Title: A TARGET GENE PANEL FOR SCREENING OF TOLERANT/RESISTANT OLIVE GENOTYPES TO *XYLELLA FASTIDIOSA*

Authors: Carbone F. [(1)], Forgione I. [(1)], Iaria D. L. [(1)], Salimonti A. [(1)]

Affiliations: [(1)] Research centre for Olive, Fruit and Citrus Crops, Council for Agricultural Research and Economics (CREA) - Rende (CS)

The symptoms caused by the quarantine bacterium *Xylella fastidiosa* on olive trees have been widely documented in recent years; however, the molecular mechanisms underlying the plant response to the pathogen remain poorly understood.
An extremely important objective that can be pursued by expanding ongoing research is the intensification of varietal screening, extending it to as many olive tree accessions as possible.
At the same time, actions aimed at safeguard cultivars at risk of extinction, currently confined to very limited areas, could also be undertaken.
To develop a target gene panel for screening of olive genotypes tolerant or resistant to *Xylella fastidiosa,* a search for candidate genes was performed through a meta-analysis of publicly availably RNA-seq libraries. The sequences were processed using RNA-seq pipeline including alignment to the 'Leccino' reference genome, gene expression quantification and differential expression analysis to identify genes regulated in response to the infection. Functional enrichment analysis (Gene Ontology, GO) was then performed to characterize the biological processes (BP), molecular functions (MF), and cellular components (CC) associated with the differential response of the cultivars. In particular, several BP-associated genes involved in responses to biotic and abiotic stresses, expecially drought stress, were found to be upregulated in *Xylella*-tolerant cultivars; modifications in membranes and cell walls of xylem vessels could favor a pathogen compartmentalization, likely creating a physical barrier that limits its spread.
On the other hand, BPs related to responses to other organisms and to the regulation of stimulus responses were found to be upregulated in cultivars susceptible to the bacterium. The availability of the reference genome assembly of the cultivar Leccino, for which both haplotypes are accessible, allowed the identification of alternative forms of the same target genes.
The ultimate goal is to develop a panel of genes potentially involved in the response to *Xylella*, to be used in a combined and scalable manner. This panel could represent a rapid, cost-effective, and easily accessible tool for the scientific community to phenotype olive genotypes and support varietal selection based on their different levels of tolerance to *Xylella fastidiosa*.

Work supported by Italian Ministry of Agriculture, Food Sovereignty and Forestry Project NOVIXGEN - D.M. 664890/2022

PANNELLO DI GENI TARGET PER LO SCREENING DI GENOTIPI DI OLIVO TOLLERANTI/RESISTENTI A *XYLELLA FASTIDIOSA*

Autori: F. Carbone[1], I. Forgione[1], D.L. Iaria[1], A. Salimonti[1]
Affiliazioni:
[1] Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), Rende (CS), Italia

I sintomi causati dal batterio da quarantena *Xylella fastidiosa* sugli alberi di olivo sono stati ampiamente documentati negli ultimi anni; tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano la risposta della pianta al patogeno rimangono ancora poco conosciuti.
Un obiettivo di grande rilevanza, perseguibile attraverso l'ampliamento delle attività di ricerca in corso, consiste nell'intensificare lo screening varietale, estendendolo al maggior numero possibile di accessioni di olivo. Parallelamente, potrebbero essere avviate azioni finalizzate alla salvaguardia di cultivar a rischio di estinzione, attualmente confinate in aree molto limitate.
Per sviluppare un pannello di geni target destinato allo screening di genotipi di olivo tolleranti o resistenti a *Xylella fastidiosa*, è stata condotta una ricerca di geni candidati mediante una meta-analisi di librerie RNA-seq disponibili pubblicamente. Le sequenze sono state elaborate attraverso una pipeline di analisi RNA-seq comprendente l'allineamento al genoma di riferimento della cultivar 'Leccino', la quantificazione dell'espressione genica e l'analisi dell'espressione differenziale, con l'obiettivo di identificare i geni regolati in risposta all'infezione.
Successivamente è stata eseguita un'analisi di arricchimento funzionale basata sulla Gene Ontology (GO), al fine di caratterizzare i processi biologici (BP), le funzioni molecolari (MF) e le componenti cellulari (CC) associati alla diversa risposta delle cultivar al patogeno.
In particolare, nelle cultivar tolleranti a *Xylella* sono stati individuati numerosi geni associati a processi biologici coinvolti nelle risposte a stress biotici e abiotici, soprattutto allo stress idrico, che risultano sovraespressi in seguito all'infezione. Le modificazioni delle membrane cellulari e delle pareti dei vasi xilematici potrebbero favorire la compartimentalizzazione del patogeno, creando una barriera fisica in grado di limitarne la diffusione all'interno della pianta.
Al contrario, nelle cultivar suscettibili al batterio sono risultati maggiormente attivati processi biologici correlati alla risposta ad altri organismi e alla regolazione delle risposte agli stimoli.
La disponibilità dell'assemblaggio del genoma di riferimento della cultivar 'Leccino', per il quale sono accessibili entrambi gli aplotipi, ha inoltre consentito l'identificazione di forme alleliche alternative degli stessi geni target.
L'obiettivo finale dello studio è la realizzazione di un pannello di geni potenzialmente coinvolti nella risposta a *Xylella fastidiosa*, utilizzabile in modo combinato e scalabile. Tale strumento potrebbe rappresentare una soluzione rapida, economicamente sostenibile e facilmente accessibile per la comunità scientifica, consentendo la fenotipizzazione dei genotipi di olivo e supportando la selezione varietale sulla base dei differenti livelli di tolleranza al batterio.

Un "test genetico" per capire quali ulivi resistono alla Xylella

Autori: F. Carbone, I. Forgione, D.L. Iaria, A. Salimonti
La **Xylella fastidiosa** è un batterio che attacca gli ulivi e provoca gravi danni, ma non tutte le varietà reagiscono allo stesso modo: alcune sono più resistenti, altre molto sensibili.
Gli scienziati stanno cercando di capire **quali geni** rendono alcune piante più tolleranti alla malattia.

Cosa hanno fatto i ricercatori

I ricercatori hanno studiato moltissimi dati genetici già disponibili, ottenuti da analisi di RNA (una molecola che indica quali geni sono "attivi").
Hanno confrontato:

- ulivi più resistenti alla Xylella
- ulivi più sensibili

Questo permette di vedere **quali geni si accendono o si spengono** quando la pianta viene infettata.

Come funziona l'analisi

Per capire tutto questo hanno usato strumenti informatici che:

- confrontano il DNA e l'RNA delle piante;
- misurano quali geni sono più attivi;
- individuano differenze tra varietà resistenti e non resistenti.

Poi hanno raggruppato i geni in categorie legate alle loro funzioni, ad esempio:

- difesa contro malattie;
- risposta allo stress;
- cambiamenti nelle cellule e nei vasi della pianta.

Cosa hanno scoperto

Negli ulivi più resistenti:

- si attivano geni legati alla difesa;
- la pianta reagisce meglio allo stress (come siccità o infezioni);
- possono cambiare le pareti dei vasi, creando una specie di "barriera" contro il batterio.

Negli ulivi più sensibili:

- la risposta è meno efficace;
- si attivano altri tipi di geni che non bloccano bene la malattia.

Un risultato importante

I ricercatori hanno creato un **pannello di geni "bersaglio"**, cioè un insieme di geni che possono essere usati come un test per capire rapidamente se un ulivo è più resistente o meno.

In conclusione

Questo studio serve a creare una specie di "mappa genetica" della resistenza alla Xylella, utile per:

- riconoscere gli ulivi più forti;
- aiutare la selezione di nuove varietà resistenti;
- rendere più veloce e semplice la ricerca.