Title: METABOLOMIC PROFILING OF OLIVE LEAVES FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL AREAS TO EXPLORE METABOLIC VARIABILITY RELATED TO *XYLELLA FASTIDIOSA*

Authors: Alessia Staropoli[(1)], Giuseppina Iacomino[(1)], Daria Lotito[(1)], Annalisa Iuliano[(2)], Elena Santilli[(2)*],Francesco Vinale[(1)]

Affiliations: [(1)]Department of Veterinary Medicine and Animal Productions, University of Naples Federico II, 80138 Naples, Italy; [(2)]Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Olive, Fruit and Citrus Crops, 87036 Rende, Italy. * Presenting author email: elena.santilli@crea.gov.it

Xylella fastidiosa subsp. *pauca* is a major threat to Mediterranean olive cultivation, causing severe economic and ecological effects. Understanding the biochemical responses of olive trees to environmental conditions and pathogen pressure is essential to identify metabolic markers associated with plant resilience and to support breeding strategies aimed at improving tolerance. In this study, a metabolomic approach was applied to characterize the chemical profiles of olive leaves collected from different geographic areas within the framework of the NOVIXGEN project. \Sampling campaigns were carried out in 2024 and 2025 at several experimental sites. Leaf tissues were subjected to complementary analytical platforms, including gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-MS QTOF), allowing a broad coverage of primary and secondary metabolites. Metabolites were identified through spectral library matching (NIST) and comparison of accurate monoisotopic masses with plant metabolite databases. Multivariate statistical analyses, including principal component analysis (PCA) and partial least squares–discriminant analysis (PLS-DA), were applied to investigate metabolic variability among samples. The results revealed clear clustering patterns associated with sampling areas, highlighting geographical influence on the olive metabolome. Specifically, certain sampling sites showed distinct metabolic signatures that were further analyzed, using Variable Importance in Projection (VIP) scores, together with univariate statistical analysis (VIP > 1, $p < 0.05$, fold change > 2), to identify the metabolites contributing the most to the sample discrimination observed. Several compounds, belonging to the classes of secoiridoids (i.e., oleuropein, ligstroside) flavonoids (i.e., luteolin), tyrosol derivatives (i.e., hydroxytyrosol, oleocanthal), were identified. These metabolites are known to play important roles in plant defense mechanisms and stress responses. Overall, this metabolomic investigation provides new insights into the biochemical variability of olive trees across different geographical areas. The identified metabolites highlight metabolic differences among samples and provide a basis for future studies aimed at elucidating plant–pathogen interactions and the metabolic responses of olive trees to *Xylella fastidiosa*.

PROFILAZIONE METABOLOMICA DI FOGLIE DI OLIVO PROVENIENTI DA DIVERSE AREE GEOGRAFICHE PER ESPLORARE LA VARIABILITÀ METABOLICA ASSOCIATA A *XYLELLA FASTIDIOSA*

Autori: Alessia Staropoli(1), Giuseppina Iacomino(1), Daria Lotito(1), Annalisa Iuliano(2), Elena Santilli(2)*, Francesco Vinale(1)

Affiliazioni:

(1) Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, 80138 Napoli, Italia;

(2) Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, 87036 Rende, Italia.
*Autore relatore: elena.santilli@crea.gov.it

Xylella fastidiosa subsp. *pauca* rappresenta una grave minaccia per l'olivicoltura mediterranea, causando importanti conseguenze economiche ed ecologiche. Comprendere le risposte biochimiche degli olivi alle condizioni ambientali e alla pressione del patogeno è essenziale per identificare marcatori metabolici associati alla resilienza delle piante e per supportare strategie di miglioramento genetico finalizzate ad aumentarne la tolleranza.
In questo studio è stato applicato un approccio metabolomico per caratterizzare i profili chimici delle foglie di olivo raccolte in diverse aree geografiche nell'ambito del progetto NOVIXGEN.
Le campagne di campionamento sono state condotte nel 2024 e nel 2025 presso diversi siti sperimentali. I tessuti fogliari sono stati analizzati mediante piattaforme analitiche complementari, tra cui la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) e la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa quadrupolo-tempo di volo (LC-MS QTOF), consentendo un'ampia copertura di metaboliti primari e secondari.
L'identificazione dei metaboliti è stata effettuata mediante confronto degli spettri con librerie di riferimento (NIST) e confronto delle masse monoisotopiche accurate con database dedicati ai metaboliti vegetali. Per investigare la variabilità metabolica tra i campioni sono state applicate analisi statistiche multivariate, tra cui l'analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi discriminante mediante minimi quadrati parziali (PLS-DA).
I risultati hanno evidenziato chiari raggruppamenti dei campioni in funzione dell'area di provenienza, mettendo in luce l'influenza geografica sul metaboloma dell'olivo. In particolare, alcuni siti di campionamento hanno mostrato firme metaboliche distintive che sono state ulteriormente investigate mediante i punteggi di Importanza della Variabile nella Proiezione (VIP), insieme ad analisi statistiche univariate (VIP > 1, $p < 0,05$, fold change > 2), al fine di identificare i metaboliti che contribuiscono maggiormente alla discriminazione tra i campioni osservata.
Sono stati identificati diversi composti appartenenti alle classi dei secoiridoidi (ad esempio oleuropeina e ligstroside), dei flavonoidi (ad esempio luteolina) e dei derivati del tirosolo (ad esempio idrossitirosolo e oleocantale). Questi metaboliti sono noti per svolgere ruoli importanti nei meccanismi di difesa delle piante e nelle risposte agli stress.
Nel complesso, questa indagine metabolomica fornisce nuove conoscenze sulla variabilità biochimica degli olivi provenienti da diverse aree geografiche. I metaboliti identificati evidenziano differenze metaboliche tra i campioni e costituiscono una base per futuri studi volti a chiarire le interazioni pianta-patogeno e le risposte metaboliche degli olivi a *Xylella fastidiosa*.

Studio delle foglie di olivo per capire la resistenza a *Xylella fastidiosa*

Autori: Alessia Staropoli, Giuseppina Iacomino, Daria Lotito, Annalisa Iuliano, Elena Santilli, Francesco Vinale

La batteriosi causata da *Xylella fastidiosa* è una delle principali minacce per gli ulivi del Mediterraneo. Questo batterio può far ammalare gli alberi e provocare gravi danni all'agricoltura e all'ambiente.

Per capire meglio come gli ulivi reagiscono alla malattia e alle diverse condizioni ambientali, i ricercatori hanno studiato le sostanze chimiche presenti nelle foglie di olivo provenienti da diverse zone geografiche italiane.

Le foglie sono state raccolte tra il 2024 e il 2025 in vari campi sperimentali. In laboratorio sono state analizzate con strumenti molto avanzati che permettono di identificare centinaia di sostanze presenti nelle piante.

Successivamente, i dati ottenuti sono stati elaborati con metodi statistici per confrontare i campioni e capire se gli ulivi provenienti da zone diverse presentassero caratteristiche chimiche differenti.

I risultati hanno mostrato che le foglie raccolte in aree diverse possiedono composizioni chimiche differenti. Alcuni luoghi hanno infatti mostrato una sorta di "impronta chimica" caratteristica.

Tra le sostanze più importanti trovate ci sono l'oleuropeina, il ligstroside, la luteolina, l'idrossitirosolo e l'oleocantale. Questi composti aiutano la pianta a difendersi dagli stress ambientali e dagli attacchi di microrganismi dannosi.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che gli ulivi di diverse aree geografiche presentano differenze nelle sostanze prodotte dalle loro foglie. Queste informazioni potranno essere utili in futuro per capire meglio come gli ulivi reagiscono a *Xylella fastidiosa* e per selezionare varietà più resistenti alla malattia.