

A. Graziani - Applicazioni molecolari per la diagnosi precoce di *Verticillium dahliae* nel suolo e in piante di olivo

Laureata: Anna Graziani

Titolo della tesi: Applicazioni molecolari per la diagnosi precoce di *Verticillium dahliae* nel suolo e in piante di olivo

Materia di tesi: Chimica del suolo

Riassunto:

L'olivo, specie fin dall'antichità legata alla storia e alla cultura della Toscana e dell'Italia, in condizioni ambientali avverse può essere colpito dalla tracheovorticilloso causata dal microrganismo fungino *Verticillium dahliae*. Tale malattia provoca l'occlusione dei vasi xilematici e i sintomi con cui si manifesta sono avvizzimento, disseccamento e perdita delle foglie, i quali, se ampiamente diffusi sulla chioma, possono compromettere l'attività fotosintetica e portare a morte la pianta.

Lo scopo di questa tesi è l'elaborazione di un metodo che, mediante tecniche molecolari, renda possibile rilevare la presenza del patogeno nel suolo, focolaio di infezione, e nella pianta, prima ancora che lo sviluppo del fungo sia tale da provocare sintomi evidenti.

La messa a punto del metodo durante questo lavoro di tesi, ha previsto l'infezione artificiale di suoli e di giovani olivi in vaso e successivamente il monitoraggio della sequenza fungina nel suolo, nella radice, nel colletto, nel fusto e nelle foglie, a intervalli progressivi nel tempo.

L'estrazione del DNA da suolo e dai tessuti vegetali è stato il primo "step" sperimentale. In seguito, i campioni sono stati amplificati con oligonucleotidi specifici in PCR Quantitativa (RealTime). La sensibilità di tale metodo è stata elevata; infatti, nel suolo delle piante infettate, è stato possibile rilevare fino a milionesimi di nanogrammo di sequenze di *V. dahliae*. Tali studi hanno permesso di seguire il movimento del patogeno sia all'interno dell'intera pianta, attraverso campionamenti a tempi di incubazione progressivi, sia lungo un ramo opportunamente infettato, con saggi a diverse distanze dal sito di inoculo.

All'analisi visiva, le piante fino a 35 giorni dall'infezione sono apparse sane e neanche sofferenti, ciononostante è stato possibile rivelare la sequenza patogena nel suolo e nel colletto delle piante infette.

A 185 giorni dall'inoculo le piante sono disseccate e la sequenza dell'agente fungino era notevolmente aumentata nel suolo rizosferico e nelle radici.

I risultati raggiunti in questa fase di elaborazione del sistema di quantificazione del *V. dahliae* sono stati incoraggianti, ma il protocollo applicato necessita di essere perfezionato.

Un metodo di diagnosi preventiva aiuterebbe a limitare interventi di natura chimica su coltivazioni già avviate: essi, infatti, oltre a non essere risolutivi, rischiano di alterare l'equilibrio naturale dell'oliveto come ecosistema.

Inoltre l'applicazione di tale procedura in sede vivaistica potrebbe essere molto importante, per produrre e garantire materiale di propagazione effettivamente sano, non infetto da *V. dahliae*.