

Chiudere con parafilm e conservare in camera di crescita in condizioni controllate: 24°C luce (circa 3000lux) fotoperiodo 16 ore luce/8 buio.

FASE 2: Moltiplicazione *in vitro* del materiale vegetale

Dopo circa 40gg trasferire gli espianti su un mezzo di coltura rinnovato di composizione uguale al precedente. Suddividere le taleine in singoli germogli ascellari. A seconda della grandezza delle piante in moltiplicazione si possono usare contenitori sterili di diversa misura: piastre Petri per i più piccoli, vasi in vetro di circa 250/500ml per i più grandi.

FASE 3: Prelievo degli apici meristematici

Dalle piante in moltiplicazione *in vitro* (Fig. 2) con l'ausilio di uno stereomicroscopio prelevare gli apici meristematici di 0,4-0,6mm dalle gemme apicali ed ascellari. Insegiare gli apici su piastre Petri contenenti substrato di uguale composizione al precedente. Mantenere gli apici in camera di crescita alle condizioni sopradette. Rinnovare il substrato di coltura ogni 30-40 giorni. Dopo un tempo variabile di 70-120gg di coltura in cui l'apice può essere anche moltiplicato fino ad un max di 5-6 piante, gli apici possono essere posti in radicazione.

FASE 4: Radicazione

Trasferire in provetta con substrato di radicazione (composizione riportata in tabelle 1 - 2) le piante migliori, per consistenza e struttura, mantenere per circa 10-15 giorni e trasferire quindi le piantine alla successiva fase di ambientamento.

FASE 5: Ambientamento

L'ambientamento rappresenta il punto più critico del processo perché le piante subiscono un forte stress nel passare da una condizione *in vitro* ad una *in vivo*.

Trapiantare le piante al termine della fase di radicazione (con o senza radici purchè in presenza di callo) in dischetti di torba precompressa (Jiffy-pots) e mantenerle in una fase di pre-acclimatamento ossia in contenitori chiusi con film plastico in condizioni controllate. Dopo 15gg rimuovere gradatamente il film plastico e trapiantare le giovani piantine in vaso con una miscela sterile di torba, sabbia e perlite proteggendole sempre con film plastico che sarà eliminato dopo altri 15-20gg.

3.2 Protocollo di termoterapia

Termoterapia *in vitro* Porre in camera calda a 38° C i vasi in vetro con i germogli in attiva moltiplicazione (fotoperiodo di 16/8h; intensità di circa 5000Lux).

Sistemare i contenitori all'interno di vaschette di plastica con dell'acqua (cambiata periodicamente) in modo da mantenere la temperatura del substrato di qualche grado inferiore a quella dell'ambiente.

Il trattamento termoterapico deve avere una durata di circa 30gg. Successivamente con l'ausilio di uno stereomicroscopio, prelevare gli apici meristematici (0,4-0,6mm) come descritto per la fase 3 della tecnica di coltura *in vitro*, e seguire il medesimo protocollo.

Il trattamento a caldo può essere ripetuto per una o due volte.

Termoterapia in vivo Sottoporre a questo trattamento piante di circa due anni dopo opportuna potatura, concimazione e rinvaso; il trattamento termoterapico deve essere eseguito in camera calda a 36-38°C per un periodo variabile da un minimo di 60 giorni fino a 4-5 mesi. Il periodo migliore per iniziare il trattamento termoterapico è inizio inverno. Si consiglia un periodo di precondizionamento delle piante di circa 15 giorni a 24°C.

Al termine del periodo di trattamento prelevare i germogli di 1-2cm e insediare, *in vitro* con la stessa procedura indicata per la coltura degli apici meristemati e seguire il protocollo già descritto.

3.3 Verifica sanitaria

Le microplattule rigenerate *in vitro* possono essere sottoposte ad accertamento virologico mirato già dopo 40gg, utilizzando il protocollo descritto nel capitolo 2, su campioni costituiti da porzioni di foglie e fusticini prelevati dalla microplantula (Fig. 3). In caso il saggio dia esito negativo, ripeterlo sulla stessa plantula per almeno 3 volte a distanza di 6 mesi l'uno dall'altro.

Bibliografia

- Leva A.R., Petruccelli R., Muleo R., Goretti R., Bartolini G., 1995. Influenza di fattori trofici, regolativi e condizioni del mezzo nutritivo sulla coltura in vitro di diverse cultivar di olivo. *Atti del Conv. L'olivicoltura mediterranea: stato e prospettive della ricerca*. Rende (CS), 26-28 gennaio: 239-248.
- Mendoza-de Gyves E., Farida Rosana Mira, Ruiu F., Rugini E., 2008. Stimulation of node and lateral shoot formation in Micropropagation of olive (*Olea europea* L.) by using dikegulac. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92: 233-238.
- Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulture* 24:123-134.

Tabella 1. Composizione dei Substrati di coltura per le fasi di insediamento, di moltiplicazione e radicazione utilizzato per le varietà Coratina, Frantoio, Moraiolo, Nocellara del Belice, Simone

<i>Componenti</i>	<i>Insedimento e moltiplicazione</i>	<i>Radicazione</i>
	<i>Rugini 1984 mod.</i>	<i>Rugini 1984 mod.</i>
Macroelementi	mg/litro	mg/litro
NH ₄ NO ₃	412	412
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332,16	332,16
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	416,92	416,92
KCl	500	500
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	732,60	732,60
KNO ₃	1100	1100
KH ₂ PO ₄	340	340
Microelementi	<i>Rugini 1984 mod.</i>	<i>Rugini 1984 mod.</i>
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,90	16,90
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	14,30	14,30
H ₃ BO ₃	12,40	12,40
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025
KI	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,25	0,25
Chelato di ferro	mg/litro	mg/litro
FeNaEDTA	36,70	36,70
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8
Ormoni		
Zeatina mixed isomer	0,5	-----
NAA	-----	1
Vitamine e amminoacidi	<i>Rugini 1984 mod.</i>	<i>Rugini 1984 mod.</i>
	mg/litro	mg/litro
Myo-Inositolo	100	100
Biotina	0,05	0,05
Ac.Folico	0,50	0,50
Glicina	2,0	2,0
Ac.nicotinico	5,0	5,0
Tiammina clor.	0,5	0,5
Piridossina	0,5	0,5
Altri composti	g/litro	g/litro
Glutazione ridotto	0,2	-----
Putrescina	-----	0,16
Mannitolo	36	25
Brilliant Black (Sigma)	-----	0,1
Plant- Agar	7	7
PH	5,8- 6.0	5,8 -6.0

Tabella 2. Composizione dei substrati di coltura per le fasi di insediamento, di moltiplicazione e radicazione utilizzato per le varietà Biancolilla, Calatina, Cerasola, Cima di Melfi, Crasto Moresca, Nocellara Etnea, Oliva rossa, Rapparina

<i>Componenti</i>	<i>Insedimento e moltiplicazione</i>	<i>Radicazione</i>
	<i>Leva et al. 1995 mod.</i>	<i>Leva et al. 1995 mod.</i>
Macroelementi	mg/litro	mg/litro
NH ₄ NO ₃	825	825
CaCl ₂ ·2H ₂ O	470	470
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	185	185
KNO ₃	950	950
KH ₂ PO ₄	85	85
Microelementi	mg/litro	mg/litro
MnSO ₄ ·H ₂ O	22,3	22,3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	15,5	15,5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25
KI	0,83	0,83
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025
Chelato di ferro	mg/litro	mg/litro
FeNaEDTA	37,80	37,80
Ormoni	mg/litro	mg/litro
Zeatina mixed isomer	1	-----
NAA	-----	1
Vitamine e amminoacidi	mg/litro	mg/litro
Myo-Inositolo	100	100
Ac.nicotinico	1,0	1,0
Tiammina cl.	10	10
Piridossina	1	1
Acido ascorbico	1	1
Altri composti	g/litro	g/litro
Mannitolo	18	18
Putrescina	-----	0,16
Glutatione ridotto	0,2	-----
Brilliant Black (Sigma)	-----	0,1
Agar	7	7
PH	6.2	6.2



Figura 1 - Germoglio di 5-6 cm prima della fase di sterilizzazione



Figura 2 - Germogli di olivo in fase di moltiplicazione



Figura 3 - Piante di olivo ambientate, pronte per il saggio diagnostico

4. Approfondimenti tecnici

4.1 Normative di riferimento per le produzioni vivaistiche olivicole

4.1.1 Normative nazionali ed europee

La necessità di disporre di materiali di propagazione “sani” e geneticamente “certi” è stata recepita, sin dagli anni '90, dagli Organi legislativi sia a livello regionale sia nazionale che comunitario.

Il Ministero per le Politiche Agricole e Forestali nel 1993 ha provveduto, infatti, a disciplinare la materia stabilendo le “Norme tecniche per la produzione di materiale certificato” (DM 16/06/1993). Provvedimento legislativo che rientrava in un percorso di certificazione volontaria istituito dallo stesso Ministero con il DM del 23/10/1987 e reso operativo con il DM 2/7/1991 n. 289. A seguito di un decennio di attività del Sistema di certificazione volontario, diversi fattori (insorgenza di nuovi e pericolosi organismi nocivi; adozione di nuove tecniche diagnostiche; necessità di adeguarsi alle normative comunitarie; trasferimento delle competenze dallo Stato alle Regioni) hanno reso indispensabile la revisione e l'aggiornamento dei succitati decreti e delle prescrizioni contenute. L'iter di aggiornamento e revisione si è concluso con l'emanazione del DM del 24/7/2003 “Organizzazione del servizio nazionale di certificazione volontaria del materiale di propagazione vegetale delle piante da frutto”, seguito dal DM 4/5/2006 “Disposizioni generali per la produzione di materiale di moltiplicazione delle specie arbustive ed arboree da frutto, nonché delle specie erbacee a moltiplicazione agamica” e dalla pubblicazione del DM 20/11/2006 “Disciplinare per la produzione di materiali di propagazione certificati di olivo”. Tra gli aspetti innovativi di questo disciplinare, rispetto al precedente provvedimento (DM 16/06/1993), si citano: (a) l'introduzione di precise metodiche diagnostiche di laboratorio nell'accertamento dello stato sanitario dei materiali certificati di categoria virus-esente (VF) e virus-controllato (VT); (b) la possibilità di accompagnare, ai controlli di corrispondenza varietale tradizionali su base bio-morfologica, tecniche molecolari di analisi del DNA.

Anche la Comunità Europea ha preso in esame la necessità sollevata da tecnici ed ortofrutticoltori di disporre di materiali di propagazione con precise garanzie di corrispondenza varietale e fitosanitarie, formulando norme uniche per l'intero territorio comunitario. La qualità del materiale oggetto della commercializzazione e il principio della libera circolazione all'interno dell'Unione Europea sono i due elementi basilari della legislazione europea regolante questo settore. Si citano a tal fine la Direttiva n. 77/93/CEE che ha introdotto il passaporto, e le Direttive 92/34/CEE e 93/48/CEE relative alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e delle piante da frutto destinate alla produzione di frutti. Le indicazioni stabilite nella Dir. 93/48/CEE sono state recepite a livello nazionale con il DM 14/04/1997. Tra i principali aspetti innovativi introdotti con questo decreto ministeriale si cita: la categoria di materiali di propagazione CAC (Conformità Agricola Communitatis), per la quale sono definiti precisi requisiti fitosanitari e varietali; la responsabilizzazione del fornitore (vivaista) che è tenuto a rilasciare il documento di commercializzazione configurato come un'autocertificazione delle caratteristiche sanitarie, varietali e biometriche del materiale di propagazione; ed infine l'obbligo da parte del fornitore di seguire un preciso protocollo di individuazione dei punti critici nel processo produttivo del materiale CAC. Pur considerando questi importanti aspetti innovativi, le Direttive citate e il DM 14/04/1997 che le recepisce non soddisfano totalmente le esigenze di chiarezza e precisione indispensabili per una loro corretta ed uniforme applicazione su tutto il territorio comunitario e nazionale. E' da precisare che le Direttive europee sinora emanate rappresentano la prima fase del processo di istituzione di un sistema di certificazione comunitario, cui attualmente sta lavorando un apposito Comitato, col difficile compito di conciliare diversità strutturali, produttive e commerciali, col fine di raggiungere l'obiettivo di armonizzare ed uniformare i sistemi di certificazione nazionali attivi nei diversi Stati membri.

4.1.2 La certificazione volontaria: aspetti tecnici

L'esigenza della certificazione dei materiali di propagazione di olivo ha trovato giustificazione principalmente nella grande eterogeneità che caratterizza le cultivar e negli elevati standard sanitari richiesti dalle succitate Direttive CEE sulle condizioni minime per la commercializzazione dei materiali di moltiplicazione. L'olivo, infatti, rispetto ad altre specie frutticole è poco gravato da patogeni in grado di causare danni particolarmente seri, seppur numerosi sono i virus segnalati su olivo e sempre maggiore rilevanza assumono le infezioni da *Verticillium dahliae*, soprattutto nei nuovi impianti.

Come accennato precedentemente, in Italia la certificazione dei materiali di moltiplicazione di olivo è stata disciplinata sin dal 1993, con l'emanazione del DM 16/06/1993 recentemente abrogato e sostituito dal DM 20/11/2006.

Il sistema di certificazione volontario italiano, così come previsto dai provvedimenti istitutivi del sistema stesso, si basa su un processo di filiazione diretta, che a partire da una pianta capostipite "fonte primaria" attraverso successive propagazioni consente di produrre le piante madri necessarie alla costituzione dei campi di piante madri dei vivaisti (Tab. 1). La fonte primaria non è altro che la pianta capostipite ottenuta mediante selezione clonale (se necessaria) e sanitaria (eventualmente risanata), sottoposta a controlli fitosanitari per l'esonazione dai virus ed agenti virus-simili, previsti dal DM 20/11/2006, per la corrispondenza varietale o clonale e conservata in serre a rete a prova d'insetto. E' evidente che il sistema in tal modo assicura: (a) uniformità genetica in quanto tutto il materiale di una determinata cultivar/clone deriva da un'unica pianta capostipite (fonte primaria); (b) garanzie fitosanitarie; (c) tracciabilità e rintracciabilità.

Di seguito si descrivono in sintesi i requisiti minimi (fitosanitari e di corrispondenza varietale) che i materiali iniziali devono possedere per accedere al sistema di certificazione (registrazione), le fasi per la conservazione e moltiplicazione del materiale certificato e i controlli previsti in ogni fase.

a) Registrazione delle fonti primarie di olivo: (art. 13 DM 24/07/2003; art. 2 DM 4/05/2006; art. 2 DM 22/11/2006)

L'inserimento in certificazione di nuove accessioni di olivo avviene su richiesta del costituente, il quale si impegna a conservare la fonte primaria in strutture che ne garantiscono lo stato sanitario. La richiesta di registrazione va corredata della seguente documentazione:

- ◆ Relazione relativa alle metodologie utilizzate per la produzione della "fonte primaria".
- ◆ Scheda pomologica.
- ◆ Scheda fitosanitaria.
- ◆ Dichiarazione relativa al luogo, alle modalità di conservazione in condizioni di sanità della "fonte primaria" e al soggetto responsabile.
- ◆ Per le accessioni di cultivar soggette a vincoli di moltiplicazione, copia della documentazione sulla privativa (domanda e rilascio) con elenco dei beneficiari.
- ◆ Per le accessioni di cultivar non soggette a vincoli di moltiplicazione, dichiarazione attestante tale stato.
- ◆ Dichiarazione di appartenenza o non appartenenza a Organismi Geneticamente Modificati (OGM).

Rispetto alla vecchia normativa con i nuovi provvedimenti vi è la possibilità di immettere nuove selezioni direttamente nelle fasi di conservazione e premoltiplicazione, a condizione che siano in possesso delle caratteristiche richieste. Questa possibilità, se utilizzata dai costitutori, dovrebbe consentire di realizzare contestualmente alla registrazione i campi di piante madri dei vivaisti, riducendo i tempi che intercorrono tra registrazione ed utilizzazione dei materiali certificati da parte dei vivaisti.

Tabella 1. Organizzazione del sistema di certificazione volontaria secondo quanto stabilito dal D.M. del 24/07/2003

Fasi	Categoria dei materiali di propagazione	Responsabilità	Controlli <i>di corrispondenza varietale e fitosanitari</i>	Supporto tecnico- scientifico: CTS
Costituzione delle fonti primarie	Fonte primaria	Costitutore	Costitutore	
Registrazione	Fonte primaria	MiPAAF-CTS		
Conservazione per la premoltiplicazione	Prebase	Organismo riconosciuto dall'Organo certificante	SFR	
Premoltiplicazione	Base	Organismo riconosciuto dall'Organo certificante	SFR	
Moltiplicazione	Certificato	Vivaisti (associazioni, consorzi)	SFR	
Propagazione	Certificabile	Vivaisti	SFR	
	↓ (Controlli) certificato			

MiPAAF: Ministero per le Politiche Agricole, Agroalimentari e Forestali

CTS: Comitato Tecnico Scientifico del MiPAAF

SFR: Servizio Fitosanitario Regionale competente per territorio

b) Categorie e stato sanitario dei materiali di propagazione: (artt.11 e 12 DM 24/07/2003; art. 8 DM 4/05/2006; art. 4 DM 20/11/2006)

Il materiale di moltiplicazione (semi, talee, marze, gemme, piante, compresi i portinnesti, nonché colture *in vitro*) è classificato nelle seguenti **categorie**:

- ◆ **fonte primaria**: materiale di origine prodotto dal costituente e conservato dal medesimo o dagli aventi causa;
- ◆ **pre-base**: materiale prodotto da piante ottenute dalla prima moltiplicazione della fonte primaria e mantenuto presso il Centro di Conservazione per la Premoltiplicazione in numero minimo di 2 piante madri;
- ◆ **base**: materiale prodotto da piante ottenute dalla prima moltiplicazione del materiale pre-base e mantenuto presso il centro di premoltiplicazione in un numero di piante madri variabili (minimo 2) in relazione all'importanza e alle tecniche di moltiplicazione della specie e della cultivar considerata;
- ◆ **certificato**: materiale prodotto da piante ottenute dalla prima moltiplicazione del materiale base e mantenuto presso il centro di moltiplicazione, in numero di piante madri variabili in relazione all'importanza e alle tecniche di moltiplicazione della specie e della cultivar considerata, da utilizzare per le produzioni commerciali da certificare (*la certificazione di queste ultime avviene attraverso i controlli del SFR*).

Queste categorie di materiali di propagazione possono essere commercializzate con due diversi stati sanitari: **virus esente** (VF = virus free): materiale esente da virus, viroidi, fitoplasmi ed altri agenti infettivi sistemici noti per la specie considerata al momento della promulgazione della normativa; **virus controllato** (VT = virus tested): materiale esente da virus, viroidi, fitoplasmi ed altri agenti infettivi specifici di particolare importanza economica, come indicato dalle specifiche normative di certificazione. In particolare, per l'olivo l'elenco delle malattie e degli organismi nocivi di cui deve essere accertata l'assenza nelle fonti primarie e nei materiali di categoria "prebase", "base" e "certificato" è riportato nella tabella 2.

Tabella 2. Organismi nocivi e malattie contemplate dal DM 20/11/2006

Malattia / Organismo nocivo	Stato sanitario		
	SIGLA	Virus- esente (VF)	Virus- controllato (VT)
VIRUS			
Mosaico dell'Arabis	ArMV	X	X
Accartocciamento fogliare del ciliegio	CLRV	X	X
Maculatura anulare latente della fragola	SLRSV	X	X
Mosaico del cetriolo	CMV	X	
Latente 1 dell'olivo	OLV-1	X	X
Latente 2 dell'olivo	OLV-2	X	
Associato all'ingiallimento fogliare dell'olivo	OLYaV	X	X
Necrosi del tabacco	TNV	X	
FITOPLASMI			
		X	X
FUNGHI			
Tracheovorticiliosi: <i>Verticillium dahliae</i>		X	X
BATTERI			
Rogna: <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>		X	X
NEMATODI			
<i>Meloidogyne incognita</i>		X	X
<i>Meloidogyne javanica</i>		X	X
<i>Pratylenchus vulnus</i>		X	X
<i>Xiphinema diversicaudatum</i>		X	X

c) Controlli

I materiali di moltiplicazione in ogni fase devono essere sottoposti a controlli fitosanitari e di corrispondenza genetica. In riferimento al primo aspetto il DM 20/11/2006 ha sensibilmente migliorato le garanzie fitosanitarie del materiale certificato prodotto. Rispetto alla vecchia normativa, sono stati infatti previsti saggi di laboratorio con metodiche molecolari in grado di rilevare la presenza di agenti virali con maggiore sensibilità rispetto alle tecniche biologiche previste invece nel precedente decreto.

Se in vivaio sono solo previste ispezioni visive, per le fasi precedenti sono state definite tecniche e periodicità degli accertamenti fitosanitari (Tabb. 3-4).

Oltre alle analisi fitopatologiche (visive e molecolari) sul materiale vegetale, analisi micologiche (per *V. dahliae*) e nematologiche (per *X. diversicaudatum*, *M. incognita*, *M. javanica*, *P. vulnus*) devono essere effettuate sui terreni e sui substrati impiegati.

La certificazione di corrispondenza genetica è basata, invece, su osservazioni pomologiche ed agronomiche (almeno un ciclo di fruttificazione per le cultivar; due cicli vegetativi in vivaio per i portainnesti clonali). In alternativa può essere effettuata anche con il supporto di tecniche molecolari qualora la fonte primaria registrata sia stata corredata da idonea documentazione molecolare.

Tabella 3: Procedure per la verifica dello stato sanitario “virus-esente” e “virus-controllato” delle Fonti Primarie e delle piante madri portaseme (PMS) e portamarze (PMM) di categoria “Prebase” e “Base”

Malattia e/o Organismo nocivo	CONTROLLI				
	Osservazioni visive		Saggi di laboratorio		
	Epoca	Periodicità	Tipo di campione ed epoca	Tecnica	Periodicità
VIRUS					
ArMV CLRV SLRSV OLV-1 OLYaV OLV-2 CMV TNV	Primavera ed autunno	Annuale	Tessuto corticale prelevato da rami ben lignificati: in primavera o inizio autunno	RT- PCR o ibridazione molecolare	Sul 10% delle piante ogni anno a partire dal 5° anno
FITOPLASMI					
Fitoplasmi	Primavera	Annuale		Amplificazione genica mediante reazione a catena della polimerasi (PCR).	In casi dubbi
FUNGHI					
Tracheoverticillosi: <i>Verticillium dahliae</i>	Da aprile a settembre	Annuale	tessuti vascolari di porzioni di ramo di 1-2 anni di età.	isolamento	In casi dubbi
BATTERI					
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> (Rogna)	Primavera ed autunno	Annuale			

Tabella 4: Procedure per la verifica dello stato sanitario “Virus-esente” e “Virus-controllato” delle piante madri Portaseme (PMS) e Portamarze (PMM) di categoria “Certificato”

Malattia e/o Organismo nocivo	CONTROLLI				
	Osservazioni visive		Saggi di laboratorio		
	Epoca	Periodicità	Tipo di campione ed epoca	Tecnica	Periodicità
VIRUS					
ArMV CLRV SLRSV OLV-1 OLYaV OLV-2 CMV TNV	Primavera ed autunno	Annuale	Tessuto corticale <u>prelevato da rami ben lignificati</u> in primavera o inizio autunno	RT-PCR o ibridazione molecolare	A partire dal 5° anno su tutte le piante, nell'arco di 30 anni per le PMM, nell'arco di 40 anni sulle PMS
FITOPLASMI					
Fitoplasmii	Primavera	Annuale		Amplificazione genica mediante reazione a catena della polimerasi (PCR).	In casi dubbi
FUNGI					
Tracheoverticillosi: <i>Verticillium dahliae</i>	Da aprile a settembre	Annuale	Tessuti vascolari di porzioni di ramo di 1-2 anni di età.	Isolamento	In casi dubbi
BATTERI					
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> (Rogna)	Primavera ed autunno	Annuale			

d) Requisiti tecnici delle strutture impiegate per la produzione di materiali di propagazione certificati di olivo (art. 3 DM 20/11/2006)

La filiera produttiva del sistema di certificazione si svolge essenzialmente in tre diverse tipologie di strutture:

- ◆ le serre a rete a prova di insetto (generalmente identificate come screen-house- SH) utilizzate per la conservazione e moltiplicazione sia delle fonti primarie sia del materiale di Prebase;
- ◆ i campi di premoltiplicazione e moltiplicazione ove avviene l'allevamento, rispettivamente, delle piante di categoria Base e di categoria Certificato (campi di piante madri);
- ◆ i vivaai (in piena terra o in contenitore).

Per le caratteristiche tecniche delle SH e dei campi di Premoltiplicazione si rimanda agli allegati 2 e 3 del DM 20/11/2006. Mentre in questa sede si ritiene opportuno soffermarsi sulle caratteristiche tecniche che le strutture utilizzate dai vivaisti devono possedere: campi di piante madri e vivaai.

I campi di piante madri certificati portamarze (PMM) e portaseme (PMS) devono essere:

- ◆ realizzati su terreni che rispondano ai normali requisiti di idoneità agronomica e sanitaria, che non abbiano ospitato da almeno 3 anni altre specie arboree e che siano esenti dal nematode *X. diversicaudatum* e dal fungo *V. dahliae*;
- ◆ isolati dall'afflusso di acque superficiali;
- ◆ costituiti con file complete e distinte per accessione; qualora su una stessa fila venissero allevate accessioni diverse, è obbligatoria la loro separazione con interspazio doppio; della disposizione delle piante deve essere prodotta apposita mappa;
- ◆ opportunamente isolati dai campi limitrofi con una fascia di bordo, tenuta libera da vegetazione, di almeno 10 metri; tale limite è elevato a 20 metri in presenza di piante arboree, o ridotto a 5 metri qualora venga accertata, dal Servizio fitosanitario regionale l'assenza del nematode vettore (*X. diversicaudatum*) o qualora siano approntate apposite barriere di protezione (fossati, scoline, ecc.);
- ◆ le PMM e le PMS possono essere conservate, rispettivamente, al massimo per 30 e 40 anni dall'impianto;

Nel piano di conduzione agronomica dell'impianto bisogna attivamente contenere lo sviluppo di patogeni, parassiti e di piante infestanti attraverso un apposito programma di difesa. Qualunque intervento cesorio deve essere eseguito con attrezzi disinfettati con una soluzione al 10% di ipoclorito di sodio.

Vivaai:

i) Semenzai, Nestai e Piantonai in piena terra

- ◆ I terreni utilizzati per la realizzazione dei semenzai, nestai e piantonai devono essere esenti dai nematodi *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *Pratylenus vulnus*, *X. diversicaudatum* e dal fungo *V. dahliae*;
- ◆ l'area destinata all'allevamento delle piante di olivo certificate in piena terra (nestai e piantonai) e alla realizzazione dei semenzai deve avere una fascia di bordo, tenuta libera da vegetazione, di almeno 2 metri dai campi limitrofi ed essere isolata dall'afflusso delle acque superficiali e sub-superficiali;
- ◆ le piante devono essere suddivise in lotti omogenei, ben individuabili, destinati interamente ed esclusivamente all'allevamento delle piante di olivo; della disposizione delle piante deve esserne fatta comunicazione al Servizio fitosanitario regionale competente per territorio.

ii) Semenzai, Nestai e Piantonai fuori suolo

- ◆ I cassoni utilizzati per la semina, per l'ambientamento e per la radicazione e l'area destinata all'allevamento delle piante certificate fuori suolo devono essere isolati

dall'afflusso delle acque superficiali e sub-superficiali e non devono essere a diretto contatto con il suolo ma sollevati di almeno 10cm;

- ◆ prima dell'utilizzo il cassone deve essere trattato con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2%.
- ◆ il terriccio ed i substrati utilizzati per la realizzazione dei semenzai, per l'ambientamento, per la radicazione e per l'allevamento devono essere esenti dai nematodi *M. incognita*, *M. javanica*, *P. vulnus*, *X. diversicaudatum* e dal fungo *V. dahliae*;
- ◆ l'area destinata all'allevamento delle piante di olivo certificate fuori suolo deve contemplare una fascia di bordo tenuta libera da vegetazione di almeno 2 metri;
- ◆ per l'isolamento dei contenitori dal terreno deve essere utilizzato un vespaio di brecciolino di almeno 10 cm oppure di 5 cm qualora si utilizzino teli pacciamanti. Qualora la pavimentazione consiste di un battuto di cemento o altro materiale, i contenitori devono essere collocati su supporti dell'altezza di almeno 20 cm dal piano di calpestio. Nel caso i contenitori siano poggiati sul terreno, questo deve essere esente dai nematodi *M. incognita*, *M. javanica*, *Pratylenus vulnus*, *X. diversicaudatum* e dal fungo *V. dahliae*;

Indipendentemente dalla tecnica di allevamento, le piante in vivaio devono essere suddivise in lotti omogenei, ben individuabili, destinati interamente ed esclusivamente all'allevamento delle piante di olivo; la disposizione delle piante deve essere comunicata al Servizio fitosanitario regionale competente per territorio. Anche in vivaio qualsiasi intervento cesorio deve essere eseguito con attrezzi disinfettati con una soluzione al 10% di ipoclorito di sodio.

Il rispetto di questi requisiti è garanzia del mantenimento dello stato sanitario del materiale. L'idoneità delle strutture (SH, campi e vivai) è valutata dal Comitato nazionale per la certificazione (CNC), nel caso dei centri di Conservazione per la premoltiplicazione e premoltiplicazione, e dal Servizio Fitosanitario Regionale competente per territorio nel caso dei Centri di Moltiplicazione e vivai.

E' inoltre opportuno evidenziare che, in caso di carenza di materiali possono essere utilizzate tecniche di moltiplicazione rapide quali l'attivazione di sezioni incrementali o la propagazione *in vitro* (allegati 3, 4 e 5 del DM 20/11/2006).

4.1.3 Produzioni vivaistiche di categoria CAC: requisiti e punti critici

Il DM 14/04/1997, recependo le Direttive CEE, ha introdotto per la produzione e commercializzazione dei materiali di propagazione la categoria CAC (*Conformitas Agraria Communitatis*), sancendo il dovere dei vivaisti di produrre e commercializzare solo materiale di propagazione di cui ne sia garantito lo stato sanitario minimo e la corrispondenza varietale ed il diritto-dovere degli agricoltori ad utilizzare materiale CAC o di categoria superiore. Il DM 14/04/1997 pur definendo gli aspetti legislativi fondamentali presenta dei limiti alla piena applicabilità a causa della mancanza di norme tecniche di attuazione, rendendo difficoltosa la sua stessa corretta applicazione e lasciando molti spazi ad interpretazioni non univoche che non hanno portato di certo al raggiungimento di produzioni vivaistiche con standard comuni, obiettivo prioritario che invece la normativa si proponeva di conseguire che definiscano in modo univoco i punti critici del processo produttivo vivaistico.

Un importante contributo a tal fine è stato dato da un'iniziativa multiregionale svolta nell'ambito del Programma Operativo Multiregionale (POM) Misura 2 "Innovazioni tecnologiche e trasferimento dei risultati della ricerca". L'iniziativa sviluppata attraverso il progetto di ricerca POM A32 intitolato "Validazione e trasferimento alla pratica agricola di norme tecniche per l'accertamento dello stato sanitario di specie ortofrutticole per patogeni pregiudizievoli alla qualità delle produzioni vivaistiche", si è conclusa con la predisposizione di una proposta di emendamenti ed estensioni al DM 14/04/1997, sottoposta alle autorità competenti.

Di seguito si riporta il protocollo per la produzione di materiali di propagazione di olivo di categoria CAC. Oltre alle prescrizioni previste dal DM 14/04/1997 i diversi punti sono integrati con le proposte di emendamento scaturite dal sopramenzionato Progetto POM A32.

OBBLIGHI DEL VIVAISTA

- **Richiedere l'iscrizione al Registro Ufficiale dei Produttori**
- **Consentire il controllo del vivaio da parte del Servizio Fitosanitario Regionale**
- **Tenere in azienda il Registro di Carico e Scarico dei vegetali aggiornato**
- **Compilare i Passaporti in uscita in ogni loro parte**
- **Conservare i Passaporti in entrata per almeno un anno**
- **Conservare in azienda una mappa aggiornata sulla distribuzione delle varie specie all'interno del vivaio**
- **Informare il Servizio Fitosanitario Regionale sulla insorgenza di eventuali situazioni anomale**
- **Controllare le produzioni dal punto di vista sanitario secondo le indicazioni del Servizio Fitosanitario Regionale**

In pratica le produzioni vivaistiche devono essere prodotte e commercializzate da fornitori accreditati (vivaisti), essere in possesso di requisiti fitosanitari minimi e di adeguate caratteristiche biometriche e deve essere garantita la loro identità varietale. Il possesso di questi requisiti viene raggiunto attraverso l'individuazione e il rispetto, da parte del vivaista, di "punti critici" nel processo produttivo. Nel caso in cui si rendano necessari eventuali controlli, il vivaista dovrà rivolgersi a laboratori autorizzati, accreditati dal Servizio fitosanitario. L'accreditamento avviene solo se il laboratorio è in possesso di determinate competenze, professionali e strutturali, che devono essere opportunamente documentate. Il materiale può essere commercializzato solo se accompagnato dal "documento di commercializzazione", consistente in un'autocertificazione rilasciata dal fornitore, che attesta le caratteristiche sanitarie, genetiche e qualitative del materiale di

propagazione e da cui risulta, quindi, che il materiale è stato ottenuto nel rispetto di quanto previsto dalla normativa.

Punti critici della filiera vivaistica

1. MATERIALI DI MOLTIPLICAZIONE INIZIALE

- *Approvvigionamento presso terzi*
- *Autoproduzione*

2. CARATTERISTICHE DELLE PIANTE MADRI (FONTI INIZIALI O DI APPROVVIGGIAMENTO) E DEI MATERIALI PRODOTTI

- *Requisiti di identità varietale*
- *Stato sanitario*
- *Età e durata degli impianti*

3. CAMPI DI PIANTE MADRI, STRUTTURE E ATTREZZATURE

- *Caratteristiche tecniche dei campi delle piante madri*
- *Caratteristiche dei semenzai e dei vivai in vivaio e in pieno campo*
- *Caratteristiche dei contenitori, degli attrezzi e delle acque di irrigazione*

4. CONTROLLI SANITARI

- *Terreno e Substrati colturali*
- *Fonti di approvvigionamento*
- *Vivaio*

1. MATERIALI DI MOLTIPLICAZIONE INIZIALE

I materiali di moltiplicazione iniziale possono provenire da autoproduzione o da approvvigionamento presso terzi.

Approvvigionamento presso terzi

I materiali di moltiplicazione devono essere acquistati solo da fornitori accreditati.

Autoproduzione

I materiali di moltiplicazione devono provenire da piante madri (fonti di approvvigionamento o iniziali) ubicate in appositi campi, ben identificate e sottoposte a regolari controlli, atti a garantire l'identità varietale e lo stato sanitario

2. CARATTERISTICHE DELLE PIANTE MADRI (FONTI INIZIALI O DI APPROVVIGGIAMENTO) E DEI MATERIALI PRODOTTI

Requisiti di identità varietale

Il materiale di moltiplicazione deve essere commercializzato con l'indicazione della varietà cui appartiene. Le varietà cui viene fatto riferimento possono essere:

Varietà brevettate	devono possedere i requisiti indicati per la varietà nella documentazione allegata al brevetto
Varietà diffuse a livello nazionale	devono possedere i requisiti della varietà descritti nel Registro nazionale di cui all'art. 5 del DPR n. 697 del 1996
Varietà a diffusione locale	iscritte in un apposito elenco tenuto dal fornitore e nel quale ogni varietà deve essere descritta conformemente a quanto indicato nell'allegato III del DM del 14/4/1997

Stato sanitario dei materiali di moltiplicazione

Le fonti di approvvigionamento e i materiali di propagazione prodotti devono risultare esenti dagli organismi pregiudizievoli la qualità dei materiali di moltiplicazione (Tab. 5). L'esenza deve essere accertata con osservazioni visive e saggi di laboratorio come riportato nella tabella 8.

Tabella 5: Malattie ed organismi pregiudizievoli la qualità previsti dall'allegato II del DM 14/04/1997 e proposta del progetto POM A32

ALLEGATO II DM 14/04/1997	PROPOSTA PROGETTO POM A32
FUNGHI	
<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
BATTERI	
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Rogna
VIRUS ED ORGANISMI PATOGENI VIRUS-SIMILI	
Tutti	SLRSV (Virus della maculatura latente della fragola) ArMV (Virus del mosaico dell' <i>Arabis</i>) CLR (Virus dell'accartocciamento fogliare del ciliegio) OLYaV, Virus associato al giallume fogliare dell'olivo)
NEMATODI	
<i>Meloidogyne</i> spp	<i>Meloidogyne javanica</i> <i>M.incognita</i>
	<i>Pratylenchus vulnus</i>
	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>

Età e durata dell'impianto

Il materiale di propagazione (marze) potrà essere prelevato dai campi delle fonti di approvvigionamento a partire dal 3° anno dall'impianto. Da tali piante il materiale potrà essere prelevato per un massimo di 30 anni.

3. CAMPI DI PIANTE MADRI, STRUTTURE E ATTREZZATURE

Caratteristiche tecniche dei campi di piante madri dei materiali di moltiplicazione iniziali

L'impianto deve essere realizzato su terreni che rispondano ai normali requisiti di idoneità agronomica, laddove necessario dotati di un sistema drenante che eviti il ristagno idrico superficiale e/o sotterraneo ed isolato dall'afflusso di acque superficiali. I terreni non devono aver ospitato colture suscettibili a *V. dahliae* (solanacee, carciofo, ecc.) da almeno 10 anni e gli appezzamenti nei quali sono stati osservati sulle colture precedenti attacchi da parte dello stesso patogeno devono essere scartati a priori. Prima dell'impianto il terreno deve essere sottoposto ad analisi nematologica per l'assenza del nematode vettore di virus *X. diversicaudatum* e da *V. dahliae*. Il campo deve contemplare una fascia di bordo costantemente lavorata e di almeno 10 metri, da campi coltivati a colture arboree o da specie ortofrutticole ospiti degli patogeni riportati in Tabella 5.

Caratteristiche tecniche dei semenzai e dei vivai

Semenzai e vivai in pieno campo: Il terreno dei campi utilizzati per realizzare i semenzai e/o i vivai in pieno campo deve rispondere ai normali requisiti di idoneità agronomica, laddove necessario dotati di un sistema drenante che eviti il ristagno idrico superficiale e/o sotterraneo ed isolato dall'afflusso di acque superficiali. I terreni non devono aver ospitato colture suscettibili a *V. dahliae* (solanacee, carciofo, ecc.) da almeno 10 anni e gli appezzamenti nei quali sono stati osservati sulle colture precedenti attacchi di *V. dahliae* devono essere scartati a priori. Prima dell'impianto il terreno deve essere sottoposto ad analisi nematologica per l'assenza dai nematodi galligeni: *M. javanica*, *M. incognita* e *P. vulnus* e dal fungo *V. dahliae*. Il campo deve contemplare una fascia di bordo costantemente lavorata e di almeno 10 metri da specie ospiti dei patogeni riportati in Tabella 1 o 3 metri da altre specie.

Semenzaio in cassoni e Vivaio in contenitori: I cassoni o i contenitori interrati, devono essere isolati dall'afflusso delle acque superficiali e subsuperficiali. Nel caso di semenzai in cassone fuori terra, questo non deve essere a diretto contatto con il suolo e possibilmente sollevati, così come i contenitori (fitocelle, vasi, etc.) in cui sono allevate le piantine devono essere poggiati su materiale che assicuri l'isolamento dal suolo (ad es., brecciolino di almeno 10 cm di spessore).

Il **substrato colturale** utilizzato nei cassoni per i semenzai o nei contenitori per l'allevamento delle piante in vivaio non deve essere riciclato o, nel caso di terriccio rigenerato, deve essere sterilizzato. Prima dell'uso il substrato deve essere sottoposto ad analisi nematologica per l'assenza dai nematodi del *M. javanica*, *M. incognita* e *P. vulnus* e micologica per l'assenza dal fungo *V. dahliae*. Le miscele di terriccio vanno preparate e conservate su piazzole di cemento preventivamente trattate con ipoclorito di sodio al 2%.

Inoltre i **fertilizzanti** devono essere conservati su supporti o in ambienti che escludano il contatto diretto con il suolo.

Caratteristiche dei contenitori, attrezzature ed acqua di irrigazione

I contenitori utilizzati devono essere nuovi o lavati con soluzioni sterilizzanti (immersione per 20-30 minuti in ipoclorito di sodio) e abbondantemente risciacquati, così come tutte le attrezzature (attrezzi da taglio, indumenti, ecc.). **L'acqua** da impiegare deve essere di idonea qualità, controllata o trattata in modo da escludere ogni possibilità di contaminazione da parte di organismi nocivi.

4. CONTROLLI SANITARI

I controlli consistono in:

- **analisi nematologica e micologica** per il terreno e per i substrati colturali. La modalità di campionamento e il tipo di saggio da adottare sono indicate in tabella 6;
- **rilievi visivi e saggi di laboratorio** per quanto riguarda le piante madri e solo rilievi visivi sul materiale presente in vivaio. L'epoca per i controlli visivi, la periodicità e le tecniche per gli accertamenti di laboratorio, per ciascun gruppo di patogeni, sono riportati nelle tabelle 7 e 8. Inoltre, oltre a tali controlli sanitari, per la prevenzione dalla "Rogna", devono essere effettuati trattamenti con prodotti rameici ogni qualvolta si verificano eventi biotici e abiotici causa di ferite e prima di ogni prelievo di materiale di propagazione.

Tabella 6: Controlli sanitari sul terreno dei campi delle fonti di approvvigionamento e dei vivai e sul substrato colturale per la produzione di materiale di propagazione di categoria C.A.C.

Malattie e/o patogeno	Campionamento				Accertamenti sanitari	
	Campione	Epoca	Modalità di conservazione	Tecnica	Periodicità	
Funghi <i>Verticillium dahliae</i>	N°/Ha			Isolamento su terreni di coltura selettivi	Terreno: All'impianto (*)	
	natura					
Nematodi <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. incognita</i> <i>Pratylenchus vulnus</i> <i>Xiphinema diversicaudatum</i>	Terreno: 5 campioni costituiti ciascuno da 10 subcampioni, per un peso complessivo di 1Kg. Substrati colturali: un campione, costituito da 10 subcampioni, ogni 5 m ³ di terriccio.		I campioni raccolti in sacchetti di carta devono essere analizzati nell'arco di 4-7 giorni.	Estrazione mediante setacci di Cobb e/o mediante centrifugazione	Substrati colturali: Prima dell'uso, ogni qualvolta si prepari una nuova miscela a partire da componenti non sterili per i substrati	
		terreno				Intero anno
		Terreno e radici				Estrazione mediante centrifugazione a bassa velocità

(*) prima di qualsiasi lavorazione profonda

Tabella 7: Controlli sanitari da eseguire in vivaio

Malattie e/o patogeno	Controlli sanitari			Periodicità
	Rilievi visivi			
	Organo	Sintomo	Epoca	
Virus: ARMV, CLRV, SLRSV, OLYaV	Vegetazione	Ingiallimenti disseccamenti, tubercoli sulla parte aerea e di galle sulle radici	Durante la primavera ed in autunno-inverno	Annuale
Funghi: <i>Verticillium dahliae</i>				
Batteri: <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>				
Nematodi: <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. incognita</i> <i>Pratilenicus vulnus</i>				

Tabella 8: Controlli sanitari da eseguire sulle fonti di approvvigionamento di categoria C.A.C

Malattie e/o patogeno	Rilievi visivi				Accertamenti sanitari				
	Periodicità				Campionamento		Saggio		
	organo	sintomo	epoca	Periodicità	organo	epoca	Tipo di campione	Organo/tessuto	tecnica
Virus SLRSV ArMV CLRV OLYAV*	Apparato fogliare e frutti	Ingiallimenti fogliari e malformazioni dei frutti	In primavera e all'invaistatura	Annuale	10-15 rametti per pianta da ciascuna delle branche principali secondo le usuali tecniche di campionamento	Marzo-giugno	10% delle piante ogni 3 anni	Tessuto corticale di rami lignificati	Amplificazioni geniche (PCR) e/o Ibridazioni molecolari
Funghi <i>Verticillium dahliae</i>	Chioma	Defogliazioni e disseccamenti dei germogli e/o rami	da aprile a settembre	Annuale	10-15 rametti per pianta da ciascuna delle branche principali secondo le usuali tecniche di campionamento	Marzo-giugno	10% delle piante ogni 3 anni	Tessuto xilematico	Isolamento su terreni di coltura selettivi, ELISA
Batteri <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i>	Chioma	Tubercoli	In primavera ed in autunno-inverno	Annuale	Non previsti				

* Il saggio di laboratorio per questo virus va fatto solo sulle piante madri portamarze non sulle piante madri portaseme

4.2 Programma di selezione clonale e sanitaria

Come ampiamente discusso nei precedenti paragrafi l'impiego di materiali di propagazione "sani", oltre ad essere una condizione indispensabile per produzioni olivicole di qualità, è anche un obbligo sancito dalle normative fitosanitarie. L'impiego di tali materiali per la realizzazione dei nuovi impianti è vincolato dalla disponibilità sul mercato di piante con stato sanitario conforme alle normative vigenti. La produzione di "fonti primarie" attraverso un programma di selezione sanitaria e la successiva moltiplicazione e distribuzione in un sistema di certificazione, è una delle vie perseguibili per il raggiungimento di tale obiettivi.

La selezione, parte integrante della "certificazione", è un'attività interdisciplinare per la quale sono indispensabili sia competenze fitopatologiche sia pomologiche che tecnologiche, e si realizza con la costituzione di "Fonti Primarie" (ossia dei materiali iniziali) e la loro successiva moltiplicazione all'interno di un sistema di certificazione con l'obiettivo di produrre materiali iniziali con stato sanitario virus-controllato (VT) e virus-esente (VF), fruibili dai vivaisti e quindi, dagli agricoltori. Se fino a qualche anno addietro in mancanza di efficienti supporti diagnostici, la selezione, per quanto accurata, non garantiva livelli di sanità tranquillizzanti, oggi, in virtù delle nuove acquisizioni, essa rappresenta un valido strumento nel miglioramento sanitario della specie.

Tali programmi di selezione clonale e sanitaria, oltre a garantire un miglioramento genetico e sanitario delle varietà locali o di interesse nazionale/internazionale, rappresentano un importante strumento per la salvaguardia e il recupero del germoplasma autoctono olivicolo.

4.2.1 Fasi della selezione

Nella definizione dei parametri e dei criteri di selezione, aspetto fondamentale è la individuazione dei patogeni e/o delle malattie da includere nelle attività di selezione sanitaria per la produzione di Fonti Primarie con stato sanitario VT e VF.

Per ciascuna specie la scelta delle varietà da inserire a certificazione dipende principalmente dai seguenti fattori: a) importanza economica e diffusione della varietà; b) stato sanitario; c) richiesta del mercato; d) necessità di valorizzare varietà autoctone, ecc.

Valutata la necessità di avviare un programma di miglioramento sanitario per una determinata varietà, si passa all'individuazione delle aree tipiche di coltivazione e, con il supporto di operatori del luogo, all'identificazione degli impianti più rappresentativi. Nella scelta dei singoli impianti bisogna considerare: età, stato sanitario, produttività, tecniche di coltivazione e sesto d'impianto, ecc.

In ciascun impianto si procede ad una prima selezione delle piante, su base visiva, tenendo conto dell'aspetto generale, dell'assenza di sintomatologie ascrivibili a patogeni sistemici e delle caratteristiche produttive. Le piante selezionate (accessioni o candidati cloni) su base visiva attraverso ripetuti rilievi di campo, vengono moltiplicate ed allevate in appositi campi di conservazione, ove il materiale viene sottoposto agli accertamenti sanitari di laboratorio, impiegando metodiche diverse a seconda dei patogeni, della specie e di quanto previsto dai protocolli tecnici di certificazione.

Le accessioni ed i candidati cloni risultati esenti dagli organismi per cui sono stati effettuati gli accertamenti sanitari vengono utilizzati per la costituzione delle Fonti Primarie, queste piante devono essere conservate in serre a prova d'insetto (screen house) ed allevate in condizioni che riducano al minimo i rischi di nuove infezioni (utilizzare substrati sterili, impiegare utensili da taglio disinfettati, ecc.).

Invece le accessioni e i candidati cloni risultati infetti possono essere recuperati mediante il risanamento (termoterapia, coltura *in vitro* di apici meristemati, microinnesto, ecc.).

Le predette fasi sono di seguito sintetizzate:

1^a Fase

Selezione di campo

(Scelta degli impianti commerciali e rilievi visivi)

Per l'olivo la selezione deve, laddove possibile, interessare impianti di almeno 25 anni, i rilievi visivi in campo devono essere effettuati in primavera ed in autunno per rogna e verticilliosi, in estate per verticilliosi, al fine di escludere dalla selezione, le piante potenzialmente infette.

I criteri di selezione secondo i quali si procede all'individuazione delle piante, possono variare in relazione all'obiettivo stesso della selezione, ma generalmente fanno riferimento a:

- Produttività
- Caratteristiche del frutto (epoca di maturazione, dimensione, rapporto polpa/nocciolo, resistenza all'attacco della mosca delle olive, ecc.)
- Resa in olio (per le cultivar da olio)
- Vigore
- Assenza di sintomi ascrivibili ad agenti patogeni virali, fitoplasmali, fungini e batterici

2^a Fase

Accertamenti sanitari

A causa della diffusa asintomaticità delle infezioni causate dagli agenti virali (contemplati nelle normative) le piante, selezionate in base all'assenza di sintomatologie ascrivibili ad infezioni da *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*, devono essere singolarmente saggiate in laboratorio per accertare l'assenza, anche in forma latente, degli agenti virali e fitoplasmali contemplati dalle normative fitosanitarie. Per poter eseguire i saggi di laboratorio le piante precedentemente identificate vengono sottoposte a campionamento, prelevando, lungo tutta la chioma, 6-8 rametti di almeno un anno ben lignificati da utilizzare per le indagini di laboratorio (vedasi capitolo 2).

Gli ecotipi e/o i candidati cloni che risultano esenti dalle infezioni virali possono essere eventualmente conservati in specifici campi (campi di conservazione dei candidati cloni) con le seguenti caratteristiche tecniche:

- L'impianto deve avvenire su terreni che rispondano ai normali requisiti di idoneità agronomica.
- L'impianto deve essere posto a distanze opportune da altri impianti commerciali (fascia di bordo 10mt) e da qualsiasi potenziale ospite di virus a cui la specie è suscettibile.
- I campi devono essere isolati dall'afflusso di acque superficiali.
- Ogni pianta deve essere conservata in numero minimo di tre esemplari.
- Le piante devono essere costantemente protette da attacchi parassitari
- L'impianto deve essere realizzato su terreno esente dal fungo *Verticillium dahliae* e dal nematode *Xiphinema diversicaudatum*.

3^a Fase

Risanamento

Qualora necessario gli ecotipi risultati infetti possono essere sottoposti a trattamenti di risanamento. Il risanamento si basa sull'utilizzo di tecniche utilizzate da sole o in combinazione tra loro a cui viene sottoposto il materiale per essere liberato *in toto* o parzialmente dagli agenti infettivi. Le tecniche utilizzate e i protocolli messi a punto fino ad oggi per l'olivo sono la termoterapia e la coltura *in vitro* di apici meristemati. La termoterapia, ossia l'impiego di calore (aria calda) per tempi variabili, può essere utilizzata su materiale infetto *in vivo* o *in vitro* e, a seconda delle infezioni virali, può essere utilizzata in combinazione con la coltura di apici

meristematici. Quest'ultima consiste in una coltura asettica di un tessuto meristematico prelevato da gemme apicali o ascellari che, posto su un idoneo substrato di coltura, si accresce ed origina una pianta probabilmente esente da virus o altri agenti (vedasi capitolo 3).

4^a Fase

Costituzione e conservazione della “Fonte Primaria”

Il materiale sanitariamente migliorato (selezionato e/o prodotto attraverso risanamento), che risulta rispondente ai requisiti fitosanitari previsti dalle normative, viene mantenuto, allevato e moltiplicato in condizioni di sanità (in serre a rete a prova di insetto) e può essere registrato ed utilizzato nel sistema di certificazione ai sensi dei DD.MM. 4/5/06 e 20/11/06.

Per “fonte primaria”, così come riportato nel glossario del decreto ministeriale in vigore (D.M. 4/5/06) deve intendersi: “pianta capostipite ottenuta mediante selezione clonale e sanitaria sottoposta a controlli fitosanitari per l'esenzione da virus ed agenti virus simili previsti per la specie e sottoposta a controlli per la corrispondenza varietale e clonale e conservata in serre a rete a prova d'insetto.”

La “fonte primaria”, derivante dalla pianta capostipite di ciascun ecotipo selezionato, può essere ottenuta, a seconda che si tratti di portinnesti o varietà, attraverso moltiplicazione per seme, propagazione *in vitro*, autoradicazione od innesto su portinnesti con il medesimo stato sanitario. La fonte primaria, in numero di due esemplari, deve essere conservata, a cura del costituente in serre a rete a prova di insetto, allevata in contenitori di apposito volume, contenenti substrato esente da *V. dahliae*.

La **registrazione**, ossia il riconoscimento delle fonti primarie da parte dell'Organo Certificante, deve avvenire sulla base della documentazione predisposta dal costituente (in cui sono riportati tutti i dati anagrafici, l'iter degli accertamenti sanitari e di corrispondenza varietale cui la Fonte Primaria è stata sottoposta). L'accesso al sistema di certificazione delle fonti primarie avviene mediante la messa a disposizione da parte del costituente di piante derivanti dalla prima moltiplicazione delle stesse.

5^a Fase

Utilizzazione della Fonte primaria

Affinché il comparto olivicolo possa beneficiare delle potenzialità offerte dal lavoro di selezione sanitaria è indispensabile che a valle vi sia un efficiente ed organizzato sistema di certificazione che permetta l'utilizzazione delle Fonti Primarie da parte degli agricoltori, attraverso una adeguata e competente filiera vivaistica che provveda alla moltiplicazione e alla distribuzione dei materiali di propagazione garantendo il mantenimento dello stato sanitario iniziale.

Finito di stampare nel mese di giugno 2011

TEMATICA II

MANUALE PER LA DIAGNOSI FITOPATOLOGICA E PER IL RISANAMENTO DA VIRUS DELL'OLIVO



ISBN 978-88-88793-92-4



9 788888 793924