

## Dislocazione dei nutrienti nel fenomeno di differenziazione florale e produttività in olivo

Fornaciari M., Ederli L., Reale L., Orlandi F. \*, Bonofiglio T., Pasqualini S. e Romano B.

Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia

### Location of nutrients in the phenomenon of flower differentiation and productivity in olive

**Abstract.** In olive (*Olea europaea* L.), the formation of functionally staminate flowers rather than fully functional hermaphrodites is one of the major factors limiting fruit set, as flowers with aborted pistils are incapable of producing fruit. Studies conducted on various angiosperm species have shown a correlation between flower abortion and starch content. Thus, it is important to know if starch content plays a role in regulating pistil development in olive and if so, what mechanism regulates starch distribution. Cyto-histological observations of staminate and hermaphrodite olive flowers show that pistil development in staminate flowers is interrupted after the differentiation of the megaspore mother cell. During the meiosis, starch grains were only detected in the ovary, style and stigma of the hermaphrodite flowers. No starch was observed in the pistils of the staminate flowers. This finding suggests a tight correlation between starch content and pistil development. The secondary origin of starch within the flower is indicated by low chlorophyll content in the gynoceium, undetectable Rubisco activity in the pistils of these two kinds of flowers and by the ultrastructure of the plastids observed by transmission electron microscope analysis. The plastids have few thylakoid membranes and grana and in the staminate flowers appeared very similar to proplastids. Considering differences in starch content between staminate and hermaphrodite flowers and the secondary origin of the starch, differences in pistil development in the staminate and hermaphrodite flowers could be related to differences in the sink strength of these two types of flowers.

**Key words:** *Olea europaea* L., staminate and hermaphrodite flowers, starch, invertase.

### Introduzione

La percentuale di abscissione dei fiori e frutti è influenzata dalle condizioni ambientali, dal bilancio ormonale, soprattutto dalla presenza di etilene e auxi-

na, e dalla disponibilità di nutrienti. Una carenza di nutrienti nelle infiorescenze può determinare l'abscissione del fiore in quanto anche se le strutture riproduttive possono essere parzialmente indipendenti dalla produzione di carboidrati, l'attività fotosintetica dei fiori di solito non è sufficiente a garantire lo sviluppo di fiori e frutti. Durante la differenziazione florale una percentuale significativa di energia deve essere quindi fornita da riserve immagazzinate nell'ovario. In olivo, l'abscissione florale è associata alla presenza di fiori staminiferi, caratterizzati da un androceo completamente differenziato e da un gineceo che può abortire durante diverse fasi del suo sviluppo. E' stato dimostrato che un alto rapporto tra foglie e fiori, oltre a concimazioni azotate, possano promuovere la formazione di fiori ermafroditi. Osservazioni su *Prunus armeniaca* L. suggeriscono che l'amido immagazzinato nell'ovario durante l'antesi è coinvolto nel suo sviluppo. A causa di questa correlazione tra l'amido e lo sviluppo del fiore, è di grande interesse studiare l'accumulo del pool di zuccheri durante il differenziamento florale, facendo particolare attenzione ad enzimi, come l'invertasi e la saccarosio sintasi, che sono considerati fra quelli più probabili nel limitare il flusso di carbonio negli ovari in via di sviluppo (Zinselmeier et al. 1999). A questo scopo, come approccio preliminare, abbiamo dosato l'attività delle invertasi nei due tipi di fiori. Le invertasi sono presenti in vari compartimenti cellulari; in questo studio sono state prese in considerazione quelle acide, cioè con attività massima a basso pH, in quanto presenti nell'apoplasto di molti organi sink dove creano il gradiente favorevole per il richiamo di nutrienti. Eventuali differenze nel metabolismo degli zuccheri nei fiori ermafroditi e staminiferi potrebbero aiutare a comprendere il meccanismo di regolazione dell'aborto dell'ovario in olivo e servire come base per futuri tentativi di aumentare l'efficienza di fecondazione e la conseguente produzione olivicola.

### Materiale e metodi

#### *Materiale vegetale e osservazioni cito-istologiche*

Sono stati utilizzati fiori e foglie, prelevati a partire da 6 settimane prima dell'antesi fino alla fioritura (Reale et al., 2009), da piante appartenenti alle culti-

\* fabor@unipg.it

var Leccino e Dolce Agogia situate in un oliveto sperimentale vicino a Spoleto (Umbria). Il materiale vegetale è stato quindi incluso in resina epossidica ed in paraffina e il contenuto in amido è stato evidenziato tramite la colorazione delle sezioni con soluzione iodo-iodurata.

#### *Estrazione e determinazione dell'attività della Rubisco*

Circa 0,1 g PF di foglie o di ovari sono stati polverizzati in mortaio con azoto liquido ed estratti con 2 mL di 100 mM tampone bicina (pH 7,8), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ditioneitrato (DTT), 1 mM acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2% (p/v) PVPP (polivinilpirrolidone) e 0,02% (p/v) di albumina sierica bovina (BSA). L'estratto è stato centrifugato a 13.000g per 2 min a 4°C ed il sovrantante era usato per la misura dell'attività dell'enzima Rubisco (Reale *et al.*, 2009).

#### *Estrazione e dosaggio delle clorofille*

Le foglie o gli ovari (0,1 g circa PF) sono stati polverizzati in mortaio con azoto liquido e le clorofille erano estratte con l'80% acetone. La quantificazione della clorofilla a e b è stata effettuata utilizzando le seguenti formule:

- Cl<sub>a</sub> (mg/l<sup>-1</sup>) = (12,7 x A663) - (2,69 x Abs 645)
- Cl<sub>b</sub> (mg/l<sup>-1</sup>) = (22,9 x Abs 645) - (4,68 x Abs 663).

#### *Estrazione e dosaggio delle invertasi acide solubili*

Campioni di fiori ermafroditi o staminiferi (0,1-0,2 g PF) sono stati polverizzati in mortaio con azoto liquido in presenza di un tampone d'estrazione così costituito: 50 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM DTT e 2% (p/v) PVPP. L'estratto era centrifugato a 14000g per 30 min ed il sovrantante recuperato ed utilizzato per la misura dell'attività in una miscela di reazione contenente 50 mM Na-citrato (pH 4,8) e 0,1 M saccarosio. Dopo incubazione a 37 °C per 30 min, la reazione veniva bloccata mediante bollitura per 1 min ed il glucosio rilasciato era quantificato usando un kit commerciale (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Reazioni controllo per ogni campione venivano effettuate in assenza di saccarosio. Le proteine totali sono state quantificate secondo il metodo di Bradford (1976), usando BSA come standard.

## **Risultati e discussione**

### *Osservazioni cito-istologiche*

*Inizio pre-meiosi.* All'inizio della differenziazione del fiore, prima della differenziazione dell'esotecio

all'interno dell'antera, già si rilevano grandi quantità di amido nelle cellule del peduncolo (fig. 1a). Granuli di amido sono stati osservati anche nella porzione basale del sepalo, in particolare nelle cellule epidermiche e in quelle parenchimatiche, e nel petalo (fig. 1b). In questa fase non sono stati osservati granuli di amido nell'antera né nel pistillo in sviluppo. Subito dopo la differenziazione delle cellule madri delle microspore, granuli di amido sono stati rilevati nell'esotecio (fig. 1c), formato da cellule con vacuoli di grandi dimensioni e una spessa cuticola lungo la parete esterna.

*Fine pre-meiosi.* Dopo la deposizione di callosio intorno alle cellule madri delle microspore granuli di amido sono stati rilevati in tutti gli strati della parete dell'antera (fig. 1d), del petalo e del sepalo. Nel pistillo dei fiori ermafroditi, alcuni granuli sono stati osservati nello stigma, nello stilo, nella parete dell'ovario e nell'ovulo (fig. 1e), mentre nel pistillo dei fiori staminiferi, non è stato rilevato amido (fig. 1f).

*Meiosi.* In questa fase, i granuli di amido erano sempre presenti nel peduncolo/ricettacolo, nel sepalo e nel petalo. Nelle antere, l'amido è stato osservato nell'esotecio, nell'endotecio e negli strati di transizione, ma non nel tappeto, nella diade o nella tetrade (fig. 1g). Nei fiori ermafroditi, l'amido è stato rilevato nello stilo, stigma, nella parete dell'ovario e nel tegumento dell'ovulo, ma non nella nucella (fig. 1h). Nessun granulo di amido è stato osservato nel pistillo di fiori staminiferi.

*Post-meiosi.* La distribuzione dell'amido è stata la stessa di quella osservata durante lo stadio meiotico. L'amido era presente anche in delle antere, dove la microsporogenesi si era interrotta e le cellule madri delle microspore si erano degenerate.

*Antesi.* Le osservazioni sull'antera in entrambi i tipi di fiori hanno mostrato un ispessimento della parete radiale delle cellule dell'endotecio e la degenerazione del protoplasto nelle cellule dell'esotecio e negli strati di transizione. I granuli pollinici bicellulari in fase di dispersione erano ricchi di amido, che non è stato rilevato nella parete dell'antera (fig. 1i). Nel pistillo dei fiori ermafroditi, granuli di amido erano evidenti nelle cellule dello stigma, nello stilo, nella parete dell'ovario e nel tegumento dell'ovulo, in particolare nella calaza e nelle porzioni micropilari dell'ovulo (fig. 1j). Nessun granulo di amido è stato osservato nella nucella, in questa fase molto ridotta. Nei fiori staminiferi, la distribuzione di amido negli stami era la stessa di quella osservata in fiori ermafroditi, ma non sono stati trovati granuli in nessuna porzione del pistillo (fig. 1k). Gli ovuli di fiori staminiferi non hanno differenziato sacchi embrionali. Amido è stato osservato nel petalo e nelle cellule del ricettacolo.

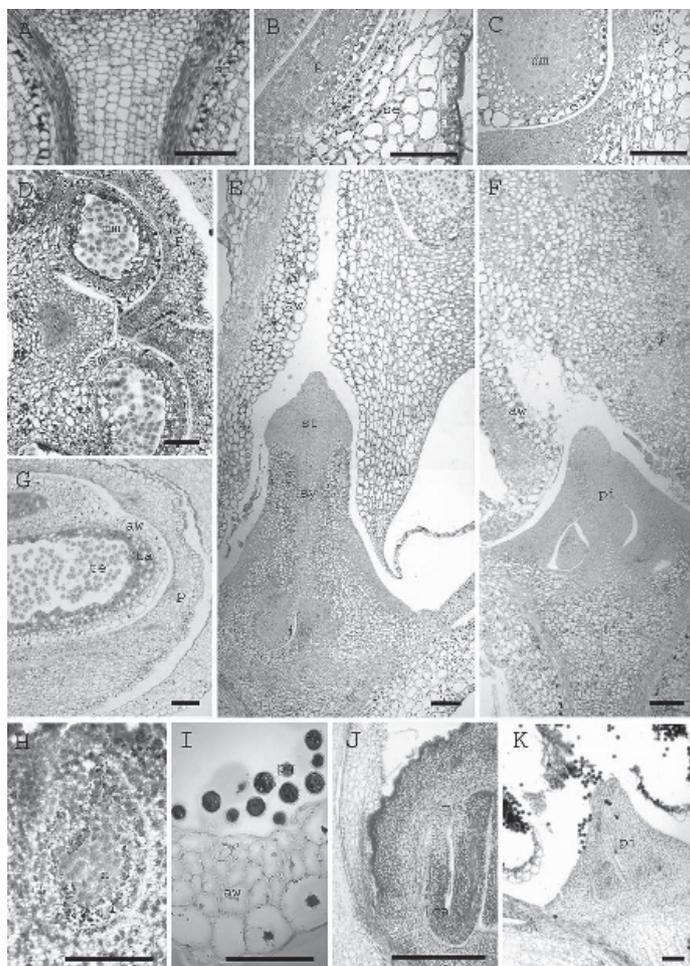


Fig. 1 - Analisi istochimica sul contenuto in amido durante lo sviluppo di fiori staminiferi ed ermafroditi. A-C: sezioni longitudinali semi-fine di fiori durante le fasi di pre-meiosi: l'amido è visibile nel peduncolo (a) alla base di petali e sepali (b) e nell'esotecio (c) dopo la differenziazione delle cellule madri delle microspore. D: sezione semifina trasversale di antera alla fine della pre-meiosi. E-F: semifina longitudinale di fiore ermafrodita (e) e staminifero (f): amido abbondante solo nel pistillo del fiore ermafrodita. G semifina di antera prima della meiosi. H: sezione in paraffina di un ovulo durante la megasporogenesi con amido visibile solo nel tegumento e non nella nucella. I: semifina trasversale di antera all'antesi. J: semifina longitudinale di un ovario di fiore ermafrodita all'antesi: l'amido è localizzato al micropilo e alla calaza; 400  $\mu\text{m}$ . K: sezione longitudinale in paraffina di fiore staminifero con amido presente nel peduncolo e nel polline ma non nel pistillo. Se non diversamente indicato, la barra corrisponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 1 - Histochemical detection of starch content during hermaphrodite and staminate flower development. A-C Longitudinal semi-thin sections, stained with iodine-potassium iodide solution, of olive flowers at the early pre-meiosis stage: starch grains are visible in the peduncle (a) particularly in the cells of the starch sheath, in the basal portion of the petals and sepals (b) and in the exothecium (c) after microspore mother cell differentiation. D: transverse semi-thin section of anther at late pre-meiosis stage: starch grains are localized in the sepal, petal and anther wall. E-F: longitudinal semi-thin sections, stained with iodine-potassium iodide solution, of a hermaphrodite (e) and a staminate (f) flower at the late pre-meiosis stage: starch grains are abundant in the pistil of the hermaphrodite flower, while no starch grains were detected in the pistil of staminate flowers. G: longitudinal semi-thin section, stained with iodine-potassium iodide solution of the anther just after meiosis. Starch grains are visible in the petal and in the anther wall but not in the tapetum or in the tetrads. H: longitudinal paraffin section, stained by iodine-potassium iodide solution, of an ovule during megasporogenesis in which starch grains are only visible in the integument and not in the nucellus. I: transverse semi-thin section of the anther at anthesis stained by periodic acid Schiff's reaction contains pollen grains that are rich in starch. J: longitudinal semi-thin section of an ovary of a hermaphrodite flower at anthesis stained with iodine-potassium iodide solution: the starch was particularly localized in the micropylar and chalazal regions; bar 400  $\mu\text{m}$ . K: longitudinal paraffin section of a staminate flower at anthesis displaying starch grains in the peduncle and pollen, but not in the pistil. AW anther wall, CA chalaza, I integument, M micropyle, NM microspore mother cells, N nucellus, P petal, PI pistil, PG pollen grains, ST stigma, SY style, TA tapetum, TE tetrads. If not different specified, bars 100  $\mu\text{m}$ .

#### Quantificazione della Rubisco, della clorofilla e delle invertasi acide

Non è stata rilevata nessuna attività della Rubisco negli ovari di fiori ermafroditi o staminiferi di entrambe le cultivar, mentre il contenuto di clorofilla delle due cultivar non è statisticamente differente. Si è rilevata una differenza significativa tra fiori ermafro-

diti e staminiferi nel contenuto di clorofilla  $\alpha$  e totale ( $Cl_{\alpha}$ :  $0,14 \pm 0,02$  nei fiori ermafroditi e  $0,06 \pm 0,003$  negli staminiferi;  $Cl_{TOT}$ :  $0,21 \pm 0,02$  nei fiori ermafroditi e  $0,11 \pm 0,003$  negli staminiferi), con valori più elevati osservati nei fiori ermafroditi.

In merito alle invertasi acide solubili, dati preliminari relativi ad entrambe le cultivars hanno evidenzia-

to una maggiore attività nei fiori ermafroditi rispetto a quelli staminiferi, supportando l'ipotesi dell'esistenza nei primi di una maggiore forza sink (fig. 2).

## Conclusioni

La prima differenza significativa tra fiori ermafroditi e staminiferi nello sviluppo dei pistilli si è registrata in concomitanza con il fallimento della meiosi a carico delle cellule madri della megaspore. Le osservazioni istochimiche hanno dimostrato che l'amido appare dapprima nei sepali e petali di entrambi i tipi di fiori, successivamente, granuli di amido sono stati osservati nell'antera e poco prima della meiosi nel pistillo dei fiori ermafroditi mentre nessun granulo è stato rilevato nel pistillo dei fiori staminiferi.

Le differenze osservate nel contenuto di amido tra fiori ermafroditi e staminiferi nelle ultime fasi di premeiosi sono correlate con l'arresto dello sviluppo del pistillo nei fiori staminiferi. Queste osservazioni suggeriscono che l'accumulo di amido è un indicatore chiave del successo nella differenziazione del pistillo e un indicatore del potenziale aborto ovarico. Inoltre l'accumulo di amido non è correlato con l'attività fotosintetica delle strutture fiorali, facendo ipotizzare che differenze nella forza "sink" si verificano tra fiori ermafroditi e staminiferi. In altre specie vegetali il flusso del saccarosio e quindi il richiamo dei nutrienti è influenzato da saccarosio sintasi e dall'attività di specifiche invertasi. In olivo i dati ottenuti evidenziano una differente attività invertasica dei fiori ermafroditi e dei fiori staminiferi e tale eterogeneità potrebbe spiegare il differente richiamo energetico dei fiori ermafroditi rispetto a quelli staminiferi e di conseguenza spiegare almeno in parte i diversi contenuti in amido.

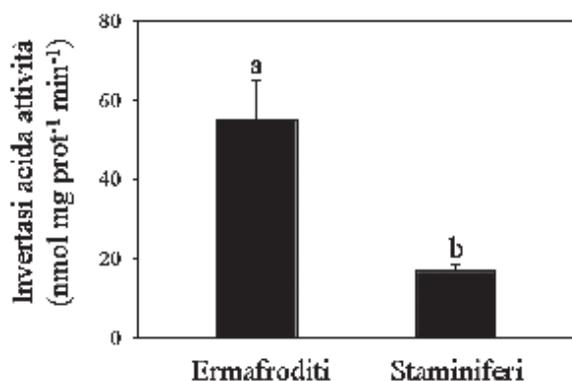


Fig. 2 - Attività delle invertasi solubili acide in fiori ermafroditi e staminiferi di olivo. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di tre estrazioni indipendenti ( $n = 10$ ); lettere differenti indicano valori significativamente diversi per  $p \leq 0,01$ .

Fig. 2 - Soluble acid invertase activity in hermaphrodite and staminate flowers of olive (*Olea europaea* L.). Data are means  $\pm$  SE from three experiments. Different letters indicate statistically significant different means ( $P \leq 0.01$ ).

## Riassunto

Nelle angiosperme un importante mezzo attraverso cui la pianta può controllare la produzione dei frutti è l'aborto fiorale che, in olivo (*Olea europaea* L.), è correlato alla presenza dei fiori staminiferi, nei quali solo l'androceo è perfettamente conformato e funzionante, mentre il gineceo interrompe più o meno precocemente lo sviluppo e va incontro rapidamente a degenerazione. Recentemente è stato evidenziato che in questi fiori il blocco dello sviluppo del pistillo avviene generalmente in corrispondenza della megasporogenesi; la cellula madre delle megaspore si differenzia ma non intraprende la meiosi volta a formare le megaspore. Il presente studio condotto su due cultivar di olivo (Leccino e Dolce Agogia) ha evidenziato differenze significative nel contenuto di amido tra fiori ermafroditi e staminiferi; nei primi l'amido è abbondante in tutti gli organi fiorali, il pistillo giunge a completo sviluppo e sono presenti sacchi embrionali perfettamente conformati, mentre negli altri la presenza di amido è stata rilevata solo a livello del peduncolo, dei sepali, dei petali e dell'androceo, mentre è assente a livello del gineceo. Analisi citologiche hanno evidenziato la presenza nel pistillo di entrambi i tipi di fiori, di plastidi con un numero ridotto di tilacoidi, spesso non correttamente impilati; inoltre, misure di tipo biochimico volte a quantificare l'attività dell'enzima fotosintetico rubisco hanno dimostrato che questa è quasi nulla. Questi dati suggeriscono una origine secondaria dell'amido presente a livello del gineceo e, perciò, si ipotizza che la sua minore presenza nei fiori staminiferi possa essere dovuta ad una loro ridotta capacità di attirare i prodotti della fotosintesi (forza sink) e/o ad una loro diversa capacità metabolica di trasformarli in amido.

**Parole chiave:** *Olea europaea* L., fiori ermafroditi e staminiferi, amido, invertasi.

## Bibliografia

- BRADFORD M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- REALE L., SGROMO C., BONOFILIO T., ORLANDI F., FORNACIARI M., FERRANTI F., ROMANO B., 2006. *Reproductive biology of olive (Olea europaea L.) DOP Umbria cultivars.* *Sex Plant Reprod* 19: 151-161
- REALE L., SGROMO C., EDERLI L., PASQUALINI S., ORLANDI F., FORNACIARI M., FERRANTI F., ROMANO B., 2009. *Morphological and cytological development and starch accumulation in hermaphrodite and staminate flowers of olive (Olea europaea L.).* *Sex Plant Reprod.* 22(3): 109-119.
- ZINSELMEIER C., JEONG B.R., BOYER J.S., 1999. *Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials.* *Plant Physiol* 121: 25-36.

## Influenza dell'ambiente di coltivazione sulla maturazione delle drupe e sulla composizione dell'olio della cultivar Ortice

Di Vaio C.<sup>1\*</sup>, Nocerino S.<sup>1</sup>, Paduano A.<sup>2</sup> e Sacchi R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia vegetale, Università di Napoli Federico II

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Napoli Federico II

### Influence of the growing environment on olive maturation and oil composition of the cultivar Ortice

**Abstract.** Understanding the relationships between cultivars and the cultivation environment as well as optimizing cultivation choices can lead to maximum expression of oil production both in terms of quantity and quality. With this purpose, samples of the Ortice olive cultivar grown in two different environments, at an altitude of 500 m (San Lupo, BN - Italy) and 50 m asl (Eboli, SA - Italy), were harvested on various dates to monitor drupe maturation and assess the nutritional and chemical characteristics of oils. The olive samples were used to determine drupe weight and color, pulp consistency and oil yield, while oil extracts were used to analyze the following quality characteristics: free acidity, peroxide number, spectrophotometric indices, and fatty acid content of polyphenols and sensory profile by panel test. The climatic conditions of the two environments were analyzed by measuring maximum and minimum daily temperatures, used to determine cumulative growing degree days (GDD), and precipitation at the two sites. The different heat accumulation related to the environment affected drupe development, as well as the coloring trend and fat content. Consequently, the growth environment changed the content of Ortice oil fatty acids and polyphenols, while the flavor profile remained fairly stable in both environments, with the cultivar effect prevailing over the environment factor.

**Key words:** Olive, Ortice, phenolic composition, fatty acids, aromatic profile.

### Introduzione

La conoscenza dell'intimo legame esistente tra la pianta ed il territorio, consente di poter migliorare non solo la gestione agronomica, ma fornire utili indicazioni sulle scelte colturali da adottare al fine di rende-

re ottimali i rapporti tra ambiente e cultivar, permettendo la massima espressione delle potenzialità produttive, non solo da un punto di vista quantitativo ma anche qualitativo. La qualità del prodotto primario ricavato dall'olivo, l'olio, viene influenzato da fattori genetici, agronomici ed ambientali (Cimato, 1990; Kiritsakis, 1991). Per l'olivo, a differenza di quanto accade per altre colture, quali la vite (Boselli *et al.*, 1993), sono ancora piuttosto limitate le conoscenze sui legami esistenti tra i parametri climatici-pedologici e il risultato produttivo; sicuramente le variabili ambientali condizionano l'efficienza produttiva ed incidono sulla qualità dell'olio. La cultivar, tuttavia, mantiene il ruolo di "fattore agronomico" maggiormente responsabile delle "impronte" chimiche e organolettiche dell'olio che ne determinano la tipicità, lo rendono diverso dagli altri grassi vegetali e particolarmente pregiato per le proprietà nutrizionali. Le cultivar, tuttavia, possono manifestare una diversa risposta ai fattori ambientali e colturali, in ragione della loro diversa resistenza a condizioni di stress o alla differente risposta al regime termico prevalente durante lo sviluppo e la maturazione del frutto (Inglese *et al.*, 2009). Lo stato termico può rendere marcato l'effetto dell'ambiente o dell'annata sulla composizione dell'olio, evidenziando una maggiore o minore stabilità fenotipica al variare del sito o dell'andamento climatico (Lombardo *et al.*, 2008; Fiorino e Ottanelli, 2004; D'Imperio *et al.*, 2007). L'entità delle precipitazioni influenza il contenuto in sostanze fenoliche degli oli: le maggiori disponibilità idriche tendono a ridurre il contenuto (Pannelli *et al.*, 1994, Patumi *et al.*, 2002; Tognetti *et al.*, 2007). L'altitudine alla quale sono coltivate le piante di olivo, può influire sulle caratteristiche qualitative dell'olio di oliva e soprattutto sulla sua composizione in acidi grassi. L'olio ottenuto da piante coltivate ad altitudini maggiori presenta una maggiore stabilità all'ossidazione rispetto a quello ottenuto a quote più basse (Osman *et al.*, 1994; Mohamed Mousa e Gerasopoulos, 1996; Montedoro *et al.*, 2003). Anche la temperatura svolge la sua influenza sia a livello di sviluppo della drupa che sulla composizione dell'olio: ambienti caratterizzati da alte

\* divaio@unina.it

temperature, fanno registrare un netto anticipo dell'invasatura delle drupe, con conseguente rapida degradazione della clorofilla (Yiasser e Dimitrios, 1996); mentre il suo decrescere, determina invece, un aumento della percentuale di acidi grassi insaturi (Kiritsakis e Markakis, 1987). Vi è, infine, anche un'influenza sulla componente aromatica degli oli, in quanto la temperatura, agendo sulle attività enzimatiche della via delle lipossigenasi, può determinare una diminuzione delle sostanze volatili da esse prodotte (Lehninger, 1992; Ridolfi *et al.*, 2002). Il germoplasma di olivo in Campania si caratterizza per un elevato numero di varietà (Pugliano, 2001) e l'Ortice è una delle cultivar più diffuse della provincia di Benevento, particolarmente apprezzata per le caratteristiche organolettiche dell'olio, ma anche utilizzata come oliva da mensa allo stato verde. La pianta è di media vigoria con portamento assurgente, è autoincompatibile e caratterizzata da un'invasatura tardiva. Le drupe sono di dimensioni medio-grandi, di forma ellissoidale e con una media resa in olio (Di Vaio, 2006).

### Scopo

Nonostante sia oggettivamente difficile separare i numerosi parametri che influiscono sulla produzione, cioè distinguere l'effetto delle tecniche colturali dall'interazione con le variabili ambientali, nel presente lavoro si è voluto studiare l'effetto dell'ambiente, in particolare l'azione dei fattori climatici ad essi legati (temperatura, precipitazioni), sul modello di maturazione del frutto, sulla composizione chimica e sul profilo sensoriale dell'olio, ottenuto da olive della cultivar campana Ortice coltivata in due ambienti differenti.

### Materiali e metodi

La prova è stata condotta nel 2009 presso due aziende ubicate in ambienti di coltivazione molto diversi tra loro. La prima situata nel comune di San Lupo (41°07'00"N, 14°46'00"E), in provincia di Benevento, nell'area dove la cultivar Ortice da sempre è coltivata. L'azienda sorge ad un'altitudine di 500 m s.l.m.. L'impianto è in piena produzione, con piante allevate ad asse centrale. La coltivazione è in asciutto e il terreno ha tessitura franco-argillosa. La seconda è l'Azienda Sperimentale "Improsta" della Regione Campania, situata a Eboli (40°37'01"N, 15°03'23"E), nella provincia di Salerno, a pochi metri sul livello del mare (50 m). Anche qui l'impianto è nella fase di piena produzione con piante allevate ad asse centrale in asciutto, la tessitura del terreno è di tipo franco-argilloso-limoso. Nell'ambito dei due

campi sono state selezionate 8 piante, omogenee per caratteristiche vegetative e produttive, della varietà Ortice, da cui sono stati raccolti campioni di 100 drupe a cadenza bisettimanale, per un totale di 7 prelievi, a partire dall'inizio di ottobre. Su tali campioni sono stati condotti i seguenti rilievi: peso delle drupe; durezza della polpa mediante puntale da 1.5 mm; colorazione delle drupe, mediante l'indice di Jaen (0-7) e contenuto in olio delle drupe (metodo Soxhlet). In ciascun campo, al momento della raccolta, avvenuta nella fase della piena invasatura, sono state prelevate 50 kg di olive, da cui si sono ottenuti oli monovarietali, mediante un impianto di microoleificazione (Oliomio, tipo Mini 50). Su tali oli sono state eseguite analisi volte a determinare: i parametri di qualità (acidità, numero di perossidi e indici spettrofotometrici), il profilo sensoriale, mediante Panel Test (Reg. CEE 796/02), la composizione fenolica mediante analisi HPLC e il profilo in acidi grassi (Christie, 1982). Le relazioni tra l'evoluzione della maturazione e l'effetto integrato nel tempo della temperatura sono state valutate mediante l'accumulo dei gradi giorno (GDD), calcolato mediante la formula:  $S = \sum_0^n (T_m - T_s)$ , dove S è la sommatoria termica dall'inizio dell'anno (0) alla fine dell'invasatura (n) delle differenze tra  $T_m$ , ovvero temperatura media giornaliera e  $T_s$  la temperatura di soglia (10°C). Per studiare l'andamento stagionale delle temperature e delle precipitazioni nei due ambienti, si è fatto riferimento ai dati della stazione agrometeorologica di San Lupo (BN) e di Eboli (SA); utilizzando le temperature massime e minime e le precipitazioni giornaliere. Tutti i dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) e calcolato l'errore standard delle medie, mediante il programma statistico XL-STAT. Le medie sono seguite da lettere diverse quando statisticamente differenti per  $P \leq 0,05$ .

### Risultati e discussione

La figura 1 mostra gli andamenti delle temperature minime e massime registrate a San Lupo (BN), nonché l'andamento pluviometrico della stessa area, riferiti all'anno 2009. Dal grafico è possibile evidenziare che le temperature minime sono particolarmente rigide nel periodo corrispondente alla seconda decade di febbraio (anche inferiori a 0° C) e che in ogni caso non superano i 15° C, mentre il picco più alto per le temperature massime si è registrato nel corso del mese di agosto (35° C).

In figura 2 viene mostrato, invece, l'andamento termo-pluviometrico di Eboli (SA), sempre riferito all'anno 2009. Le temperature minime, in questa zona, sono più alte, raggiungendo, infatti, valori superiori ai

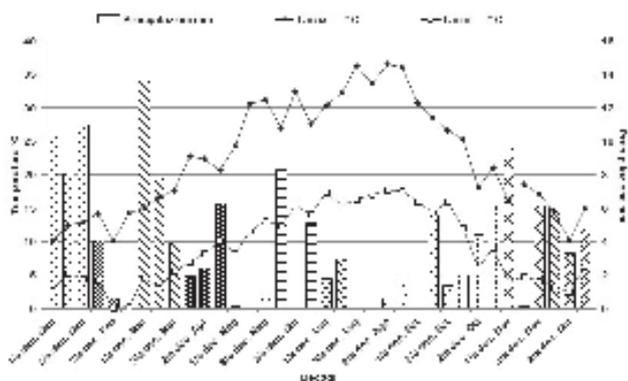


Fig. 1 - Andamento termo-pluviometrico dell'anno 2009 registrato nel sito di San Lupo (BN).

Fig. 1 - Temperature and rainfall in 2009 at San Lupo (500 m a.s.l.).

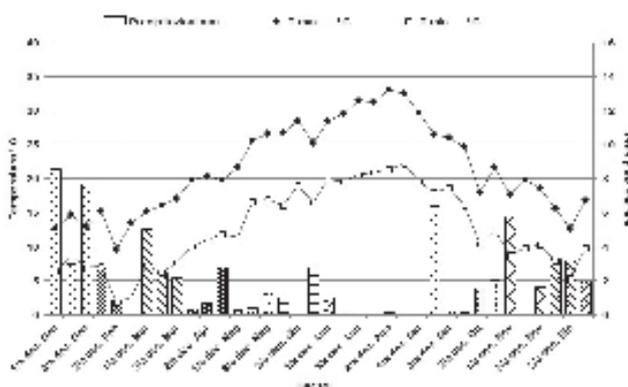


Fig. 2 - Andamento termo-pluviometrico dell'anno 2009 registrato nel sito di Eboli (SA).

Fig. 2 - Temperature and rainfall in 2009 at Eboli (50 m a.s.l.).

20 °C, mentre le temperature massime sembrano mantenersi piuttosto simili a quelle di San Lupo (BN) (34 °C, sempre riferiti ad agosto). In particolare, dal confronto tra i due ambienti possiamo notare che a San Lupo (BN) si ritrovano maggiori escursioni termiche durante tutto l'anno, con valori massimi che si riscontrano tra luglio ed agosto pari a 24,7 °C, al contrario, ad Eboli (SA) le escursioni termiche sono decisamente ridotte, con un valore massimo di 17 °C. Per quanto riguarda le precipitazioni nel corso dell'anno 2009, a San Lupo (BN), è stata registrata una pioggia totale di 1445,8 mm, con 152 giorni di precipitazioni, mentre ad Eboli (SA) le precipitazioni durante lo stesso arco temporale, sono state pari a 713,6 mm, con 126 giorni di pioggia. Di conseguenza, a Benevento si registra una piovosità pari a circa il doppio di quella di Eboli (SA). Le relazioni esistenti tra l'evoluzione della maturazione e l'effetto integrato della temperatura nel tempo è stato valutato mediante l'accumulo dei gradi giorno (GDD), calcolato secondo la formula della sommatoria termica, raggiungendo a San Lupo (BN) un valore pari a 2212,6 GDD contro i 2684,7 GDD

registrati ad Eboli (SA). La figura 3 mostra il confronto dell'accumulo dei gradi giorno tra i due ambienti, durante tutto l'arco dell'anno, dal quale si evidenzia un maggiore accumulo di GDD ad Eboli (SA), via via crescente a partire dal periodo primaverile.

Nella tabella 1 si riporta l'andamento del peso medio delle drupe nei due ambienti in esame. Il trend di crescita delle drupe è risultato molto simile nei due ambienti, mantenendosi, tuttavia, leggermente inferiore nella provincia di Benevento. Alla fine delle osservazioni, in corrispondenza del rilievo del 10/12, ad Eboli è stato registrato un peso della drupa di 5,55 g, mentre a Benevento il peso è stato di 4,75 g. Per quanto riguarda la durezza della polpa, l'Ortice mostra, in generale, un'elevata resistenza alla penetrazione. Anche per questo parametro l'andamento è molto simile nei due ambienti, evidenziando nel corso della maturazione una costante riduzione (tab. 1), arrivando alla fine delle osservazioni ad un valore di 259,6 kg/cm<sup>2</sup> ad Eboli (SA) e di 227,1 kg/cm<sup>2</sup> a Benevento. Per quanto riguarda invece, la colorazione delle drupe, questo è stata valutata mediante l'Indice di Jaén, secondo cui il momento ottimale per la raccolta si raggiunge con un valore compreso tra 3 e 4.

Come mostrato nella tabella 1, l'Ortice coltivata ad Eboli raggiunge questo intervallo intorno alla data del 5 novembre, quando i valori dell'indice di Jaen sono pari a 3,65, mentre nella stessa data di campionamento, a San Lupo (BN) l'indice era ancora di 2,66 e solo tra il 18 ed il 25 novembre questo intervallo viene raggiunto, evidenziando così un ritardo nella maturazione. Di conseguenza, nei due ambienti a confronto, si osserva una maturazione più precoce della cultivar Ortice allevata ad Eboli, rispetto a quando la stessa cultivar è coltivata nell'areale di origine (provincia di Benevento), dove la maturazione risulta ritardata e più

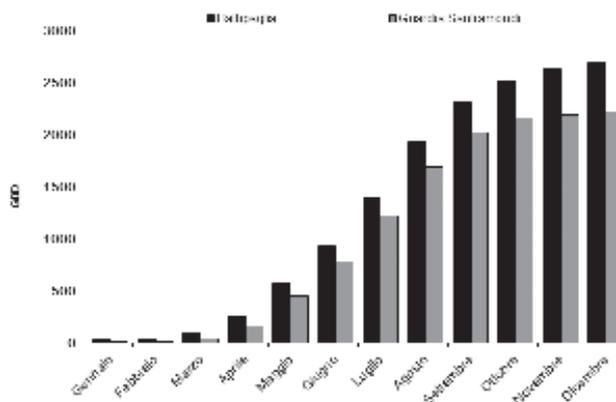


Fig. 3 - Confronto tra le sommatorie termiche delle aree di San Lupo (BN) ed Eboli (SA).

Fig. 3 - Comparison between heat sums of the areas of San Lupo (BN) and Eboli (SA).

Tab. 1 - Andamento delle caratteristiche della drupa, nel corso della maturazione, della cv Ortime nei due ambienti (media  $\pm$  Er. St.).  
 Tab. 1 - Trend in drupe characteristics during the ripening of cv Ortime in the two environments (mean  $\pm$  SE).

Luogo	Parametro	7 ottobre	15 ottobre	26 ottobre	5 novembre	16 novembre	25 novembre	10 dicembre
Eboli (SA)	peso drupe (g)	3,97 $\pm$ 0,08	4,11 $\pm$ 0,08	4,81 $\pm$ 0,11	4,57 $\pm$ 0,10	5,13 $\pm$ 0,11	5,04 $\pm$ 0,12	5,55 $\pm$ 0,11
San Lupo (BN)		3,86 $\pm$ 0,07	3,59 $\pm$ 0,09	4,26 $\pm$ 0,08	4,53 $\pm$ 0,07	4,41 $\pm$ 0,09	4,60 $\pm$ 0,09	4,75 $\pm$ 0,09
Eboli (SA)	durezza polpa (kg/cm <sup>2</sup> )	487,00 $\pm$ 3,96	505,20 $\pm$ 8,60	448,40 $\pm$ 5,88	399,30 $\pm$ 5,38	349,90 $\pm$ 3,54	339,00 $\pm$ 3,31	259,60 $\pm$ 3,70
San Lupo (BN)		473,30 $\pm$ 4,28	448,23 $\pm$ 7,40	407,30 $\pm$ 4,04	402,40 $\pm$ 2,85	324,40 $\pm$ 2,61	339,80 $\pm$ 2,88	227,10 $\pm$ 2,02
Eboli (SA)	Indice di Jean (0-7)	0,59 $\pm$ 0,09	0,73 $\pm$ 0,10	2,90 $\pm$ 0,10	3,65 $\pm$ 0,09	3,93 $\pm$ 0,09	3,94 $\pm$ 0,09	4,16 $\pm$ 0,10
San Lupo (BN)		0,15 $\pm$ 0,04	1,05 $\pm$ 0,14	1,52 $\pm$ 0,10	2,66 $\pm$ 0,07	3,05 $\pm$ 0,08	4,51 $\pm$ 0,09	4,72 $\pm$ 0,12
Eboli (SA)	Contenuto olio (% p.f.)	20,84 $\pm$ 0,16	19,49 $\pm$ 0,48	25,07 $\pm$ 0,40	23,58 $\pm$ 0,63	22,66 $\pm$ 0,21	21,87 $\pm$ 0,27	21,70 $\pm$ 0,20
San Lupo (BN)		23,01 $\pm$ 0,0	21,40 $\pm$ 0,11	28,27 $\pm$ 0,39	25,07 $\pm$ 0,61	28,65 $\pm$ 0,10	25,56 $\pm$ 0,23	27,88 $\pm$ 0,36

graduale. Il contenuto in olio (tab. 1) delle drupe (espresso in peso fresco) si mantiene sempre maggiore a Benevento, fino all'ultima data di campionamento del 10 dicembre, quando raggiunge un contenuto di 27,9 % rispetto al valore di 21,7 % di Eboli (SA). Nei due ambienti, nella fase di piena invaiatura sono state raccolte 50 kg di olive e successivamente molite mediante un micro-frantoio per ottenere due campioni di olio monovarietale, sui quali sono state effettuate le analisi chimiche e sensoriali. Dall'analisi degli indici di qualità degli oli (acidità, numero di perossidi ed indici spettrofotometrici), riportati in tabella 2, si può osservare che tutti i parametri analitici rientrano nei limiti previsti dalla normativa vigente (Reg. CE 2568/91) per la categoria degli oli extra vergini di oliva. I dati non mostrano sostanziali differenze tra i due campioni, anche se l'olio ottenuto dalla varietà coltivata ad Eboli (SA) presenta valori leggermente più elevati rispetto all'olio ottenuto a Benevento. Probabilmente, i valori di acidità molto prossimi al limite normativo per l'extravergine, sono da mettere in relazione ad un leggero attacco della mosca dell'olivo (Delrio *et al.*, 1995; Zunin *et al.*, 1992) verificatosi nel sito di Eboli (SA).

L'analisi della composizione fenolica degli oli monovarietali, ha messo in evidenza che la cultivar Ortime presenta un medio-alto contenuto in fenoli totali (fig. 4).

In particolare, a Benevento si è osservato un maggiore accumulo di bio-fenoli (386,9 ppm) rispetto ad Eboli (177,1 ppm); infatti, è possibile osservare un contenuto superiore a Benevento di OHTy-EDA (66,5

ppm, forma dialdeica dell'acido elenoico esterificato con l'idrossitirosolo), composto a maggiore attività antiossidante, che invece è risultato nettamente inferiore ad Eboli (SA) (19,1 ppm). Inoltre, anche il contenuto di Ty-EDA (forma dialdeica dell'acido elenoico esterificata col tirosolo), responsabile della percezione di piccante, è risultato essere superiore a Benevento. In generale, possiamo comunque, notare come per tutti gli altri composti fenolici il trend sia lo stesso, con un contenuto superiore riscontrato sempre nella provincia di Benevento. Per quel che riguarda l'analisi degli acidi grassi (tab. 3), si osservano significative differenze tra i due oli in esame; l'olio ottenuto dalle olive coltivate ad Eboli (SA) presenta un mag-

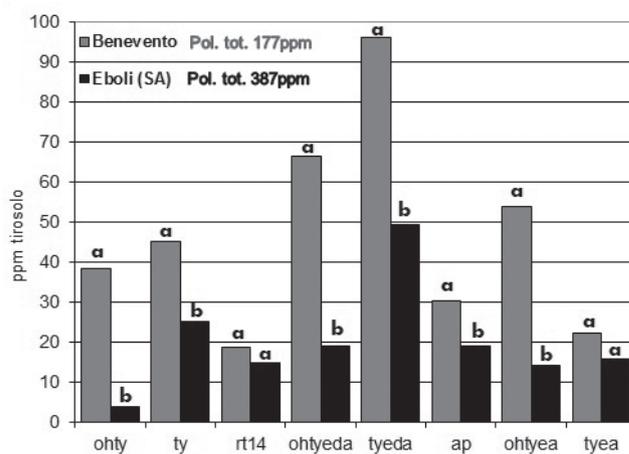


Fig. 4 - Confronto della composizione fenolica degli oli monovarietali Ortime coltivata a San Lupo (BN) e ad Eboli (SA).

Fig. 4 - Comparison of phenolic composition of Ortime oils grown in San Lupo (BN) and Eboli (SA).

Tab. 2 - Indici di qualità riscontrati nei campioni di olio monovarietali ottenuti da olive delle cultivar Ortime coltivata a San Lupo (BN) e ad Eboli (SA).

Tab. 2 - Quality indexes of oil samples obtained from Ortime olives grown in San Lupo (BN) and Eboli (SA).

Varietà	Acidità % ac. Oleico	N. perossidi meq O <sub>2</sub> /kg	UV		
			K232	K270	ΔK
Ortime Eboli (SA)	0,70 $\pm$ 0,05	4,3 $\pm$ 0,11	1,942 $\pm$ 0,076	0,161 $\pm$ 0,011	-0,006 $\pm$ 0,0
Ortime San Lupo (BN)	0,63 $\pm$ 0,01	3,6 $\pm$ 0,11	1,573 $\pm$ 0,031	0,105 $\pm$ 0,035	-0,004 $\pm$ 0,0

Tab. 3 - Composizione in acidi grassi, derivanti dal confronto degli oli monovarietalì delle cultivar Ortice coltivata a San Lupo (BN) e ad Eboli (SA).

Tab. 3 - Fatty acid composition of oil from Ortice olives in Eboli (SA) and San Lupo (BN).

Acido	Ortice Eboli (SA)	Ortice Benevento
Palmitico	16,328a	13,934b
Palmitoleico	0,081a	0,096a
Palmitoleico	1,302a	0,890b
Eptadecanoico	0,061a	0,054a
Eptadecanoico	0,081a	0,074a
Stearico	2a881a	3,136b
Oleico	56,696a	65,228b
Vaccenico	3,085a	2,595b
Linoleico	17	11,603b
Arachico	0,407a	0,349b
Linolenico	0,886a	0,736b
Eicosenoico	0,183a	0,188a
Behenico	0,092a	0,094a
Squalene	0,765a	0,895b
Lignocerico	0,048a	0,040a
O/L	3,315	5,627
S/I	0,250	0,216

gior contenuto di acido palmitico e linoleico, ed un minor contenuto in acido oleico e stearico. Questo in accordo con numerosi studi riportati in letteratura (Osman *et al.*, 1994; Kiritsakis e Markakis, 1984; Mousa e Gerasopoulos, 1996), secondo cui ad altitudini maggiori si ha un aumento degli acidi grassi monoinsaturi.

L'analisi sensoriale degli oli monovarietalì dell'Ortice (fig. 5), ha evidenziato le tipiche note varietali della cultivar (Ambrosino *et al.*, 2003), con un profilo che si caratterizza, a prescindere dall'influenza dell'ambiente, da chiari sentori di fruttato di oliva e percezioni di pomodoro verde. All'assaggio ha presentato una buona fluidità ed equilibrio delle note

amare e del piccante. Dal confronto effettuato tra i due ambienti di coltivazione, l'olio dell'Ortice ha presentato profili sensoriali simili, con una percezione di amaro più marcato a Benevento, e spiccata nota di piccante, in entrambi gli ambienti, dovute soprattutto all'elevato contenuto di Ty-EDA.

### Conclusioni

Per quel che riguarda le considerazioni inerenti le osservazioni bio-morfologiche, i nostri dati trovano conferma in quanto riportato in letteratura; in particolare, è risultato evidente come lo sviluppo dei frutti sia maggiore ad Eboli (SA), che rappresenta il sito di osservazione quasi a livello del mare, rispetto a quello delle drupe allevate a San Lupo (BN) (sito a quota più elevata); infatti, il peso medio delle olive raccolte ad Eboli (SA) risulta sempre maggiore rispetto a quelle di Benevento, come confermato dallo studio effettuato da Mohamed Mousa *et al.* (1996), secondo cui l'andamento del peso delle drupe allevate a due diverse altitudini, mostra un incremento maggiore in peso per le drupe coltivate a bassa quota rispetto alle drupe della medesima cultivar cresciute ad un'altitudine maggiore. Inoltre, stando ai nostri dati, riguardanti l'indice penetrometrico, possiamo notare anche una maggiore consistenza della polpa rivelata a bassa quota. Risulta, inoltre, chiaro che vi è un anticipo della maturazione delle drupe coltivate nel sito a minore altitudine, che risultano idonee alla raccolta circa 10-15 giorni prima rispetto a quelle allevate a Benevento. Anche i dati circa l'accumulo di olio delle drupe trovano conferma nei dati di letteratura; anche in questo caso, infatti, Mohamed Mousa *et al.* (1996), riporta che il contenuto in olio risulta maggiore nelle olive di alta quota, a conferma dei nostri risultati della provincia di Benevento (27,9 % rispetto al 20,7 % di Eboli). La composizione acidica risulta fortemente influenzata

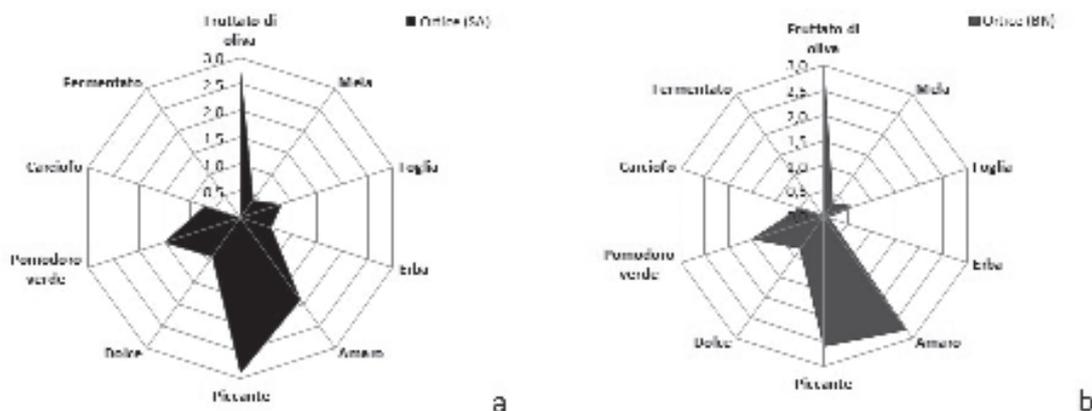


Fig. 5 - Analisi del profilo sensoriale dell'olio della cv Ortice: a) Eboli (SA); b) San Lupo (BN).  
 Fig. 5 - Sensory profile of Ortice oils: a) Eboli (SA); b) San Lupo (BN).

dall'ambiente di coltivazione a conferma dei numerosi studi riportati in bibliografia sull'argomento (Di Vaio *et al.*, 2009; Ripa *et al.*, 2008; Lombardo *et al.*, 2008). Infatti, è possibile notare come all'aumentare delle temperature, ad Eboli (SA), aumentino l'acido palmitico e linoleico e si riduca l'acido oleico, questo a discapito, ovviamente della conservabilità degli oli. Sempre a riguardo della composizione acidica trovano conferma i numerosi studi effettuati in funzione dell'altitudine; secondo molti autori infatti, oli prodotti ad altitudine maggiore mostrano una più alta stabilità ossidativa (Osman *et al.*, 1994) ed una maggiore percentuale globale di acidi grassi insaturi (Kiritsakis e Markakis, 1987), come evidenziano i risultati ottenuti, dal nostro lavoro, a Benevento. Dai riferimenti in letteratura sull'influenza dell'ambiente sulla composizione fenolica si evidenzia una non univoca veduta tra i vari autori; in particolare il lavoro effettuato da Farinelli *et al.* (2011) mostra un incremento del contenuto in polifenoli in estati ed autunni siccitosi, mentre nel lavoro di Cimato *et al.* (2001) viene messo in evidenza un maggior accumulo di composti fenolici in funzione delle basse temperature. I nostri risultati trovano conferma in quest'ultimo lavoro, mostrando una composizione fenolica, che evidenzia come a Benevento la cultivar abbia un maggior contenuto totale di fenoli. La composizione fenolica ha trovato riscontro nell'analisi sensoriale, che ha infatti evidenziato come l'ambiente di coltivazione, in particolare la temperatura elevata raggiunta ad Eboli (SA), ha portato ad una lieve modifica del profilo aromatico e organolettico dell'olio, con minori percezioni di amaro, legate ad una diminuzione del quadro fenolico, con uno scostamento dai profili tipici di Benevento (Ambrosino *et al.*, 2003). L'ambiente di coltivazione risulta, quindi, determinante nell'espressione della tipicità e della qualità della cultivar. Anche se è difficile scomporre l'influenza dei singoli parametri ambientali sui vari aspetti quantitativi e qualitativi della produzione, i dati ottenuti in questa sperimentazione indicano, nel loro complesso, una migliore espressione della varietà autoctona Ortice coltivata nel suo ambiente d'origine. Questa evidenza sperimentale conferma come la tipicità dell'olio extra vergine sia fortemente legata al binomio varietà-ambiente, requisito chiave per il riconoscimento di una Denominazione di Origine Protetta (DOP).

## Riassunto

La comprensione delle relazioni esistenti tra la cultivar e l'ambiente di coltivazione oltre ad ottimizzare le scelte colturali favorisce la massima espressione

della produzione di olio sia sotto l'aspetto quantitativo che qualitativo. Con questa finalità campioni di olive della cultivar Ortice cresciute in due ambienti diversi, uno ad un'altitudine di 500 m (San Lupo, BN) e l'altro a pochi metri dal livello del mare (Eboli, SA), sono stati raccolti in diverse date per seguire l'evoluzione della maturazione e valutare le caratteristiche chimico-nutrizionali degli oli monovarietali. Sui campioni di olive sono stati eseguiti i seguenti rilievi: peso e colore della drupa, durezza della polpa e resa in olio; mentre sull'olio sono state analizzate le caratteristiche qualitative: acidità libera, numero di perossidi, indici spettrofotometrici, contenuto in acidi grassi e polifenoli e profilo sensoriale, mediante panel test. Le condizioni climatiche dei due ambienti sono state analizzate rilevando le temperature massime e minime giornaliere, mediante le quali è stato calcolato l'accumulo dei gradi giorni (GDD), nonché l'entità delle precipitazioni. Il differente accumulo termico legato all'ambiente di coltivazione ha influenzato lo sviluppo del frutto, l'andamento dell'invaia e il contenuto in olio delle drupe. Di conseguenza l'ambiente di coltivazione ha modificato il contenuto degli acidi grassi e dei polifenoli dell'olio della cultivar Ortice, mentre il profilo aromatico è rimasto piuttosto stabile nei due ambienti, facendo prevalere, per quest'ultimo aspetto, l'effetto della cultivar sul fattore ambientale.

**Parole chiave:** Olivo, Ortice, composizione fenolica, acidi grassi, profilo aromatico.

## Bibliografia

- AMBROSINO M.L., CONTE F., PADUANO A., SANSONE L., TERMINIELLO R., SACCHI R., 2003. *Gli oli di oliva monovarietali in Campania*. Ed. Dipartimento di Scienza degli Alimenti – Facoltà di Agraria, Università di Napoli Federico II.
- BOSELLI M., PASQUARELLA C., PILONE N., PUGLIANO G., DI VAIO C., SCAGLIONE G., 1993. *Influenza di alcuni fattori ambientali e colturali sul comportamento di varietà di Vitis Vinifera L. in diverse aree viticole della Campania*. Atti Convegno "Studi e Ambienti", Asti 14-15 luglio 1993: 241-243.
- CIMATO A., 1990. *Effect of agronomic factors on virgin olive oil quality*. *Olivae*, 31: 20-31.
- CIMATO A., LAPUCCI C., ATTILIO C., FRANCHINI E., 2001. *Caratteristiche chimiche ed organolettiche dell'olio d'oliva: il ruolo della cultivar*. Istituto sulla Propagazione delle Specie Legnose, CNR Scandicci, Firenze – Estratto dal Seminario: Olivicoltura da olio di qualità, 2001, pp 18-29.
- CHRISTIE W.W., 1982. *Lipid Analysis*. 2nd Edition. Pergamo Press, Oxford (UK).
- D'IMPERIO M., DUGO G., ALFA M., MANNINA L., SEGRE A., 2007. *Statistical analysis on Sicilian olive oils*. *Food Chemistry* 102: 956-965.
- DELRIO G., LENTINI A., VACCA V., SERRA G., 1995. *Influenza dell'infestazione di Bactrocera oleae sulla produzione e sulle caratteristiche qualitative dell'olio d'oliva*. Riv. It. Sostanze Grasse, LXXII: 5-8.

- DI VAIO C., 2006. *Le cultivar di olivo autoctone della Campania: salvaguardia, valorizzazione e caratterizzazione*. Estratto da: "I Georgofili" - Atti della Accademia dei Georgofili, serie VIII, Vol. 3, Tomo II: 237-246.
- DI VAIO C., NOCERINO S., BARTOLOMUCCI R., 2009. *Caratterizzazione vegetativa e produttività di 20 cultivar di olivo del germoplasma campano*. Convegno Internazionale del Progetto RIOM "Ricerca ed Innovazione per l'Olivicoltura Meridionale", 57-61.
- FARINELLI D., RUFFOLO M., SCATOLINI G., SIENA M., TOMBESI A., 2011. *Monitoraggio del periodo ottimale di raccolta nella DOP "Umbria"*. Acta Italus Hortus 1: 159-163.
- FIORINO P., OTTANELLI A., 2004. *Crescita ed inolizione dei frutti di cultivar di olivo (Olea europaea) nella Toscana interna e possibili influenze dell'ambiente nella determinazione dei trigliceridi*. Atti del Convegno Nazionale "Germoplasma Olivicolo e Tipicità dell'Olio", Perugia: 158-164.
- FOLIN O., CIOCALTEAU V., 1927. *On tyrosine and tryptophan determination in protein*. J. Biol. Chem., 73: 627-650.
- INGLESE P., FAMIANI F., SERVILI M., 2009. *I fattori di variabilità genetici, ambientali e colturali della composizione dell'olio d'oliva*. Italus Hortus 14 (4), 2009: 67-81.
- KIRITSAKIS A., 1991. *Olive Oil*. American Oil Chemist's Society, Champaign, IL, USA.
- KIRITSAKIS A., MARKAKIS P., 1984. *Effect of olive collection regime on olive oil quality*. J. Sci Food Agric 35: 677-681.
- KIRITSAKIS A., MARKAKIS P., 1987. *Olive oil, a review*. Adv. Food Res. 31, 453-482.
- LEHNINGER A.L., 1992. *Principi di biochimica*. Cap 21: la biosintesi dei lipidi, pp. 560-590. Zanichelli.
- LOMBARDO N., MARONE E., ALESSANDRINO M., GIODINO G., MADEO A., FIORINO P., 2008. *Influence of growing season temperatures in the fatty acids (FAs) of triacylglycerols (TAGs) composition in Italian cultivars of Olea europaea*. Adv. Hort. Sci., 22 (1): 49-53.
- MOHAMED MOUSA Y., GERASOPOULOS D., 1996. *Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of "Mastoides" Olives*. J. Sci. Food Agric., 345-350.
- OSMAN M., METZIDAKIS I., GERASOPOULOS D., KIRITSAKIS A., 1994. *Qualitative changes in olive oil collected from trees grown at two altitudes*. Riv. Ital. Sost. Gras. 71 187-190.
- PANNELLI G., SERVILI M., BALDIOLI M., SELVAGGINI R., MONTEDORO G.F., 1994. *Effect of agronomic and seasonal factors on olive (Olea europaea L.) production and on the qualitative characterization of the oil*. Acta Hort., 356: 239-243.
- PATUMI M., D'ANDRIA R., MARSILIO V., FONTANAZZA G., MORELLI G., LANZA B., 2002. *Olive end olive oil quality after intensive monocone olive growing (Olea europaea L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes*. Food Chem., 77(1): 27-34.
- PUGLIANO G., 2001. *La risorsa genetica dell'olivo in Campania*. SeSIRCA Regione Campania.
- REGOLAMENTO CEE n. 2568/91 del 11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. G.U. Com. Europ. 5/9/91 NL 248/1.
- RIPA V., DE ROSE F., CARAVITA M.L., PARISE M.R., PERRI E., ROSATI A., PANDOLFI S., PAOLETTI A., PANNELLI G., PADULA G., GIORDANI E., BELLINI E., BUCCOLIERO A., MENNONE C., 2008. *Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality*. Adv. Hort. Sci., 22(2): 95-103.
- SACCHI R., PADUANO A., FIORE F., DELLA MEDAGLIA D., AMBROSINO M.L., MEDINA I., 2002. *Partition behavior of virgin olive oil phenolic compounds in Oil-Brine mixtures during thermal processing for fish canning*. J. Agric. Food Chem. 50: 2830-2835.
- YIASSER M.M., DIMITRIOS G., 1996. *Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of "Mastoides" Olives*. J. Sci. Food Agric., 71, 345-350.
- ZUNIN P., EVANGELISTI F., TISCORNIA E., 1992. *Influenza del tipo di infestazione da Dacus oleae sulla composizione dell'olio ottenuto da Olea europaea*. Nota 2. Riv. It. Sostanze Grasse, LXIX: 541-546.

## Coltura *in vitro* di microspore isolate per il miglioramento genetico di *Olea europaea* L.

Chiancone B.<sup>1</sup>, Testillano P.<sup>2</sup>, Risueño M.C.<sup>2</sup>, Abdelgalel A.M.<sup>1</sup>, Padoan D.<sup>1</sup>, Khan P.S.S.V.<sup>3</sup>, Levy Guarda N.<sup>1</sup>, Mtimet M.<sup>4</sup> e Germanà M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università di Palermo

<sup>2</sup> Plant Development and Nuclear Organisation, Centro de Investigacion Biologicas, CSIC Madrid (Spagna)

<sup>3</sup> Department of Botany, Yogi Vemana University, Vemanapuram (India)

<sup>4</sup> National Agronomic Institute of Tunisia, The Arid Region Institute, IRA (Tunisia)

### ***In vitro* culture of isolated microspores for *Olea europaea* L. breeding**

**Abstract.** Haploids (plants with the gametophytic chromosome number in the sporophyte:  $n$  instead of  $2n$ ) and doubled-haploids (haploids that doubled, spontaneously or induced, their chromosome number) have several applications in plant breeding, and, in particular, in mutagenesis, in *in vitro* selection, in transformation, in gametoclonal variation, in genome sequencing and in functional genomics. For those reasons, they are an interesting biotechnological tool for breeding. In olive, as well as in tree crops, generally characterized by self-incompatibility, long reproductive cycle, long juvenile phase, tendency to allogamy and by high levels of heterozygosity, there isn't any possibility to achieve homozygosity by traditional breeding methods, such as several generations of self-pollinations. Gametic embryogenesis, allowing the single step production of homozygosity from heterozygous parents, is more and more a goal of breeders. In fact, it consists in gamete capability of modifying their development from gametophytic to sporophytic and it can be obtained through two strategies: "gynogenesis", when regeneration is from the female gamete and "pollen embryogenesis", when it is from male gamete (by anther culture or isolated microspore culture). In the present study, preliminary results obtained by *in vitro* isolated microspore culture of several Italian olive cultivars, are reported.

**Key words:** gametic embryogenesis, isolated microspore culture, olive, pollen.

### **Introduzione**

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una pianta arborea mediterranea tipica dei climi temperati, caratterizzati

da estati calde e asciutte (Lavee, 1992). Il miglioramento genetico dell'olivo condotto con metodi tradizionali ha dovuto, da sempre, affrontare diversi problemi, come l'auto-incompatibilità, il lungo ciclo riproduttivo, la fase giovanile prolungata, una marcata tendenza all'allogamia ed un alto livello di eterosi. Come già verificato in molte specie, i metodi biotecnologici possono migliorare l'efficienza e la velocità dei programmi di miglioramento genetico.

L'embriogenesi gametica, permettendo l'ottenimento in una sola fase di linee omozigoti da parentali eterozigoti, è un metodo ampiamente usato per creare variabilità, mediante l'ottenimento di embrioni derivati dai gameti e di piante omozigoti che hanno diverse applicazioni nel miglioramento genetico. In particolare, l'embriogenesi da polline implica la riprogrammazione del polline immaturo (la microspora) verso lo sviluppo sporofitico, con la formazione di individui omozigoti (Germanà, 2006; 2011a,b). Per quanto riguarda l'embriogenesi gametica in olivo, sono stati condotti esperimenti sulla coltura *in vitro* di microspore isolate di cultivar spagnole (Arbequina e Picual), che hanno prodotto microspore multinucleate, strutture multicellulari e proembrioni, studiando, mediante analisi citochimiche e immunocitochimiche, il loro sviluppo *in vitro* (Bueno et al. 2004; 2005; 2006; Solis et al., 2008). Questo studio, che fa parte di una più ampia ricerca sull'embriogenesi gametica dell'olivo e di altre piante arboree, è stato condotto al fine di valutare l'effetto indotto da due trattamenti termici sulla coltura *in vitro* di microspore isolate di diversi genotipi italiani di olivo.

### **Materiali e metodi**

Nel mese di maggio, sono state raccolte mignole delle varietà di olivo: Cerasuola Sciacca, Galatina, Nocellara del Belice e Verdello (Scillato, PA) e di Moraiolo (Perugia) e sono stati conservati, per due settimane, a 4°C e al buio. Prima della coltura *in vitro*,

\*mariaantoniaetta.germana@unipa.it

per studiare la correlazione tra la dimensione del bocciolo e lo stadio di sviluppo delle microspore, i boccioli sono stati divisi in tre categorie dimensionali. In seguito, le antere sono state colorate con una soluzione di 4,6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) ed osservate al microscopio a fluorescenza (Zeiss, Axiophot, Germania), scegliendo la dimensione corrispondente allo stadio vacuolato.

Per ciascuna varietà, sono stati sterilizzati sotto cappa a flusso laminare 100 boccioli, mediante immersione per 5 minuti in una soluzione al 70% (v/v) di alcol etilico, seguita da un'immersione di 20 minuti in una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%, ed infine da tre risciacqui con acqua distillata sterile. L'isolamento delle microspore è stato svolto seguendo il protocollo di Kumlehn *et al.* (2006). Dopo l'ultimo lavaggio, le microspore sono state contate e sono state risospese in una quantità di mezzo di coltura liquido, tale da ottenere una densità di 200.000 microspore per ml di mezzo ( $2 \times 10^5$  microspore/ml).

Il mezzo di coltura usato per gli esperimenti è stato quello riportato da Germanà e Chiancone (2003), senza l'aggiunta dell'agar. Lo stesso mezzo di coltura, ma con l'aggiunta di 8,5 g/l di agar, è stato usato per la coltura del callo ottenuto dalle microspore isolate.

Le microspore isolate e poste in coltura sono state sottoposte a due trattamenti termici: 34 °C per 60 minuti (HT) e -20 °C per 30 minuti (F). Inoltre, è stato predisposto un controllo (C), in cui le microspore non hanno subito alcun trattamento termico. Le scatole Petri (35x10) con 1 ml di sospensione sono state poste al buio per i primi 30 giorni e poi poste sotto lampade bianche fluorescenti (Philips TLM 30W/84) con una densità di flusso fotosintetico di  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e con un fotoperiodo di 16 ore di luce al giorno.

Al fine di valutare l'andamento dello sviluppo delle microspore, all'inizio della coltura e per i primi tre mesi sono state effettuate delle osservazioni al microscopio a fluorescenza, ricorrendo alla stessa colorazione con DAPI riportata in precedenza. Inoltre, per ciascun trattamento e per ogni cultivar, è stato misurato il diametro di 100 microspore, calcolandone le medie. L'influenza sul diametro delle microspore del trattamento termico e del genotipo è stata valutata ricorrendo all'ANOVA a due vie. La separazione delle medie è stata effettuata mediante test Student-Neuman-Keuls (SNK) ( $p \leq 0,05$ ).

## Risultati e discussione

La scelta dell'appropriato stadio di sviluppo delle microspore è cruciale per l'embriogenesi da polline. In questo studio, è stata determinata la corrispondenza

tra lo stadio di sviluppo delle microspore, da tetrade a polline maturo, con la corrispondente dimensione delle antere e del bocciolo, identificando i boccioli non ancora schiusi, di circa 2-3 mm, con antere gialloverde, come quelli con il più alto numero di microspore allo stadio vacuolato, stadio considerato il più rispondente per l'induzione embriogenica (figg. 1 e 2) (Germanà, 2009).

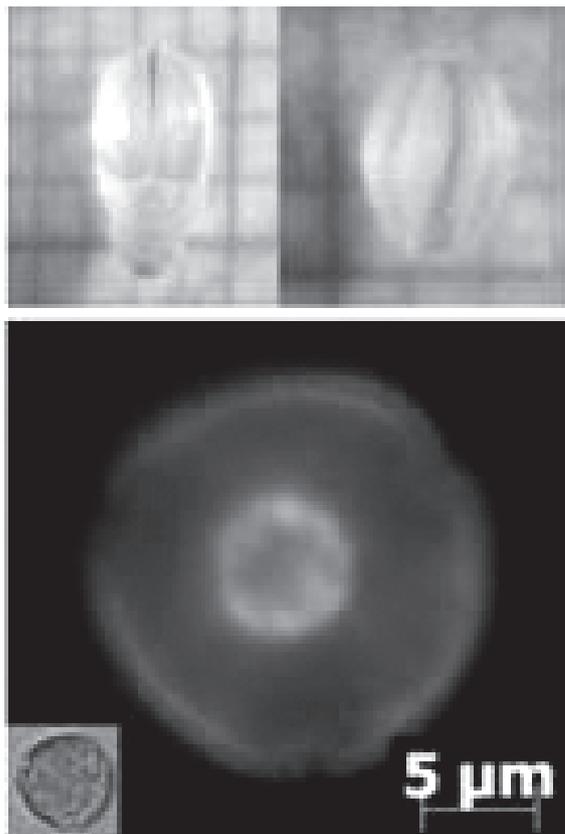


Fig. 1 - Correlazione fra lo stadio fenologico del bocciolo, dell'antera e della microspora (DAPI).

*Fig. 1 - Correlation between phenological stage of flower bud, of anther and of microspore development (cv Nocellara del Belice) (DAPI).*

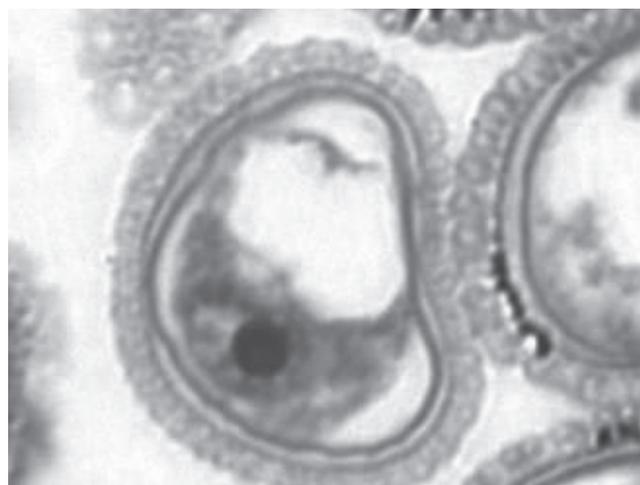


Fig. 2 - Microspora vacuolata di Nocellara del Belice (Toluidine blue).  
*Fig. 2 - Nocellara del Belice vacuolated microspore (Toluidine blue).*

Le osservazioni effettuate al microscopio a fluorescenza durante la coltura hanno mostrato l'evoluzione delle microspore in coltura, riscontrando sia lo sviluppo gametofitico che sporofitico. Sono state rilevate, infatti, microspore che presentavano le tipiche caratteristiche del polline maturo, con due nuclei che mostravano intensità luminosa differente (nucleo generativo e vegetativo) (fig. 3) e microspore che avevano deviato dal normale sviluppo gametofitico per seguire la via sporofitica, in cui erano presenti due nuclei uguali, frutto di una divisione simmetrica (fig. 4). La divisi-

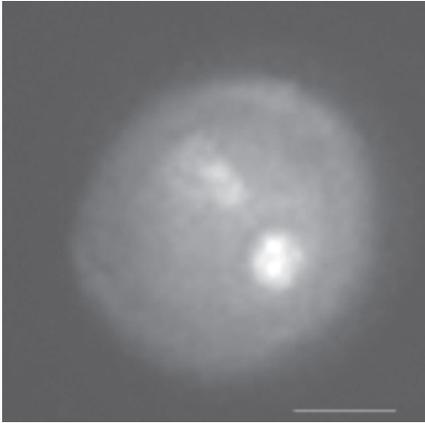


Fig. 3 - Microspora con due nuclei asimmetrici di Moraiolo (DAPI) (barra 10  $\mu\text{m}$ ).

Fig. 3 - Moraiolo microspore with two asymmetrical nuclei (DAPI) (scale bar 10  $\mu\text{m}$ ).

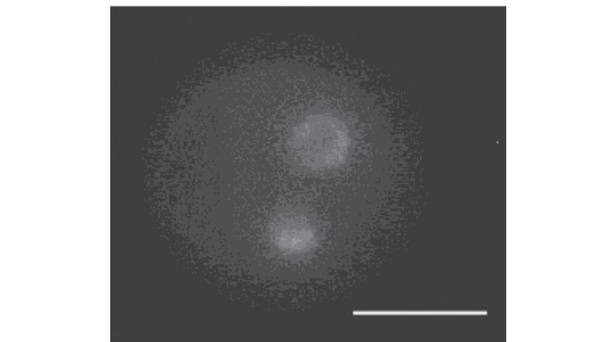


Fig. 4 - Microspora con due nuclei simmetrici (Toluidine blue alto, DAPI basso) di Nocellara del Belice (barra 10  $\mu\text{m}$ ).

Fig. 4 - Nocellara del Belice microspore with two symmetrical nuclei (Toluidine blue up, DAPI bottom) (scale bar 10  $\mu\text{m}$ ).

ne simmetrica del nucleo è considerata, insieme all'accumulo di amido, alla citochinesi con formazione di nuove pareti cellulari, alla presenza abbondante di ribosomi e ai cambiamenti nell'esterificazione delle pectine e nei componenti cellulocici delle pareti cellulari, una delle caratteristiche tipiche della proliferazione e della differenziazione delle microspore (Bueno *et al.*, 2005; Solis *et al.*, 2008). Inoltre, dopo circa tre mesi di coltura, è stato possibile osservare polline maturo e germinato (fig. 5), ma anche microspore multinucleate che rappresentano un ulteriore progresso nello sviluppo embriogenico (fig. 6).

Le microspore misurate al momento della messa in coltura, cioè subito dopo l'isolamento, mostravano un diametro medio di 10  $\mu\text{m}$ , ma le misurazioni effettuate dopo 3 mesi di coltura hanno evidenziato un aumento significativo del diametro fino ad un massimo di 23,8  $\mu\text{m}$  (fig. 7). L'analisi statistica effettuata sui dati rilevati dopo tre mesi in coltura, ha evidenziato un'influenza significativa del fattore trattamento termico, ma non del fattore cultivar. Il trattamento "a freddo" (F) ed il trattamento "a caldo" hanno fornito risultati statisticamente uguali; infatti, il primo ha determinato un aumento del diametro delle microspore da 10 a 23,8  $\mu\text{m}$  ed il secondo da 10 a 20,3  $\mu\text{m}$ . Differenze statisticamente significative sono state individuate fra i due trattamenti termici ed il controllo (C), in cui è stato osservato l'incremento di dimensio-



Fig. 5 - Polline di Verdello germinato (DAPI).  
Fig. 5 - Verdello germinated pollen grain (DAPI).

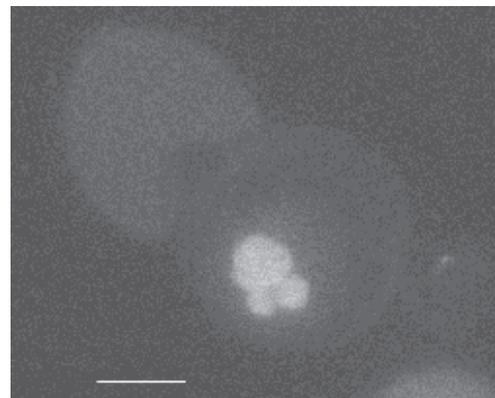


Fig. 6 - Microspora multinucleata di Verdello (DAPI) (barra 10  $\mu\text{m}$ ).  
Fig. 6 - Verdello multinucleated microspore (DAPI) (scale bar 10  $\mu\text{m}$ ).

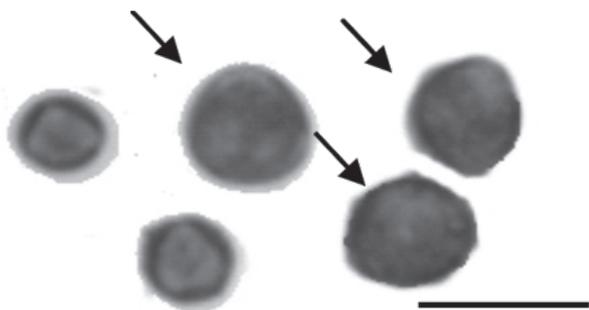


Fig. 7 - Microspore non sviluppate ed ingrossate (freccie) di Cerasuola Sciacca (barra 20µm).

Fig. 7 - *Cerasuola Sciacca* not developed and enlarged (arrows) microspores (scale bar 20µm).

ni minore (da 10 a 15 µm). Infine, l'analisi statistica non ha mostrato alcuna interazione significativa tra il fattore Cultivar e il fattore Trattamento. Infatti, per tutte le cultivar, eccetto che per la Cerasuola Sciacca, i valori più elevati sono stati ottenuti per le microspore sottoposte al trattamento "a freddo", seguite da quelle trattate "a caldo" ed infine da quelle non trattate (fig. 8).

Dopo 2-3 mesi di coltura, le microspore hanno cominciato a produrre un callo biancastro (fig. 9) che è stato poi trasferito sullo stesso mezzo usato per la coltura delle microspore, reso solido dall'aggiunta di agar, dove il callo si è sviluppato formando strutture proembrionali (fig. 10).

I risultati riportati in questo studio confermano quanto riferito da Zheng (2003) sull'importanza dello stress (termico o *starvation*), nell'induzione embriogenica delle microspore.

Nonostante non sia stato ancora possibile rigenerare plantule dalle strutture proembrionali e dal callo ottenuto dalle microspore, i risultati ottenuti in questo

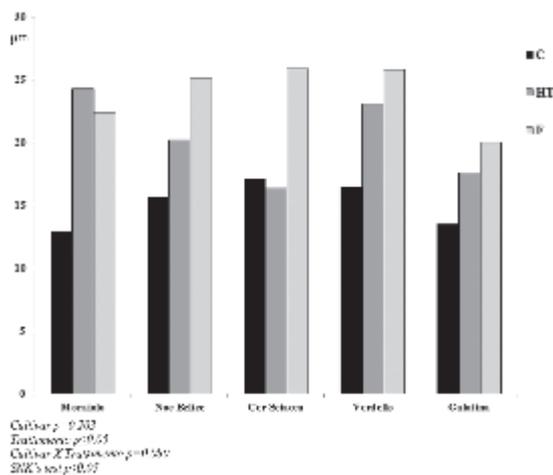


Fig. 8 - Effetto del trattamento «a caldo» e «a freddo» sul diametro delle microspore dopo 3 mesi di coltura *in vitro*.

Fig. 8 - Effect of cold and heat-treatments on the diameter of microspores after 3 months of *in vitro* culture.

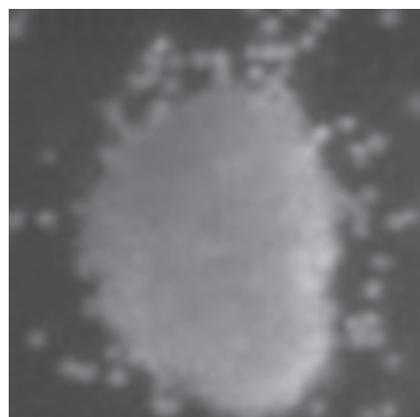


Fig. 9 - Callo ottenuto dopo due mesi di coltura *in vitro* di microspore isolate di Galatina

Fig. 9 - Callus obtained after two months of *in vitro* culture of Galatina microspore culture.

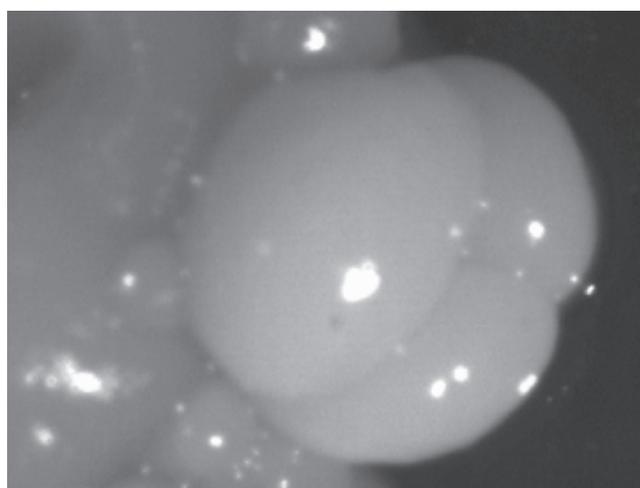


Fig. 10 - Embryoide ottenuto dopo 10 mesi di coltura di microspore isolate di Cerasuola Sciacca.

Fig. 10 - *Cerasuola Sciacca* embryoide developed after 10 months of isolated microspore of culture.

studio sono molto incoraggianti, poiché dimostrano che, sebbene l'olivo, come molte altre specie arboree, sia una specie recalcitrante all'embriogenesi gametica, shock termici sono in grado di indurre lo sviluppo sporofitico delle microspore.

### Conclusioni

Questo studio riporta i risultati preliminari della coltura di microspore isolate di alcune cultivar italiane di olivo. Le microspore sottoposte a trattamento termico (sia "a caldo" che "a freddo") hanno presentato un maggiore incremento di dimensioni rispetto al controllo. Grazie alle osservazioni al microscopio a fluorescenza è stato possibile monitorare sia lo sviluppo gametofitico che quello sporofitico delle microspore, con la formazione di strutture multinucleate. Inoltre, ad ulteriore conferma dell'efficacia del trattamento termico, dopo tre mesi di coltura, le microspore hanno

cominciato a produrre callo che trasferito su mezzo solido ha prodotto strutture proembrionali.

Al fine di aumentare l'efficienza induttiva del processo di embriogenesi gametica e di ottenere la rigenerazione di plantule derivate da polline, è necessario continuare ad approfondire gli studi sull'embriogenesi gametica da polline in olivo.

## Riassunto

Gli aploidi (piante con un numero gametofitico di cromosomi nello sporofito:  $n$  invece di  $2n$ ) ed i doppio-aploidi (aploidi che hanno raddoppiato il numero di cromosomi spontaneamente o in maniera indotta) trovano numerose applicazioni nel miglioramento genetico vegetale, ed in particolare, nella mutagenesi, nella selezione *in vitro*, nella trasformazione, nell'utilizzo della variabilità gametoclonale ed anche nel sequenziamento del genoma e negli studi di genomica funzionale. Pertanto, essi costituiscono uno strumento biotecnologico particolarmente interessante nel miglioramento genetico delle piante. Ai fini dell'ottenimento dell'omozigosi nell'olivo, come in tutte le piante arboree, caratterizzate da elevata eterozigosi, da un lungo periodo giovanile, da grandi dimensioni e spesso da autoincompatibilità, non vi è la possibilità di ricorrere a metodi tradizionali di miglioramento genetico, quali diverse generazioni di autoimpollinazione. L'embriogenesi gametica, rendendo possibile, in una sola fase, l'ottenimento dell'omozigosi da un genitore eterozigote, è sempre più oggetto di ricerca da parte dei *breeder*. Essa, infatti, consiste nella capacità dei gameti di modificare il loro sviluppo da gametofitico a sporofitico e può essere ottenuta tramite due strategie: la "ginogenesi", cioè tramite rigenerazione dal gamete femminile, e l'"embriogenesi da polline" cioè dal gamete maschile (tramite coltura *in vitro* di antere e di microspore isolate).

Nel presente studio sono riportati i risultati preliminari ottenuti dalla coltura *in vitro* di microspore isolate di diverse cultivar italiane di olivo.

**Parole chiave:** Coltura di microspore isolate, embriogenesi gametica, olivo, polline.

Lavoro frutto di una collaborazione tra il CSIC (Spagna) e l'Università degli Studi di Palermo (Italia) nell'ambito del progetto italiano CORI 2006 e della collaborazione tra il CNR (Italia) e il CSIC (Spagna) nell'ambito di Joint Project Spagnolo-Italiano CSIC-CNR 2008IT0046 "Embriogenesi gametica e somatica per il miglioramento genetico e la propagazione dell'olivo e di altre piante arboree mediterranee".

## Bibliografia

- BARANY I., GONZÁLEZ-MELENDE P., MITYKO J., FADÓN B., RISUEÑO M.C., TESTILLANO P.S., 2005. *Microspore-derived embryogenesis in Capsicum annuum: subcellular rearrangements through development*. Biol. Cell. 97: 709-722.
- BUENO M.A., PINTOS B., PRADO M.J., GOMEZ A., MANZANERA J.A., 2004. *Androgenesis: a tool for woody plant breeding*. Recent Res. Devel. Genet. Breed. 1: 365-383.
- BUENO M.A., PINTOS B., HOFER M., MARTIN A., 2005. *Pro-embryos induction from Olea europaea L. isolated microspore culture*. Acta Physiol Plant 27: 695-701.
- BUENO M.A., PINTOS B., MARTIN A., 2006. *Induction of embryogenesis via isolated microspore culture in Olea europaea L.* Olivebioteq 2006, Novembre, Mazara del Vallo, Marsala.
- GERMANÀ M.A., 2006. *Doubled haploid production in fruit crops*. Plant Cell Tiss Org Cult. 86: 131-145.
- GERMANÀ M.A., 2009. *Il miglioramento genetico degli agrumi: metodi tradizionali e innovativi*. Vacante V. e Calabrese F. (Eds). Il Sole 24 Ore Edagricole: 159-174.
- GERMANÀ M.A., 2011a. *Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding*. INVITED REVIEW for the special issue of Plant Cell Reports entitled: "Plant Biotechnology in support of the Millennium Development Goals" 30, Issue: 5, pp. 839 - 857.
- GERMANÀ M.A., 2011b. *Anther culture for haploid and doubled haploid production*. INVITED REVIEW for the special issue: "In Vitro Ploidy Manipulation in the Genomics Era". Plant Cell, Tissue and Organ Culture Volume 104, Number 3, 283-300, DOI: 10.1007/s11240-010-9852-z
- GERMANÀ M.A., CHIANCONE B., 2003. *Improvement of the anther culture protocol in Citrus clementina Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration*. Plant Cell Reports. 22: 181-187.
- KUMLEHN J., SERAZETDINOVA L., HENSEL G., BECKER D., LORZ H., 2006. *Genetic transformation of barley (Hordeum vulgare L.) via infection of androgenetic pollen cultures with Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotech. J. 4(2): 251-261.
- LAVEE S., 1992. *Evolution of cultivation techniques in olive growing*. In: Olive Oil Quality: 37-44.
- SOLÍS M.T., PINTOS B., PRADO M.J., BUENO M.A., RASKA I., RISUEÑO M.C., TESTILLANO P.S., 2008. *Early markers of in vitro microspore reprogramming to embryogenesis in 421 olive (Olea europaea L.)*. Plant Sci. 174: 597-605.
- ZHENG M., 2003. *Microspore culture in wheat (Triticum aestivum L.): doubled haploid production via induced embryogenesis*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 73: 213-230.

## Andamento stagionale del rapporto tra attività vegetativa e produttiva in rami fruttiferi di olivo

Farinelli D.<sup>1\*</sup>, Milhem H.<sup>1</sup>, Baldicchi A.<sup>1</sup>, Rosati A.<sup>2</sup> e Famiani F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

<sup>2</sup> Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), Spoleto (PG)

### Seasonal pattern of the relationship between vegetative and productive activities in olive fruiting shoots

**Abstract.** The balance between vegetative (new shoots + increasing diameter and mass of previous-year shoots) and productive (inflorescence/fruit) growth, throughout the growing season, has been studied in fruiting shoots of olive. The work was carried out in Central Italy (Umbria) in 2010, using 14-year-old Frantoio trees. Results indicated that the productive growth is largely prevalent during the whole growing season, except for a short time in June, during fruit set. This suggests that not only fruits, but also flowering represent significant costs for the plant. Considering the total (vegetative + productive) investments, the highest daily biomass allocation occurs during end of spring-early summer, and again at the end of summer.

**Key words:** *Olea europaea* L., inflorescence, shoot and fruit growth.

### Introduzione

L'olivo produce sui rami fruttiferi di un anno di età, la maggior parte dei quali genera degli allungamenti vegetativi in grado di produrre fiori e frutti nell'anno successivo.

E' noto che l'attività vegetativa e quella riproduttiva sono in competizione tra loro in olivo. Ad esempio, Rugini e Pannelli (1993) hanno trovato che la rimozione dei germogli in accrescimento o l'inibizione ormonale della loro crescita, aumentano l'allegagione. Altri lavori concludono che la competizione per le risorse caratterizza tutta la fase di crescita in olivo (Lavee et al., 1999), il che implica una competizione tra vegetazione e riproduzione. Questo si evince

anche osservando che l'olivo è una specie alternante (Hartmann, 1952; Lavee e Spiegel-Roy, 1967; Troncoso et al., 1978) e nell'anno di abbondante fioritura e fruttificazione lo sviluppo vegetativo è ridotto dalla competizione delle risorse, limitando la fruttificazione dell'anno seguente, così come la dimensione dei frutti dell'anno stesso (Suarez et al., 1984, Cuevas et al., 1994). Restano però molto limitate le conoscenze sui rapporti che si vengono a creare tra l'attività vegetativa e quella produttiva a livello dei singoli rami fruttiferi (Miljkovic et al., 2006). Il presente studio ha avuto lo scopo di caratterizzare l'andamento di tali rapporti durante l'intera stagione vegetativa in piante adulte di olivo.

### Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta nel 2010, in Centro Italia (Umbria), in un oliveto costituito da piante di 14 anni di età, della cultivar Frantoio, allevate a vaso e poste alla distanza di m 6×5. Gli alberi, potati con turno annuale, presentavano un buon equilibrio vegeto-produttivo. Al momento del germogliamento, sono stati cartellinati dei rami fruttiferi nella porzione mediana della chioma. Dopodiché è stato seguito il loro sviluppo, eseguendo rilievi riguardanti l'accrescimento diametrico dei rami cartellinati e quello in lunghezza e diametrico dei germogli sviluppati dagli stessi. Sugli stessi rami cartellinati, sono state contate le mignole e su queste è stata determinata l'allegagione e la successiva cascola di frutticini. Infine, periodicamente, sono stati prelevati campioni di rami fruttiferi simili a quelli cartellinati per quantificare la crescita in peso fresco e secco delle diverse componenti presenti (rami, germogli, mignole/frutti).

### Risultati

I rami fruttiferi, nei primi 60-70 giorni dopo il germogliamento, avvenuto nella seconda metà di aprile,

\* daniela.farinelli@unipg.it

hanno presentato un forte sviluppo diametrico che ha determinato un aumento in peso dell'asse legnoso (senza considerare le foglie) di oltre il 100% (pari ad un incremento in peso secco di circa 0,6 g/ramo), dopodichè non hanno evidenziato ulteriori significativi aumenti (fig. 1a). Le foglie hanno mantenuto un peso pressoché costante durante l'intera stagione vegetativa (dati non mostrati).

I germogli che si sono sviluppati all'apice dei rami hanno raggiunto a fine stagione una lunghezza di circa 25 cm, corrispondente ad un peso secco intorno a 2,5 g (asse + foglie), rappresentato in gran parte dalle foglie (fig. 1b, c).

L'attività vegetativa, misurata in termini di incremento di peso secco degli organi considerati (assi e

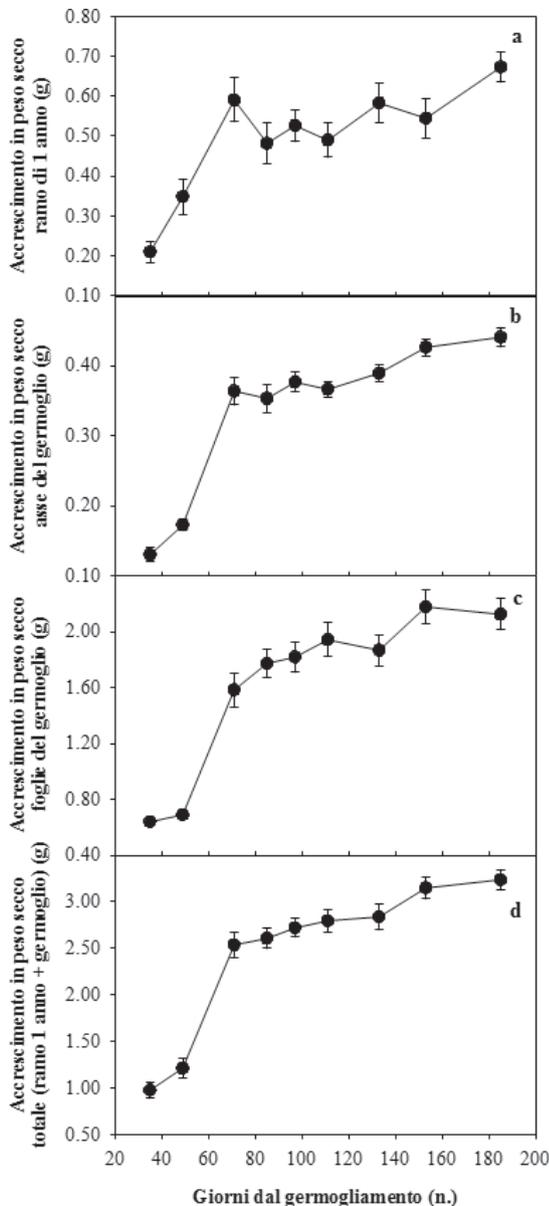


Fig. 1 - Accrescimento dei rami e dei germogli, in peso secco.  
 Fig. 1 - Growth of 1-year-old and current-season shoots, on a dry-weight basis.

foglie dei rami e dei germogli), si è concentrata nel periodo germogliamento - fine giugno (circa 80%) (fig. 1d).

L'attività produttiva, rappresentata dalle mignole e dai frutti, ha avuto incrementi molto elevati da dopo l'allegagione (pari a circa 1 frutto/mignola) a ottobre (circa l'85% del totale), con una breve stasi nel periodo estivo (fig. 2). I frutti alla raccolta, eseguita alla fine della prima decade di novembre, hanno presentato un peso medio intorno a 2 g ed un contenuto in olio, espresso rispetto al peso fresco, intorno al 25%. Durante il periodo estivo e la maturazione, la cascola di frutti è risultata limitata (fig. 3).

Confrontando l'attività vegetativa e quella produttiva dei rami fruttiferi risulta evidente la netta e grande prevalenza di quest'ultima (fig. 4). Nel periodo primaverile (dal germogliamento alla fioritura), anche le mignole hanno presentato una crescita, in termini di peso secco, maggiore degli organi vegetativi. Sommando le due attività, le maggiori allocazioni giornaliere di sostanza secca nei rami fruttiferi sono state evidenziate nei periodi fine primavera - inizio estate e fine estate (fig. 5).

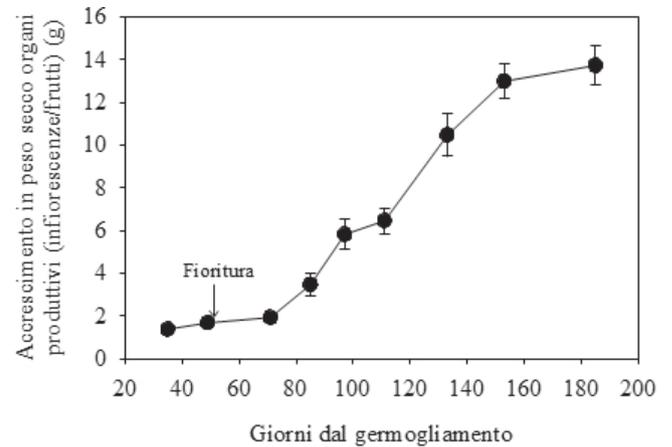


Fig. 2 - Accrescimento degli organi produttivi (mignola e frutto).  
 Fig. 2 - Growth of productive organs (inflorescence and fruit).

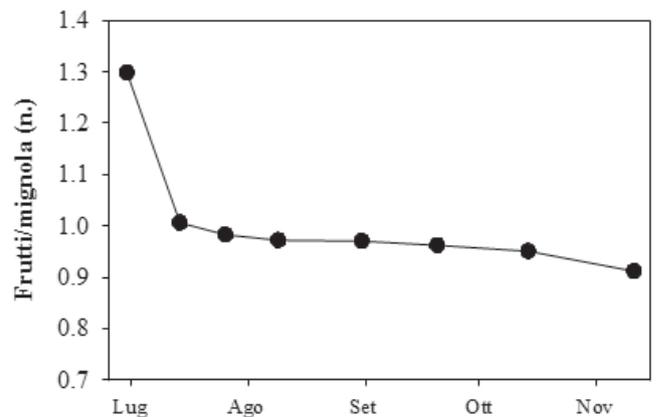


Fig. 3 - Allegagione e cascola dei frutti.  
 Fig. 3 - Fruit set and drop.

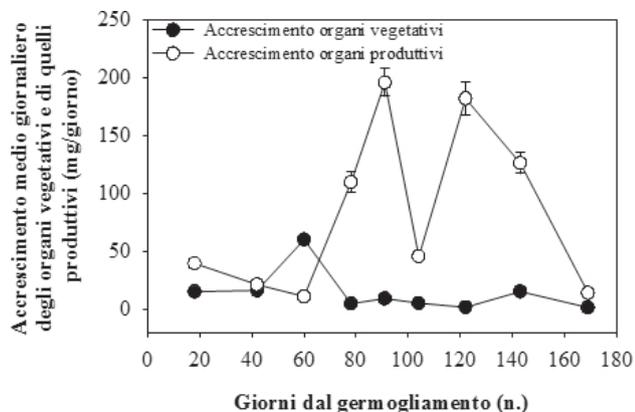


Fig. 4 - Confronto dell'attività vegetativa e quella produttiva nei rami fruttiferi.

Fig. 4 - Comparison between vegetative and productive activities in fruiting shoots.

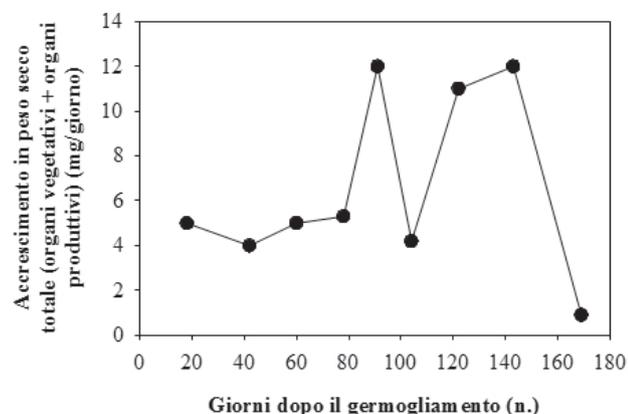


Fig. 5 - Attività vegetativa e riproduttiva complessiva dei rami fruttiferi.

Fig. 5 - Total vegetative and productive activities in fruiting shoots.

## Conclusioni

Nell'insieme, i risultati hanno mostrato che, durante la stagione vegetativa, nei rami fruttiferi l'attività produttiva è fortemente prevalente rispetto a quella vegetativa (circa 13,7 g di sostanza secca allocati negli organi produttivi - pari all'81% del totale - contro circa 3,2 g allocati in quelli vegetativi - pari al 19% del totale). Quest'ultima, prevale su quella produttiva solo in giugno, indicando che anche l'accrescimento delle mignole, che avviene dal germogliamento alla fioritura (fine maggio), rappresenta un costo energetico significativo per la pianta. Le maggiori allocazioni giornaliere di sostanza secca nei rami fruttiferi si hanno nei periodi fine primavera- inizio estate e fine estate.

## Riassunto

Nel presente lavoro è stato caratterizzato l'equilibrio durante la stagione vegetativa tra l'attività vegetativa e quella produttiva in rami fruttiferi di olivo. L'indagine è stata condotta, nel 2010, in centro Italia (Umbria), in un oliveto costituito da piante di 14 anni di età della cultivar Frantoio. I risultati hanno evidenziato che, durante la stagione vegetativa, nei rami fruttiferi l'attività produttiva (crescita di mignole e frutti) è fortemente prevalente rispetto a quella vegetativa (accrescimento diametrico dei rami fruttiferi e sviluppo dei germogli). Quest'ultima prevale su quella produttiva solo nel mese di giugno, indicando che anche l'accrescimento delle mignole, che avviene fino alla fioritura (fine maggio), rappresenta un costo energetico significativo per la pianta. Le maggiori allocazioni giornaliere di sostanza secca nei rami fruttiferi si hanno nei periodi fine primavera - inizio estate e fine estate.

**Parole chiave:** *Olea europea* L., accrescimento mignole, germogli, rami e frutti.

## Bibliografia

- CUEVAS J., RALLO L., RAPOPORT H.F., 1994. *Crop load effects on floral quality in olive*. Sci. Hortic. 59: 123-130.
- HARTMANN H.T., 1952. *Spray thinning of Olives*. California Agric. 6: 7.
- MILJKOVIC I., 2006. *Research on the growth dynamics of fruits and shoots, and mineral content of olive leaves under the ecological conditions of Istria*. Polomologica Croatica, 12: 75-86.
- LAVEE S., RALLO L., RAPOPORT H.F., TRONCOSO A., 1999. *The floral biology of the olive II. The effect of inflorescence load and distribution per shoot on fruit set and load*. Sci. Hortic. 82: 181-192.
- LAVEE S., SPIEGEL-ROY, P., 1967. *The effect of time of application of two growth substances of the thinning olive fruits*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 91: 180-186.
- SUAREZ M.P., FERNANDEZ-ESCOBAR R., RALLO L., 1984. *Competition among fruits in olive II. Influence of inflorescence or fruit thinning and cross-pollination on fruit set components and crop efficiency*. Acta Hortic. 149: 131-144.
- RUGINI E., PANNELLI G., 1993. *Preliminary results on increasing fruit set in olive (Olea europaea L.) by chemical and mechanical treatments*. Acta Hortic. 329: 209-210.
- TRONCOSO, A., PRIETO J., LIÑAN, J., 1978. *Aclareo químico de frutos en el olivar Manzanillo de Sevilla*. An. Edaf. Agrob. 37: 882-893.

## Caratteristiche delle drupe nelle forme selvatiche di olivo

Mulas M.<sup>1\*</sup>, Dessena L.<sup>2</sup>, Bandino G.<sup>3</sup> e Sedda P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio, Università di Sassari

<sup>2</sup>Borsista della Regione Autonoma della Sardegna

<sup>3</sup>Dipartimento per la Ricerca nella Arboricoltura di AGRIS - Sardegna

### Fruit characters of wild olive selections

**Abstract.** Oleaster (*Olea europaea* var. *oleaster* Hoffgg et Link) spreads in Sardinia showing a high phenotypic variability. Many researches have been carried out to obtain the selection of a population of clones actually studied for their primary characterization. Therefore, the objective of this work is to contribute to the characterization of wild olive selections by fruit size measurements, followed by some chemical and physical analysis, like lipid and polyphenols content of the pulp, in order to identify valuable selections in which these characters are positively represented. Fruit length was comprised between 1.58 and 1.02 cm and width between 1.08 and 0.70 cm. Average fruit weight ranged from 1.06 to 0.31 g, while stone weight was between 0.41 and 0.10 g. Pulp/stone ratio was comprised between 1.50 and 0.50. Pulp acidity ranged from 3.89% with the clone olb3a to 0.95% with vlr10. Lipid content was between 11% and 2,4%, while polyphenols was between 3199 and 396 mg/kg.

**Key words:** *Olea europaea* var. *oleaster*, oleaster, fruit, lipids, polyphenols.

### Introduzione

L'oleastro (*Olea europaea* var. *oleaster* Hoffgg et Link) è la forma ancestrale da cui deriverebbe l'olivo coltivato. Non tutti gli autori sono concordi sull'origine dell'oleastro, alcuni sostengono che l'oleastro sia comunque una forma rinselvaticata dell'olivo domestico e anche la sola forma che originariamente si è diffusa nel Mediterraneo (Caruso, 1882; Morettini, 1972). La sua diffusione in Sardegna e l'ampia variabilità fenotipica reperibile, hanno giustificato la realizzazione di numerosi studi nel corso degli anni (Mulas, 1999; Mulas *et al.*, 2001; 2002). Da un punto di vista scientifico, inoltre, le singole accessioni pos-

sono essere viste come sorgente potenziale di materiale genetico utilizzabile per trasmettere determinati caratteri di produzione, resistenza o tolleranza in nuovi genotipi prodotti dall'attività di miglioramento genetico. Questo porta alla necessità di catalogare, classificare ed identificare quante più selezioni possibili, al fine di conservare e salvaguardare tutto il patrimonio genetico esistente.

La salvaguardia del germoplasma delle specie selvatiche, quindi, gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della biodiversità e nella riduzione dell'erosione genetica, sempre più forte, specialmente negli ultimi anni (Mulas, 2011).

A tal fine, questo lavoro contribuisce alla caratterizzazione delle selezioni clonali ottenute da popolazioni spontanee di oleastro della Sardegna attraverso lo studio della biometria delle drupe, seguito da varie analisi chimico fisiche sulla polpa delle stesse, al fine di individuare caratteri pregevoli e selezionare varietà in cui tali caratteri siano ben rappresentati e possano essere impiegati nel miglioramento genetico delle varietà coltivate.

### Materiali e metodi

Il materiale vegetale analizzato nella prova è stato prelevato dalle diverse accessioni di oleastro collezionate nel campo sperimentale del Dipartimento di Economia e Sistemi Arborei di Sassari, sito a Fenosu (OR) e impiantato nel 1998. Il campo è costituito da 25 selezioni derivanti dalla propagazione agamica di piante di oleastro selezionate dalla flora spontanea e rappresentative della variabilità intrapopolazione.

Da oltre dieci anni sui diversi cloni sono state svolte ulteriori osservazioni per lo studio della morfologia delle piante di ciascuna selezione, del loro comportamento fenologico, dell'attività cambiale nel corso della stagione e della generale attitudine a essere allevate secondo i modelli dell'arboricoltura da legno (Mulas *et al.*, 2004; 2011).

Questa ricerca, invece, contribuisce alla caratterizzazione delle selezioni di oleastro attraverso lo studio della biometria delle drupe.

\*mmulas@uniss.it

I campionamenti dei frutti sono stati effettuati nella prima metà di novembre 2010. È stata osservata una generale scarsità di produzione su quasi tutte le piante del campo e nei diversi cloni, presumibilmente dovuta a diversi fattori quali l'annata di scarica e la fittezza dell'impianto. Le drupe sono state prelevate da 39 piante appartenenti a 13 cloni, gli unici a fornire una produzione significativa.

Sulle drupe, oltre ad analisi biometriche, sono state svolte analisi chimico fisiche. Le analisi biometriche sono state eseguite seguendo la metodologia per la caratterizzazione primaria elaborata dalla FAO (Bandino *et al.*, 2001). Le osservazioni sui frutti hanno riguardato un campione di 1 kg di drupe raccolte su tutta la superficie della chioma, quando queste erano prossime alla maturazione.

I descrittori studiati sono stati il peso medio della drupa, il volume, la larghezza, la lunghezza, la percentuale in polpa, il rapporto polpa/nocciolo, l'acidità della polpa (% acido oleico), il contenuto di lipidi (%) e i polifenoli totali.

Il materiale derivante dallo snocciolamento e dalla pulizia del nocciolo è stato macinato fino ad ottenere una pasta dalla quale successivamente è stata estratta la materia grassa. Per l'estrazione è stato utilizzato il metodo Soxlet. I polifenoli sono stati determinati per via spettrofotometrica dopo estrazione in metanolo acidificato e reazione con la soluzione di Folin-Ciocalteu.

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza per mezzo del software MSTAT-C e la separazione delle medie è stata ottenuta tramite applicazione del Multiple Range Test di Duncan.

## Risultati e discussione

Per quanto riguarda le prime analisi effettuate sulle drupe emerge una lunghezza media del frutto di 1,28 cm (fig. 1a). Le lunghezze maggiori sono state osservate nei frutti relativi ai cloni vlr8 (1,58 cm) e vlr10 (1,58 cm). I valori minori sono stati registrati sui cloni pau3s (1,02 cm) e vil12 (1,14 cm). Le misurazioni effettuate sulla larghezza della drupa mostrano un andamento non molto discordante variando tra 0,7 e 0,8 cm ad eccezione dei cloni vlr10 e vlr8, che hanno fatto registrare larghezza del frutto pari a 1,08 e del clone pau3s che mostra un valore minimo di 0,70 cm (fig. 1b).

Il peso fresco medio delle drupe è risultato pari a 0,57 g. Il peso più elevato è stato riscontrato nei cloni vlr8 e vlr10 che hanno fatto riscontrare rispettivamente i valori di 1,06 g e 1,05 g (fig. 2a). Il peso fresco minore è da attribuirsi al clone pau3s (0,31g). Per

quanto riguarda il peso del nocciolo il clone lac24 ha presentato pesi del nocciolo inferiori rispetto a tutti i cloni e quindi un contenuto percentuale in polpa superiore (fig. 2b). Nel complesso i pesi dei noccioli sono

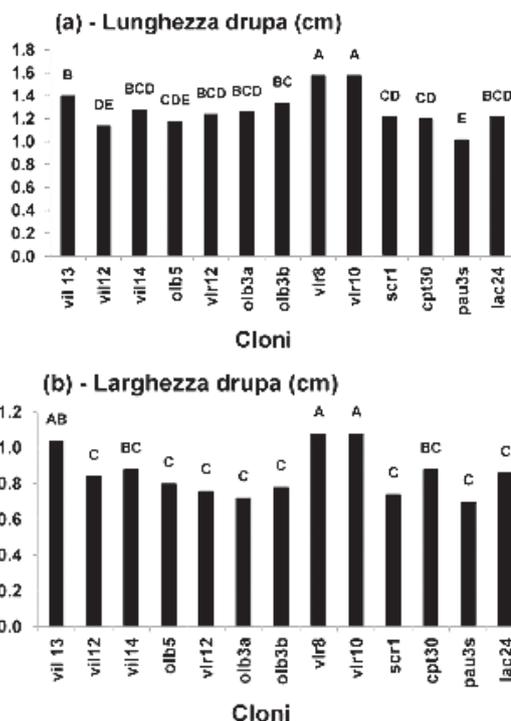


Fig. 1 - Lunghezza (a) e larghezza (b) delle drupe nei cloni di oleastro ( $p \leq 0,01$ ).

Fig. 1 - Fruit length (a) and width (b) in oleaster clones ( $p \leq 0.01$ ).

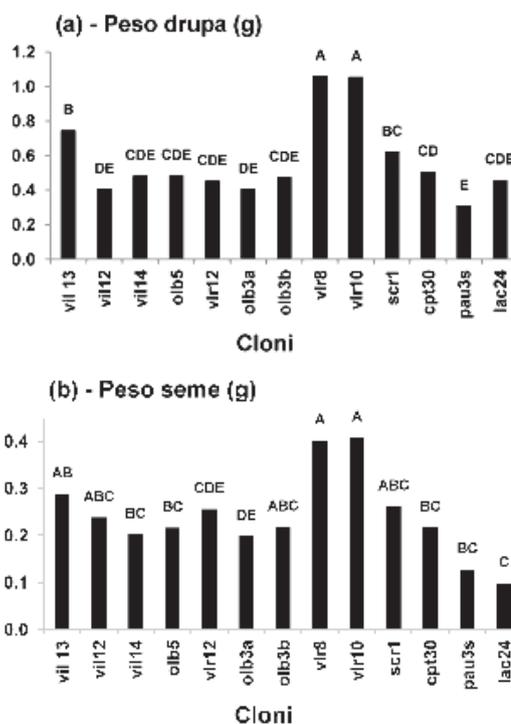


Fig. 2 - Peso fresco delle drupe (a) e dei semi (b) nei cloni di oleastro ( $p \leq 0,01$ ).

Fig. 2 - Fruit (a) and seed (b) fresh weight in oleaster clones ( $p \leq 0.01$ ).

risultati compresi tra un massimo di 0,41 g (vlr10) e un minimo di 0,1 g (lac24).

La percentuale in polpa fresca era compresa tra un valore massimo di 43,88 % (vlr8) e un valore minimo di 27,27 % (vil14), mentre il valore medio era pari a 35,65 %. Il rapporto polpa nocciolo è da considerarsi basso in quanto aveva un valore nettamente inferiore a 4, con un massimo di 1,4 raggiunto dal clone lac24 ed un minimo di 0,5 del vlr12 (fig. 3a). I valori del residuo secco della polpa si aggiravano intorno al 30% con valori massimi del 41,35% raggiunti dal clone olb3b e un minimo raggiunto dal clone olb5 di 28,47%. Il pH della polpa era compreso tra 5,94 (lac24) e 4,88 (olb3a). L'acidità della polpa è risultata molto variabile nei diversi cloni raggiungendo un valore massimo di 3,89% col clone olb3a e un minimo di 0,95% con vlr10 (fig. 3b).

Per quanto riguarda le analisi effettuate sulla pasta ottenuta dallo snocciolamento delle drupe, il contenuto di lipidi è risultato basso per la maggior parte dei cloni e si attestava intorno al 5,5% (fig 4a). Differentemente dal resto degli altri campioni, il clone vlr8 ha fatto registrare un contenuto di lipidi dell'11%. Le concentrazioni minime di lipidi sono state osservate nel clone vil14 (2,4%). Il contenuto in polifenoli nelle drupe di oleastro, paragonato a quello riscontrabile nelle drupe di olivo, è risultato abbastanza elevato (fig. 4b). I campioni hanno presentato un'e-

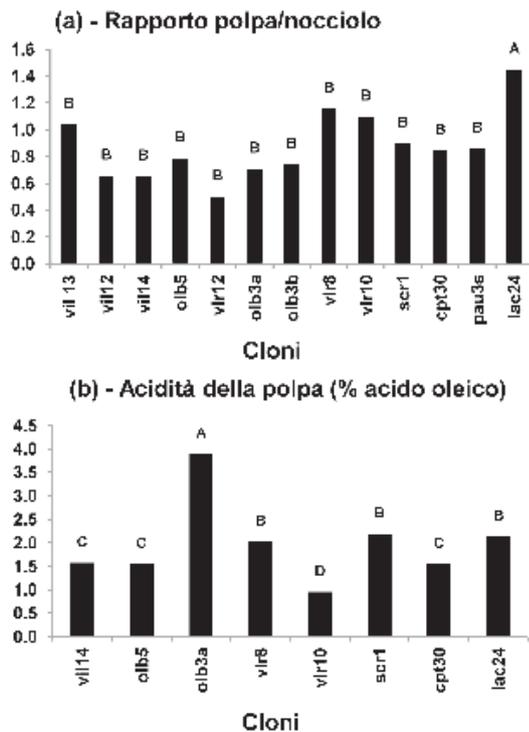


Fig. 3 - Rapporto polpa/nocciolo e acidità della polpa delle drupe dei cloni di oleastro ( $p \leq 0,01$ ).  
Fig. 3 - Pulp/stone ratio (a) and pulp acidity (b) in oleaster fruits ( $p \leq 0.01$ ).

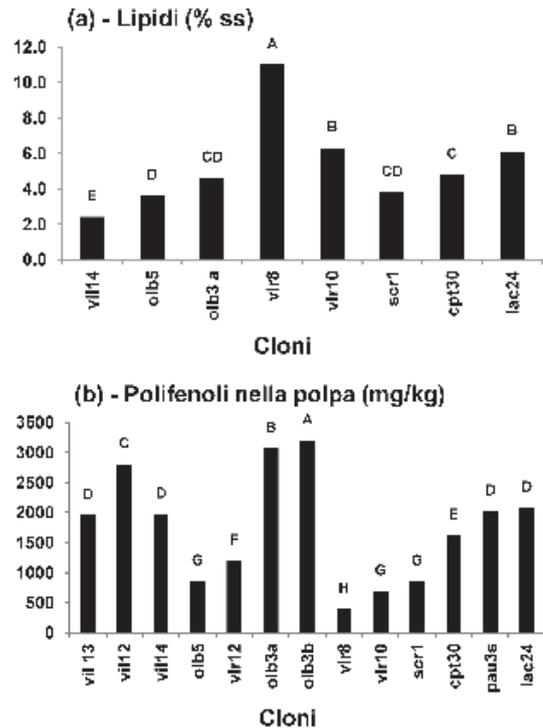


Fig. 4 - Percentuale di lipidi (a) e contenuto di polifenoli (b) nelle drupe dei cloni di oleastro ( $p \leq 0,01$ ).

Fig. 4 - Lipid (a) and polyphenol (b) content of the pulp of the fruit of oleaster ( $p \leq 0.01$ ).

levata variabilità nella concentrazione di polifenoli. Il valore massimo è stato raggiunto dal clone olb3b: 3.199 mg/kg. Può essere considerato alto il valore raggiunto anche da olb3a e vil12, rispettivamente 3.070 mg/kg e 2.805 mg/kg. Il minimo di 396 mg/kg è stato rilevato sulle drupe del clone vlr8.

## Conclusioni

L'analisi morfologica e biometrica dei diversi organi delle piante reperite nel territorio ha messo in evidenza la grande variabilità fenotipica delle popolazioni studiate, la disponibilità di caratteri sicuramente utili alle finalità della selezione, nonché alcuni caratteri che possono essere considerati anche discriminanti tra forme selvatiche e coltivate. Le dimensioni delle drupe, ad esempio, sono sicuramente caratteristiche delle forme selvatiche, essendo assai rare olive con peso dei frutti inferiori ad 1 g, mentre tali dimensioni sono la norma tra le forme selvatiche. Il basso contenuto di lipidi è abbastanza ricorrente nelle forme selvatiche, che in genere hanno una maturazione e conseguente inoleizione piuttosto tardive, anche fino a maggio inoltrato, con sovrapposizione rispetto alla fioritura.

La variabilità del contenuto di polifenoli nella polpa dei frutti è un dato importante che consente di poter avere una riserva di variabilità per questo carat-

tere associabile alla qualità gustativa dell'olio e alle sue proprietà antiossidanti.

Bisogna infine ricordare che il continuo flusso genico tra le forme selvatiche e domestiche oltre agli ancora ricorrenti fenomeni di disturbo antropico (incendi e pascolo), possono condurre ad una ulteriore lenta e costante erosione del pool genetico delle forme selvatiche della specie, per cui è necessario definire ed adottare con urgenza opportune misure per la salvaguardia di questa preziosa risorsa.

### Riassunto

La diffusione in Sardegna dell'oleastro (*Olea europaea* var. *oleaster* Hoffgg et Link) e l'ampia variabilità fenotipica reperibile, hanno giustificato la realizzazione di diverse ricerche che hanno portato alla raccolta di una popolazione di cloni su cui vengono effettuati studi di caratterizzazione primaria. L'obiettivo di questo lavoro è pertanto contribuire alla caratterizzazione delle selezioni attraverso il rilievo della biometria delle drupe, seguito da varie analisi chimico fisiche al fine di individuare caratteri pregevoli, come il contenuto di lipidi e polifenoli della polpa, e selezioni in cui tali caratteri siano ben rappresentati. La lunghezza media delle drupe era comprese tra 1,58 e 1,02 cm e la larghezza tra 1,08 e 0,70 cm. Il peso medio delle drupe era compreso tra 1,06 e 0,31 g, mentre quello dei noccioli era tra 0,41 e 0,10 g. Il rapporto polpa/nocciolo era tra 1,50 e 0,50. L'acidità della polpa presentava valori molto variabili raggiun-

gendo un valore massimo di 3,89% col clone olb3a e scendendo fino ad un minimo di 0,95% con vlr10. Il contenuto di lipidi era generalmente basso per la maggior parte dei cloni e si attestano tra il massimo di 11% e il minimo pari al 2,4%. Il contenuto di polifenoli era tra 3199 e 396 mg/kg.

**Parole chiave:** *Olea europaea* var. *oleaster*, oleastro, frutto, lipidi, polifenoli.

### Bibliografia

- BANDINO G., MULAS M., SEDDA P., MORO C., 2001 - *Le varietà di olivo della Sardegna*. Consorzio Interprovinciale per la Frutticoltura, Cagliari: 253.
- CARUSO G., 1882. - *Monografia dell'olivo*. Enciclopedia Agraria Italiana. UTET: 501-565.
- MORETTINI A., 1971 - *Olive da tavola*. REDA, Roma: pp. 110.
- MULAS M., 1999 - *Characterisation of olive wild ecotypes*. Acta Horticulturae, 474: 121-124.
- MULAS M., 2011 - *Study, collection and characterization of oleaster genetic resources* Acta Horticulturae, (in corso di stampa)
- MULAS M., CAULI E., FRANCESCONI A.H.D., 2001 - *Valorizzazione delle forme selvatiche di Olea europaea L. per gli usi forestali della specie*. Monti e Boschi, LII(2): 47-54.
- MULAS M., CAULI E., FRANCESCONI A.H.D., 2002 - *Advances in the study of wild olive genetic resources*. Acta Horticulturae, 586: 121-124.
- MULAS M., FADDA A., CAULI E., 2004. - *Prime osservazioni su cloni di oleastro (Olea europaea var. sylvestris Hoffmk et Link) selezionati per l'utilizzo forestale*. Italus Hortus, 11(4): 214-217.
- MULAS M., MURA G., DESSENA L., BANDINO G., SEDDA P., 2011 - *L'oleastro come potenziale riserva di geni agronomicamente utili*. Acta Italus Hortus, 1: 91-93.

# Caratterizzazione carpologica e bio-agronomica di nuovi genotipi di olivo ottenuti da incrocio programmato

Bartolini S.<sup>1\*</sup>, Andreini L.<sup>1</sup> e Guerriero R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

<sup>2</sup> Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose 'G. Scaramuzzi', Università di Pisa

## Characterization of new olive genotypes obtained by cross-breeding

**Abstract.** A topic of breeding program, carried out in Tuscany at the Department of Fruit Science and Plant Protection of Woody Species 'G. Scaramuzzi' (DCDSL), University of Pisa (Italy) in collaboration with Sant'Anna School of Advanced Studies (SSSA) of Pisa (Italy), aimed to improve the size of the 'Leccino' olives and, at the same time, to obtain cultivars more suitable to the climatic conditions of the Tyrrhenian coastal areas. For this purpose, 'Leccino' was crossed with 'Konservolia', a Greek table olive cultivar. From the progenies named 'LeKo', stood out three genotypes 'Leko 4', 'Leko 5' and 'Leko 6' for their interesting fruit traits and productivity. In particular, these genotypes have high fruit weight, excellent pulp/pit ratio and other features similar to those of the parent 'Konservolia'.

**Key words:** *Olea europea* L., olive breeding, Leccino, Konservolia, table olive.

## Introduzione

In Toscana il comparto produttivo delle olive da mensa è sempre stato molto carente. Tenendo in considerazione tale presupposto e nel tentativo di contribuire ad uno sviluppo del settore, nell'ambito delle attività sul miglioramento genetico dell'olivo intraprese dal 1980 presso il Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose 'G. Scaramuzzi' dell'Università di Pisa, sono state realizzate combinazioni di incrocio allo scopo di ottenere genotipi particolarmente adatti agli areali tirrenici, con caratteristiche pomologiche idonee ad una destinazione del frutto per la mensa. È stato intrapreso perciò un programma di breeding in cui la cultivar toscana 'Leccino' è stata incrociata con la 'Konservolia', nota cultivar greca da tavola di particolare interesse per la qualità dei frutti e per l'ampia adattabilità ambientale (COI, 2000). Da

tale incrocio è stata ottenuta un'ampia progenie dalla cui valutazione sono emersi alcuni genotipi dotati di interessanti caratteristiche (Bartolini *et al.*, 2006). In particolare, tre denominati con le sigle 'Leko 4', 'Leko 5' e 'Leko 6' sono stati ritenuti meritevoli di ulteriori osservazioni e, nel presente lavoro, vengono riportate le descrizioni dei caratteri carpologici, morfologici e bio-agronomici di questi tre nuovi genotipi.

## Materiali e metodi

Le osservazioni degli ultimi cinque anni sono state condotte su piante in piena produzione, ubicate presso i campi sperimentali del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose dell'Università di Pisa siti nella pianura costiera tirrenica in provincia di Livorno (lat. 43°02 N, long. 10°36 E). I genotipi sono stati caratterizzati utilizzando alcuni dei parametri descrittivi riportati nella scheda UPOV (Union International pour la Protection des Obtentions Vegetales). Sui campioni prelevati da tutta la chioma delle piante in osservazione, sono stati determinati:

- i caratteri biometrici del frutto e dell'endocarpo (peso, diametro polare ed equatoriale e relativi rapporti), delle foglie (lunghezza, larghezza e relativi rapporti) e delle infiorescenze (lunghezza, numero di fiori, entità dell'aborto dell'ovario);
- il comportamento agronomico-produttivo, determinando, in particolare: il grado di infestazione da *Bactrocera oleae* Gmel.; il contenuto lipidico percentuale mediante Soxhlet; il grado di auto-compatibilità, sia con le classiche prove di pieno campo sia con le osservazioni *in vivo* (Bartolini e Andreini, 2011).

## Risultati e discussione

Nelle tabelle 1 e 2 vengono riportati i caratteri carpologici delle drupe e dell'endocarpo relativi ai genotipi selezionati, 'Leko 4', 'Leko 5' e 'Leko 6', ed ai genitori. I genotipi hanno mostrato caratteristiche migliorate rispetto al 'Leccino' (Cimato *et al.*, 1997), risultando più conformi, per peso unitario e dimensio-

\* susanna.bartolini@sssup.it

Tab. 1 - Caratteri delle drupe dei genotipi Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' e dei genitori, cultivar 'Leccino' (Cimato et al., 1997) e 'Konservolia' (COI, 2000). Valori medi  $\pm$  ES.

Tab. 1 - Fruit characters of 'Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' genotypes and their parents, 'Leccino' and 'Konservolia' cultivars. Mean values  $\pm$  SE.

Parametri	Leko 4	Leko 5	Leko 6	Leccino	Konservolia
Peso 100 drupe (g)	498	623	510	250	400-600
Diametro polare (mm)	25,23 $\pm$ 0,27	27,73 $\pm$ 0,32	23,78 $\pm$ 0,35	20,0	
Diametro trasv. (mm)	20,35 $\pm$ 0,29	23,25 $\pm$ 0,30	19,53 $\pm$ 0,32	14,4	
Rapporto diametrico	1,24 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,01	1,44	1,25-1,45
Polpa (%)	89,3	91,2	91,0	83,4	91,0
Resa in olio (%)	13,1	8,8	15,2	20	16
Colore alla raccolta	nero-violaceo	nero-violaceo	nero-violaceo	nero-violaceo	nero cupo
Invaiaura	media	precoce	precoce	precoce	media
Forma	ellissoidale	rotonda-ovale	ovale	ellissoidale	rotonda-ovale
Simmetria	leggermente asimmetrico	leggermente asimmetrico	leggermente asimmetrico	leggermente asimmetrico	simmetrico
Posizione diam. max.	centrale	medio-basale	centrale	centrale	centrale
Dimensione	medio-grande	medio-grande	medio-grande	media	medio-grande
Apice	appuntito,obliquo	appuntito	appuntito	arrotondato	appuntito
Base	arrotondata	arrotondata	rastremata	appiattita	rastremata
Cavità peduncolare	profonda	larga e profonda	profonda	circolare e profonda	
Epicarpo	grandi lenticelle	poche e piccole lenticelle	poche e piccole lenticelle	pruinoso, molte lenticelle	molte e piccole lenticelle

Tab. 2 - Caratteri dell'endocarpo dei genotipi Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' e dei genitori, cultivar 'Leccino' (Cimato et al., 1997) e 'Konservolia' (COI, 2000). Valori medi  $\pm$  ES.

Tab. 2 - Stone characters of 'Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' genotypes and their parents, 'Leccino' and 'Konservolia' cultivars. Mean values  $\pm$  SE.

Parametri	Leko 4	Leko 5	Leko 6	Leccino	Konservolia
Peso 100 noccioli (g)	66,5	73,17	58,9	41	45
Diametro polare (mm)	16,19 $\pm$ 0,18	17,63 $\pm$ 0,37	15,52 $\pm$ 0,23	15,95	
Diametro trasv. (mm)	8,28 $\pm$ 0,09	8,58 $\pm$ 0,18	8,29 $\pm$ 0,14	6,62	
Rapporto diametrico	1,96 $\pm$ 0,03	2,06 $\pm$ 0,05	1,88 $\pm$ 0,03	2,16	1,8-2,2
Forma	ellissoidale	elliss. allungata	ellissoidale	ellissoidale	ellissoidale
Simmetria	legg. asimmetrico	legg. asimmetrico	legg. asimmetrico	asimmetrico	legg. asimmetrico
Posizione diam. max	centrale-apicale	centrale-apicale	centrale	centrale-apicale	centrale
Superficie	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa
Solchi fibrovascolari	molto numerosi	molto numerosi	molto numerosi	mediam. numerosi	mediam. numerosi
Andamento solchi f.	longitudinale	longitudinale	longitudinale	longitudinale	longitudinale
Profondità solchi f.	elevata	elevata	elevata	media	media
Forma della base	troncata	arrotondata	arrotondata	rastremata	arrotondata
Forma dell'apice	appuntita	appuntita	appuntita	arrotondata	appuntita
Terminazione apice	rostro breve	rostro pronunc.	rostro breve	rostro obliquo	

ni, a quelli della 'Konservolia' (COI, 2000). 'Leko 5' si è distinto, in particolare, per il peso più elevato del frutto, mediamente intorno ai 6 g, per la forma più tendenzialmente arrotondata (*heart-shaped*) e per la presenza di un corto mucrone. Nelle annate con meno carica i frutti hanno raggiunto anche gli 8 g di peso unitario. Anche per quanto riguarda l'endocarpo, i tre genotipi hanno evidenziato caratteri più simili a quelli della 'Konservolia' con forma ellittica, apice appuntito e presenza di un prominente rostro. Buono è risultato il rapporto polpa/nocciolo, con percentuali di polpa intorno al 90%.

La resa in olio è risultata piuttosto contenuta, con

percentuali che non hanno superato il 15%. Il 'Leko 5' è stato il genotipo dove si è registrato il valore più basso, intorno al 9%. Relativamente alla suscettibilità alla mosca olearia *Bactrocera oleae* Gmel., in annate in cui si è verificata un'alta incidenza di attacco, nel 'Leko 4' e nel 'Leko 6' si sono avute trascurabili percentuali di frutti danneggiati che non hanno superato il 10%. Nel 'Leko 5', invece, il 60% circa dei frutti sono risultati attaccati

Per quanto riguarda le caratteristiche delle foglie, la differenza più saliente è da registrare per il 'Leko 4', genotipo caratterizzato da foglie più piccole sia rispetto ai genitori che alle altre accessioni (tab. 3).

Tab. 3 - Principali caratteri delle foglie dei genotipi Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' e dei genitori, cultivar 'Leccino' (Cimato *et al.*, 1997) e 'Konservolia' (COI, 2000). Valori medi  $\pm$  ES.

Tab. 3 - Main leaf characters of 'Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' and their parents 'Leccino' and 'Konservolia' cultivars. Mean values  $\pm$  SE.

Parametri	Leko 4	Leko 5	Leko 6	Leccino	Konservolia
Lunghezza (mm)	60,50 $\pm$ 5,9	69,13 $\pm$ 7,9	66,05 $\pm$ 5,6	69,13 $\pm$ 6,7	70,38 $\pm$ 9,7
Larghezza (mm)	14,75 $\pm$ 1,7	14,08 $\pm$ 1,4	13,18 $\pm$ 1,7	15,53 $\pm$ 1,8	17,80 $\pm$ 2,8
Rapporto diametrico	4,15 $\pm$ 0,5	4,96 $\pm$ 0,7	5,09 $\pm$ 0,7	4,50 $\pm$ 0,5	4,01 $\pm$ 0,5

Tab. 4 - Principali caratteri delle infiorescenze dei genotipi Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' e dei genitori, cultivar 'Leccino' (Cimato *et al.*, 1997) e 'Konservolia' (COI, 2000). Valori medi  $\pm$  ES.

Tab. 4 - Main inflorescence characters of 'Leko 4', 'Leko 5', 'Leko 6' and their parents, 'Leccino' and 'Konservolia' cultivars. Mean values  $\pm$  SE.

Parametri	Leko 4	Leko 5	Leko 6	Leccino	Konservolia
Lunghezza (mm)	23,94 $\pm$ 5,1	25,28 $\pm$ 4,9	23,59 $\pm$ 3,9	28,30 $\pm$ 5,6	24,94 $\pm$ 5,7
Fiori (N°)	10,04 $\pm$ 2,3	10,68 $\pm$ 2,6	11,19 $\pm$ 3,1	17,59 $\pm$ 4,4	11,13 $\pm$ 3,8
Aborto ov. (%)	12,8	10,2	16,3	9,9	13,9

Analizzando i caratteri delle infiorescenze, tutti e tre i genotipi hanno dimensione e densità di fiori più simili alla 'Konservolia' e, quindi, più corte e con un minor numero di fiori rispetto al 'Leccino' (tab. 4).

Attraverso i test utilizzati per saggiare il grado di compatibilità pollinica in seguito ad autoimpollinazione, analizzando sia il tasso di fruttificazione sia lo sviluppo dei tubetti pollinici *in vivo*, è emerso come nel 'Leko 5' si sia verificata una perfetta corrispondenza tra fruttificazione e capacità fecondativa. Il polline è regolarmente germinato ed i tubetti pollinici hanno raggiunto gli ovuli ed in pieno campo è stato registrato un tasso di fruttificazione tra l'1.5 ed il 2%. In generale, non sono stati osservati fenomeni ascrivibili ad una incompatibilità gametofitica (Ascher, 1976) ed anche nel 'Leko 4' e 'Leko 6' i tubetti pollinici sono stati capaci di raggiungere l'ovulo anche se il tasso di fruttificazione è stato di entità trascurabile, similmente a quanto rilevato in precedenti ricerche (Bartolini e Andreini, 2011).

## Conclusioni

I genotipi 'Leko 4', 'Leko 5' e 'Leko 6' hanno dimostrato di possedere alcuni caratteri morfologici più simili al genitore 'Konservolia'. In particolare le drupe, come calibro e peso unitario, risultano migliorate rispetto al 'Leccino' che, nel caso del 'Leko 5' possono raggiungere gli 8 grammi. Pertanto, in considerazione delle caratteristiche del frutto (pezzatura media, elevato rapporto polpa/nocciolo, bassa resa in olio) questi genotipi potrebbero essere utilizzati come olive da mensa.

## Riassunto

Una tematica del miglioramento genetico dell'olivo, intrapreso per lunghi anni presso il Dipartimento

di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose 'G. Scaramuzzi' dell'Università di Pisa, ha riguardato l'ottenimento di genotipi con caratteristiche pomologiche idonee ad una destinazione come frutto da mensa. A tale scopo, fu programmata una combinazione di incrocio tra la cultivar toscana da olio 'Leccino' e quella greca da tavola 'Konservolia'. La valutazione pluriennale della progenie, denominata 'Leko', ha portato alla individuazione di interessanti genotipi. In particolare, tre di questi 'Leko 4', 'Leko 5' e 'Leko 6' sono stati ritenuti meritevoli di ulteriori osservazioni per le caratteristiche carpologiche delle drupe, assimilabili a quelle tipiche delle cultivar da mensa. Nel presente lavoro, pertanto, si descrivono i principali caratteri bio-agronomici e carpologici dei suddetti genotipi che, in generale, hanno mostrato drupe con caratteristiche migliorate rispetto al 'Leccino', risultando più conformi, per peso unitario e dimensioni, a quelli della 'Konservolia'.

**Parole chiave:** *Olea europaea* L., miglioramento genetico, Leccino, Konservolia, olive da mensa.

## Bibliografia

- ASCHER P.D., 1976. *Self-incompatibility systems in floriculture crops*. Acta Hort. 63:205-15.
- BARTOLINI S., ANDREINI L., GUERRIERO R., GENTILI M., 2006. *Improvement of the quality of table olives in Tuscany through cross-breeding and selection: preliminary results of Leccino x Konservolia hybrids*. Proc. II Int. Sem. 'Olivebioteq 2006' "Biotechnology and quality of olive tree products around the mediterranean basin", Marsala, 5-10 nov.: 143-146.
- BARTOLINI S., ANDREINI L., 2011. *Contributo allo studio della biologia florale: indagine sul grado di autocompatibilità dell'olivo in Toscana*. Acta Italus Hortus 1:178-181.
- CIMATO A., CANTINI C., SANI G., MARRANCI M., 1997. *Il germoplasma dell'olivo*. Regione Toscana-IPSL CNR-A.R.S.I.A.
- C.O.I.- CONSIGLIO OLEICOLO INTERNAZIONALE. 2000. *Catalogo Mondiale delle Varietà di Olivo*. Madrid (Spain).

## Confusione varietale in olivo: il caso del germoplasma ligure

Ganino T.<sup>1</sup>, Beghè D.<sup>1\*</sup>, Morrone L.<sup>3</sup>, Petruccelli R.<sup>2</sup>, Rotondi A.<sup>3</sup>, Silvanini A.<sup>1</sup> e Fabbri A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma

<sup>2</sup> Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR, Firenze

<sup>3</sup> Istituto di Biometeorologia, CNR, Bologna

### Varietal confusion in olive: the case of ligurian germplasm

**Abstract.** The need to catalogue, classify and characterise as many cultivars as possible within the species *Olea europaea* L. derives from the necessity to preserve and safeguard its existing wide genetic wealth, which results from a myriad of interventions made by man and environment in the course of millennia. Olive cultivar classification, though, is made difficult by the existence of a great number of synonyms and homonyms, and therefore different cultivars may be named in the same way (homonymy), and the same cultivar may receive different names (synonymy); what's more, in the last decades the intensifying of germplasm exchanges within the Country and towards other Countries has caused an inevitable number of labelling errors of propagated genotypes. Hence several uncertainties on the correct attribution of the plant material to known cultivars, commonly termed "varietal confusion". This problem exists also in those precious instruments of germplasm conservation, the many germplasm collections existing all over the world in olive producing countries. The research here presented concerned ligurian olive genotypes collected in two different collections. The DNA of the studied cvs was extracted from leaves with the CTAB technique. The screening was made by utilising 12 dinucleotidic SSR primers. The results were analysed by dissimilarity coefficient among cultivars (Euclidean distance) and by cluster analysis. The analysis reveals the presence of a marked genetic diversity in ligurian germplasm as well as of several cases of varietal confusion in the studied collection plots, with the occurrence of cases of both synonymy and homonymy.

**Key words:** *Olea europaea* L., SSR, olive germplasm collection, homonymy, synonymy.

### Introduzione

L'olivo presenta, a differenza di quasi tutte le altre specie coltivate, un vastissimo patrimonio genetico rappresentato da più di 1.200 varietà, oltre che da un esteso numero di ecotipi locali (Cantini *et al.*, 1999; Bartolini *et al.*, 2005, 2008). Non è da escludere però che alcune varietà si siano perse a vantaggio di altre geneticamente migliori, perché più produttive, più resistenti ai parassiti, con maggiori rese in olio, ecc. Negli ultimi anni diversi studi si sono focalizzati sulla conoscenza del patrimonio genetico dell'olivo in Italia (Cantini *et al.*, 1999; Montemurro *et al.*, 2005; La Mantia *et al.*, 2005; Ganino *et al.*, 2007; Muzzalupo *et al.*, 2009, 2010; Beghè *et al.*, 2011). Da questi studi, e da quelli passati, emerge la ricchezza del germoplasma dei principali paesi olivicoli: Italia (538 varietà), Spagna (183), Francia (88), e Grecia (52) (Baldoni e Belaj, 2009). Grazie a questa ricchezza di germoplasma, la biodiversità dell'olivo può rappresentare una ricca fonte di variabilità per il miglioramento genetico (Baldoni e Belaj, 2009). Da qui la necessità di catalogare, classificare ed identificare quante più varietà possibili all'interno della specie con l'obiettivo di conservare e salvaguardare il vasto patrimonio genetico. Tradizionalmente la biodiversità vegetale, compresa quella dell'olivo, viene conservata e custodita attraverso la costituzione di campi collezione (conservazione *ex situ*). Oggi il germoplasma olivicolo è infatti conservato in oltre 100 collezioni, incluse nel database FAO (Bartolini, 2008).

L'ampia variabilità genetica dell'olivo nel corso dei secoli è stata fissata e diffusa liberamente senza seguire uno "standard varietale di riferimento" e questo ha portato alla costituzione (involontaria) di cultivar policlonali a fenotipo eterogeneo anziché monoclonali, perciò, per l'olivo, le definizioni di cultivar e cloni dovrebbero essere riadattate. Infatti per questa pianta si dovrebbe parlare di "gruppi di individui". Ogni gruppo costituisce una popolazione di cloni, ossia discendenze provenienti dalla moltiplicazione di un solo individuo. Questi eventi hanno originato, all'interno della specie numerosi casi di omonimie e

\* deborah.beghe@unipr.it

sinonimie non ancora risolte, per cui varietà diverse vengono indicate con lo stesso nome (omonimia) oppure la stessa varietà viene chiamata con nomi diversi (sinonimia), generando “confusione varietale”. Questo problema si riscontra anche nei numerosi campi collezione di germoplasma presenti nei paesi olivicoli e non, strumenti di conservazione del germoplasma stesso.

Lo scopo dell’indagine è stata quella di verificare la corrispondenza genetica tra il germoplasma ligure presente nei campi catalogo in modo da poter evidenziare eventuali casi di confusione varietale.

## Materiali e metodi

Durante il periodo vegetativo sono state prelevate foglie di cv di olivo conservati nei campi catalogo di Mirto Crosia (Cs) del C.R.A. di Rende (CS) (tab. 1) e nel campo collezione dell’azienda agricola sperimentale Santa Paolina del C.N.R., presso Follonica (Gr) (tab. 1). Il DNA genomico è stato estratto seguendo il metodo CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Per l’amplificazione del DNA sono state utilizzate 12 coppie di primer SSR: *ssrOeUA-DCA*-(03, 04, 09, 15, 16, 17)

Tab. 1- Genotipi liguri di *Olea europaea* L. collezionati nei campi collezione di Mirto Crosia (Cosenza) e Follonica (GR).

*Tab. 1 - Ligurian genotypes of Olea europaea L. collected in germplasm collections of Mirto Crosia (CS, IT) and Follonica (GR, IT).*

Cultivar	Identificativo	Provenienza materiale
Arnasca (Pignola di Arnasco)	CS	Mirto (CS)
Feglina		
Lavagnina		
Negrera		
Olivo delle Alpi		
Ottobrina		
Pignola		
Razzola		
Spagnola di Missano		
Taggiasca		
Arnasca	FI	Follonica (GR) C.N.R. (FI)
Feglina		
Lavagnina		
Negrera		
Olivo delle Alpi		
Ottobrina		
Pignola		
Razzola		
Spagnola di Missano		
Taggiasca		

(Sefc *et al.*, 2000), *ssrOe-UDO99*-(-024, -043) (Cipriani *et al.*, 2002), *ssrOe-GAPU*-(59, 101, 103A) (Carriero *et al.*, 2002) ed *EMO90* (Carriero *et al.*, 2002). La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume in 12 µl contenente: 1x Tampone di Reazione (Biotools, B&M Labs, S.A., Madrid), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Biotools, B&M Labs, S.A., Madrid), 0.2 mM dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway, USA), 0.2 µM primer (MWG Biotech, Edersberg), 20 ng DNA genomico e 0.6 U di Taq polimerasi (Biotools, B&M Labs, S.A., Madrid). Per il primer *UDO-043* è stata utilizzata una concentrazione di MgCl<sub>2</sub> pari a 2.5 mM per ottenere un amplificato di maggiore qualità. La reazione di amplificazione è stata ottimizzata in Thermal Cycler MJ PCT 100 Research (Watertown, Mass.) programmando un primo passaggio a 95 °C per 5 minuti seguito da 30 cicli di 45 secondi a 94 °C, 45 secondi alla temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primer, 45 secondi a 72 °C rispettivamente per la denaturazione, l’annealing e l’estensione del primer, al termine dell’amplificazione sono stati effettuati 8 minuti di incubazione a 72 °C.

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante l’uso di sequenziatore CEQ 2000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Inc.) su gel di acrilamide CEQ Separation Gel LPA-1 (Beckman Coulter, Inc.). I profili di corsa sono analizzati per confronto con un marker CEQ DNA Size Standard kit 400 (Beckman Coulter, Inc.). I Frammenti di amplificazione sono stati approssimati usando un approccio conservativo (binning) (Kirby, 1990) mediante l’utilizzo del software statistico R (R Development Core Team 2005). I dati sono stati successivamente analizzati mediante cluster analysis con metodo UPGMA (Unweighted Pair - Group Method with Arithmetic Mean) e distanza di legame euclidea utilizzando il software XLSTAT 2008 (Addinsoft™ 1995-2008).

## Risultati e discussioni

I risultati ottenuti hanno confermato l’alta efficienza dei marcatori SSR per la genotipizzazione delle cultivar di olivo, messo in evidenza la ricchezza genetica del germoplasma ligure e confermato i risultati di altri autori (i.e., Bracci *et al.*, 2009). Tutti gli oligonucleotidi utilizzati hanno mostrato un buon grado di polimorfismo e il valore di eterozigosi e il numero di alleli trovato per ogni locus è comparabile con quello riportato in altri studi, eseguiti con marcatori SSR, sul germoplasma di olivo di altri distretti italiani quali Sicilia (La Mantia *et al.*, 2005), Emilia (Ganino *et al.*, 2007; Beghè *et al.*, 2011) e Liguria (Bracci *et al.*, 2009).

Dai risultati sono emersi casi di confusione varietale tra le piante presenti nei campi collezione di Follonica (denominati con la sigla “FI”) e di Cosenza (denominati con la sigla “CS”). Il primo caso riguarda la cultivar Olivo delle Alpi (Cs) che risulta essere vicina geneticamente alla cv Ottobrina (FI) (differiscono solo per un allele) (fig. 1), ed entrambe sono lontane geneticamente dalle rispettive cultivar provenienti dal campo collezione di Follonica e di Cosenza (fig. 1). Questa confusione può essere dovuta ad una non corretta identificazione iniziale della varietà, allo scambio di materiale vegetale tra Enti di Ricerca e non, a criteri generici di denominazione utilizzati nei processi di selezione e diffusione delle varietà.

La ‘Taggiasca’ e la ‘Razzola’ (FI e CS) si collocano in un gruppo genetico omogeneo (fig. 1) e questa vicinanza genetica è in accordo con precedenti studi che hanno indicato un ampio numero di tratti morfologici comuni sulle due cultivar (Fontanazza, 1993; Baldoni *et al.*, 2003). Da studi effettuati sulle varietà Taggiasca e Lavagnina (Lombardo, 2003), emerge che per lo stesso autore le due cv sono sinonime, questo dato non viene confermato dalle analisi effettuate in questo lavoro, infatti la cv Taggiasca (CS e FI) appare più vicina alla cv Lavagnina (Fi), ma comunque con genotipo differente rispetto alla Lavagnina (CS). Anche in questo caso siamo di fronte ad un caso di confusione varietale (fig. 1).

Altri casi di confusione varietale sono emersi tra i genotipi ‘Negrera’ (FI) e ‘Negrera’ (CS), data dalla loro diversità genetica (fig. 1).

Al contrario, i dati molecolari hanno rilevato la corretta identificazione delle cultivar Arnasca (CS e FI), Pignola (CS e FI) e Feglina (CS e FI) (fig. 1).

### Conclusioni

Concludendo, dalle analisi svolte si può affermare che: i marcatori SSR si sono rivelati un ottimo strumento di analisi; sono emersi casi di confusione varietale nei campi collezione considerati; le cv Arnasca, Pignola, Feglina mostrano corrispondenza genetica tra le stesse cv collezionate nei campi catalogo.

La Liguria, come altre regioni italiane è ancora lontana dalla risoluzione dell’ormai annoso problema della confusione varietale. Problema questo che deve e dovrà essere risolto non solo in Liguria, ma anche nel resto dell’Italia; infatti non bisogna dimenticare che l’identificazione varietale costituisce un potenziale strumento per la protezione degli oli tipici e soprattutto per il miglioramento genetico (per es. migliorare la produttività e le caratteristiche nutrizionali della coltura). Questa potenzialità delle risorse genetiche olivicole potrà essere sfruttata solo se sarà fatta chiarezza sulla reale biodiversità olivicola italiana.

### Riassunto

La necessità di catalogare, classificare ed identificare quante più varietà possibili all’interno della specie *Olea europaea* L. è generata dal bisogno di conservare e salvaguardare il vasto patrimonio genetico esistente, risultato di una miriade di eventi operati dall’uomo e dall’ambiente nel corso di millenni. La classificazione varietale nell’olivo però risulta complicata dalla presenza di numerose omonimie e sinonimie non ancora risolte, per cui varietà diverse vengono indicate con lo stesso nome (omonimia) e la stessa varietà viene chiamata con nomi diversi (sinonimia); inoltre negli ultimi decenni l’intensificarsi degli scambi di germoplasma all’interno del Paese e verso l’estero ha determinato un inevitabile numero di errori di riconoscimento e cartellinatura dei genotipi propagati. Una serie di eventi che ha generato in molti casi incertezze sulla reale attribuzione del materiale genetico, genericamente definita “confusione varietale”. Questo problema si riscontra anche in quei preziosi strumenti di conservazione del germoplasma stesso, i numerosi campi collezione di germoplasma presenti nei paesi olivicoli e non. Lo studio in oggetto ha riguardato genotipi liguri di olivo collezionati in due diversi

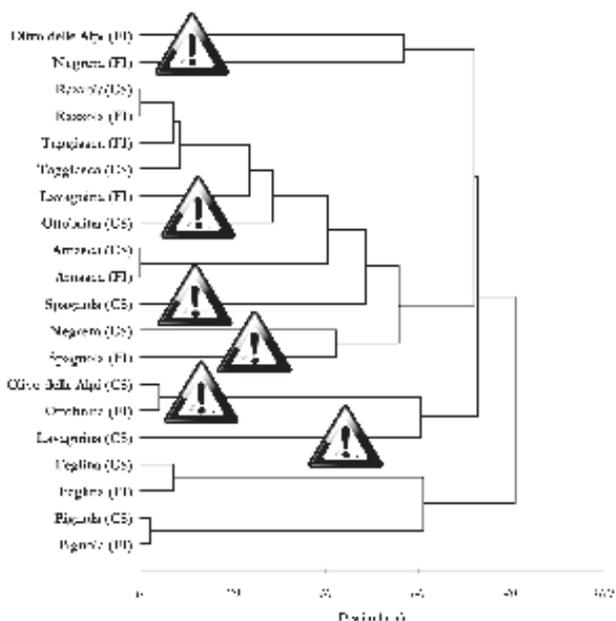


Fig. 1 - Dendrogramma relativo alle 20 accessioni di olivo liguri collezionate nei campi catalogo di Mirto Crosia (Cosenza) e Follonica (GR) generato con UPGMA cluster analysis utilizzando il coefficiente di dissimilarità delle distanze Euclideoe.

Fig. 1 - Dendrogram of 20 Ligurian olive cv collected in germplasm collection of Mirto Crosia (CS, IT) e Follonica (GR, IT) generated with UPGMA cluster analysis and Euclidean distance.

campi catalogo. Il DNA delle cv oggetto di studio è stato estratto da foglia con metodo CTAB. Lo screening è stato effettuato utilizzando 12 primer SSR dinucleotidici. I risultati sono stati analizzati per coefficiente di dissimilarità fra le cultivar (distanza euclidea) e mediante cluster analysis. L'analisi rivela la presenza di una marcata diversità genetica nel germoplasma ligure e diversi casi di confusione varietale presente nei campi oggetto di indagine, evidenziando sia casi di sinonimia sia di omonimia.

**Parole chiave:** *Olea europaea* L., SSR, campi collezione, omonimia, sinonimia.

## Bibliografia

- BALDONI L., BELAJ A., 2009. *Olive*. In: Vollmann J., Raean I (ed.) *Oil crops*. Handbook of plant breeding, vol 4. Springer Science + Business Media, New York, pp 397-421.
- BALDONI L., RUGINI E., 2003. *Le biotecnologie*. In: *Olea. Trattato di olivicoltura*. Fiorino P., Ed agricole, Bologna, pp. 145-167.
- BARTOLINI G., 2008. *Olea database*. Available at: <http://www.oleadb.it>.
- BARTOLINI G., PREVOST G., MESSERI C., CARIGNANI G., 2005. *OLIVE GERMPLASM: cultivars and world-wide collections*. Web site FAO: <http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp>.
- BEGHÈ D., FERRARINI A., GANINO T., FABBRI A., 2011. *Molecular characterization and identification of a group of local Olea europaea L. varieties*. Tree Genet Genomes, 7: 1185–1198. DOI 10.1007/s11295-011-0405-3
- BRACCI T., SEBASTIANI L., BUSCONI M., FOGHER C., 2009. *SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria*. Sci. Hortic. 122: 209-215.
- CANTINI C., CIMATO A., SANI G., 1999. *Morphological evolution of olive germplasm present in Tuscany region*. Euphytica 109: 173-181.
- CARRIERO F., FONTANAZZA G., CELLINI F. AND GIORIO G., 2002. *Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (Olea europaea L.)*. Theor. Appl. Genet. 104:301-307.
- CIPRIANI G., MARRAZZO M.T., MARCONI R., CIMATO A., TESTOLIN R., 2002. *Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (Olea europaea L.)*. Theor. Appl. Genet., 104: 223-228
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1987. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochem. Bull. 19: 11-15
- FONTANAZZA G., 1993. *Aspetti tecnici di ristrutturazione delle olivicoltura ligure*. In: *studio sulla ristrutturazione dell'olivicoltura ligure*. Ed Regione Liguria Servizio Assistenza Tecnica e Sperimentazione in Agricoltura, REDA.
- GANINO T., BEGHÈ D., VALENTI S., NISI R., FABBRI A., 2007. *A RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of Olea europaea L. in the Emilia region, Northern Italy*. Genet. Resour. Crop Evol. 54: 1531-1540.
- KIRBY L.T., 1990. *DNA fingerprinting. An introduction*. Stockton Press, New York
- LA MANTIA M., LAIN O., CARUSO T., TESTOLIN R., 2005. *SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (Olea europaea L.) germplasm*. J Hortic. Sci. Biotechnol. 80:628-632.
- LOMBARDO N., PERRI E., MUZZALUPO A., MADEO A., GODINO G., PELLEGRINO M., 2003. *Il germoplasma olivicolo calabrese*. Ed. ISOI-Regione Calabria-Co.R.Ass.Ol. Cosenza.
- MONTEMURRO C., SIMEONE R., PASQUALONE A., FERRARA E., BLANCO A., 2005. *Genetic relationships and cultivar identification using AFLP and SSR markers*. J. Hortic. Sci Biotechnol. 80:105-110.
- MUZZALUPO I., STEFANIZZI F., PERRI E., 2009. *Evaluation of olive cultivated in southern Italy by simple sequence repeat markers*. Hortscience 44(3):582–588
- MUZZALUPO I., CHIAPPETTA A., BENINCASA C., PERRI E., 2010. *Intra-cultivar variability of three major olive cultivars grown in different areas of central-southern Italy and studied using microsatellite markers*. Sci Hortic 126:324–329
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- SEFC K. M., LOPES M. S., MENDONÇA D., RODRIGUES DOS SANTOS M., LAIMER DA CAMERA MACHADO M. AND DA CAMARA MACHADO A., 2000. *Identification of microsatellite loci in olive (Olea europaea) and their characterization in Italian and Iberian olive trees*. Mol. Ecol. 9:1171- 1173.

## Embriocultura di progenie da incroci di sottospecie di *Olea europaea*

Caceres M.E.<sup>1</sup>, Sarri V.<sup>1</sup>, Ceccarelli M.<sup>1</sup> e Mencuccini M.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Università di Perugia

<sup>2</sup> CNR Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo, Perugia

### Embryoculture of progeny from crosses of *Olea europaea* subspecies

**Abstract.** The breeding of the olive tree has been focused along many years on the improving of quality and quantity of both oil and table olives for direct consumption, and several genotypes resistant to biotic and abiotic factors have been obtained. In this context, we have undertaken an intraspecific cross strategy between olive cultivars Leccino (LE), Frantoio (FR), Dolce Agogia (DA) and FS17 and three accessions of the subspecies *cuspidata* to obtain genotypes showing potentially useful trait combinations. We have exploited several parent combinations each involving one cultivar of *O. europaea* and one accession of *cuspidata*. Flowers of seed-bearing parent were emasculated and dusted with pollen of the male parent. Pollination was performed on potted plants in a controlled environment with high relative humidity (% RH). Embryos were dissected under aseptic conditions from kernels (embryo, endosperm, and cuticle) obtained from artificially pollinated flowers and cultured on EZ medium. Fruits were obtained from the following parent combinations: a) *cuspidata* Sud Africa x FR, b) *cuspidata* Sud Africa x LE, c) *cuspidata* Cina x DA, d) DA x *cuspidata* Sud Africa, e) DA x *cuspidata* Cina, f) DA x *cuspidata* India and g) FS17 x *cuspidata* India. After 60 days of culture, the explants were in vitro micro-propagated and later on these were moved to pots in the greenhouse. After appropriate acclimatation well grown plants were obtained. From these, DNA was extracted from leaf materials and used to analyze microsatellite markers (SSR) to confirm their hybrid nature.

**Key words:** intraspecific crosses, *in vitro* culture, SSR, *Olea europaea*.

### Introduzione

L'obiettivo del miglioramento genetico delle piante coltivate è quello di ottenere varietà con caratteristiche produttive, qualitative e di resistenza agli stress, migliori di quelle presenti nelle varietà attualmente commercializzate. Il miglioramento genetico classico per incrocio utilizza la variabilità genetica, presente naturalmente in ogni specie vegetale, per favorire l'evoluzione della stessa nella direzione gradita dall'uomo. Per quanto riguarda l'olivo, alcuni dei principali paesi olivicoli hanno avviato programmi di miglioramento genetico con l'obiettivo di selezionare genotipi caratterizzati da resistenza ai principali parassiti e stress abiotici (Bellini *et al.*, 2008), con una produzione precoce e senza alternanza, idonei per la coltura intensiva e la raccolta meccanizzata, oltre che con produzione di alta qualità, sia in termini di caratteristiche organolettiche dei frutti e degli oli, che di un elevato contenuto in sostanze nutraceutiche e funzionali.

Per aumentare la possibilità di trasferire sequenze geniche codificanti per caratteri di particolare interesse agronomico, come ottenuto in altre specie (Alleweldt *et al.*, 1988), si è studiata la possibilità di effettuare incroci tra cultivar e sottospecie di *Olea europaea*. Per la germinazione dei semi ottenuti è stata utilizzata la tecnica dell'embriocultura (Cañas *et al.*, 1987; Acebedo *et al.*, 1997; Mencuccini *et al.*, 1997) come alternativa alla pratica della semina *in vivo*.

### Materiali e metodi

Le piante utilizzate fanno parte della collezione di olivo dell'ISAFOM-CNR di Perugia.

### Incroci

Quattro cultivar di *O. europaea* (Dolce Agogia, Frantoio, Leccino, FS17), e tre accessioni della sottospecie *cuspidata* (India, Cina, e Sud Africa) sono state incrociate fra loro secondo le diverse combinazioni. Si è inizialmente proceduto alla demascolazione dei fiori destinati all'impollinazione controllata, e all'in-

\* m.mencuccini@iro.pg.cnr.it

sacchettamento dei rami predisposti alla raccolta del polline. Dopo l'allegagione e la maturazione dei frutti si è proceduto alla raccolta e pulitura dei semi destinati alla germinazione.

### Embriocoltura

I noccioli sono stati tenuti in soda al 2% per 4 h, poi risciacquati e lasciati in H<sub>2</sub>O per circa 2 h, quindi lasciati asciugare tutta la notte. Le mandorle (embrione, endosperma e tegumento), estratte dopo rottura meccanica dei noccioli, sono state sterilizzate con ipoclorito di sodio al 10% e risciacquate più volte con acqua sterile. In condizione di asepsi, gli embrioni sono stati escissi e colturi in provette su un substrato agarizzato EZ (Rugini, 1986) e successivamente poste in camera di crescita con fotoperiodo di 16 h, illuminazione di 40 µEs-1m-2 e temperatura di 23 ± 1 °C.

Lo sviluppo degli embrioni è stato rilevato controllando la crescita dell'epicotile e della radice. Nel caso dei soggetti privi di radice si è proceduto in un secondo momento al trasferimento in terreno di radicazione per la formazione di un apparato radicale avventizio (Mencuccini, 2003). Gli espianti che presentavano una crescita adeguata ed un apparato radicale idoneo, sono stati trasferiti in serra su un substrato costituito da terra, sabbia e perlite, in condizioni di alta umidità relativa per l'acclimatazione *in vivo*.

### Microsatelliti

Per verificare la natura ibrida degli individui ottenuti sono stati utilizzati marcatori SSR (microsatelliti). Dalle foglie di ciascuno di essi è stato estratto il DNA genomico utilizzando il kit Sigma-Aldrich. Per ogni campione sono state condotte amplificazioni tramite PCR utilizzando le coppie di primer DCA-09, DCA-05 (Sefc *et al.*, 2000) e GAPU103A (Carriero *et al.*, 2002; Muzzalupo *et al.*, 2009) marcati con la molecola fluorescente NAD. I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite corsa elettroforetica

su capillare utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) ed analizzati impiegando il software GeneMapper.

## Risultati e discussione

### Incroci

Tra gli incroci ottenuti si è avuta una diversa percentuale di allegagione compresa tra il 3% e il 50% circa ed una moderata cascola (tab. 1). Da tutti gli incroci effettuati sono stati ottenuti complessivamente 29 frutti e sulle drupe sono stati fatti rilievi morfologici (dati non mostrati) prima dell'isolamento degli embrioni.

### Embriocoltura

Dopo circa 30 giorni di coltura quasi tutti gli embrioni erano germinati (fig. 1 e tab.1). Dopo la crescita (fig. 2) si è proceduto alla moltiplicazione e radicazione *in vitro* ottenendo una alta percentuale di

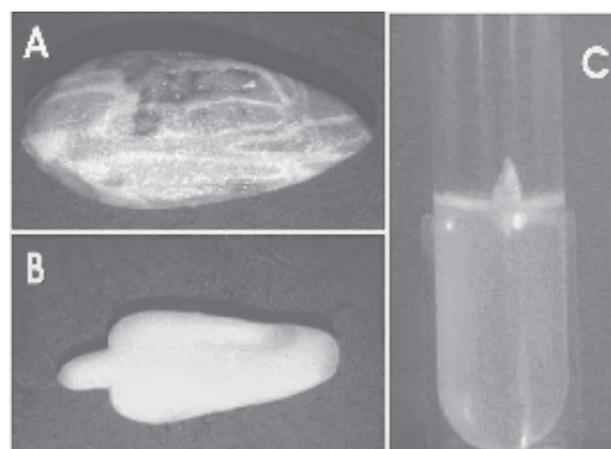


Fig. 1 - Mandorla (embrione, endosperma e tegumento) estratta da un seme ottenuto da incrocio di subsp. *cuspidata* (Cina) x Dolce Agogia (A), embrione isolato dalla mandorla (B) e coltura in substrato di crescita *in vitro* (C).

Fig. 1 - Seed (embryo, endosperm and seed coat) extracted from a seed from crossing subsp. *cuspidata* (China) Dolce Agogia x (A), embryo isolated from seed (B) and cultured in growth medium *in vitro* (C).

Tab. 1 - Produttività degli incroci tra cultivar di *Olea europaea* e accessioni della subsp. *cuspidata* in termini di numero totale di fiori emasculati, semi, embrioni germinati e percentuale di allegagione e cascola.

Tab. 1 - Total number of emasculated flowers, seeds, germinated embryos, and percentage of fruit set or fruit drop in crosses between *Olea europaea* cultivars and subsp. *cuspidata* accessions.

Portaseme (♀)	Impollinatore (♂)	Fiori (n)	Allegagione (%)	Cascola (%)	Semi (n)	Embrioni germinati (n)
<i>cuspidata</i> Sud Africa	Frantoio	204	5	17	10	9
<i>cuspidata</i> Sud Africa	Leccino	308	3	50	7	6
<i>cuspidata</i> Cina	Dolce Agogia	21	5		1	1
Dolce Agogia	<i>cuspidata</i> Sud Africa	26	8	78	2	2
Dolce Agogia	<i>cuspidata</i> Cina	8	50		4	3
Dolce Agogia	<i>cuspidata</i> India	20	5	67	1	1
FS17	<i>cuspidata</i> India	47	9	69	4	3
Totale		634			29	25

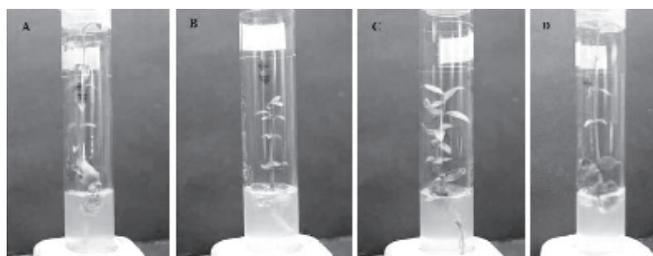


Fig. 2 - Incroci *in vitro*: subsp. *cuspidata* (Cina) x Dolce Agogia (A) ; subsp. *cuspidata* (Sud Africa) x Frantoio (B); subsp. *cuspidata* (Sud Africa) x Leccino (C); Dolce Agogia x subsp. *cuspidata* (India) (D).

Fig. 2 - Crossings *in vitro*: subsp. *cuspidata* (China) Dolce Agogia x (A), subsp. *cuspidata* (South Africa) x Frantoio (B); subsp. *cuspidata* (South Africa) x Leccino (C); Agogia x Dolce subsp. *cuspidata* (India) (D).

plantule. Il successivo trasferimento ed acclimatazione in serra non ha evidenziato fallanze di rilievo fino alla collocazione in vaso in ombrario (fig. 3).

### Microsatelliti

L'impiego dei marcatori SSR DCA-09, DCA-05 e GAPU103A ha permesso di stabilire che tutti gli individui analizzati sono ibridi, frutto dell'incrocio dei due parentali, tranne la pianta 16, che non ha dato risultati interpretabili e su cui saranno condotte ulteriori indagini, e la pianta 22 che è risultata derivare da una autofecondazione di FS17 (tab. 2).

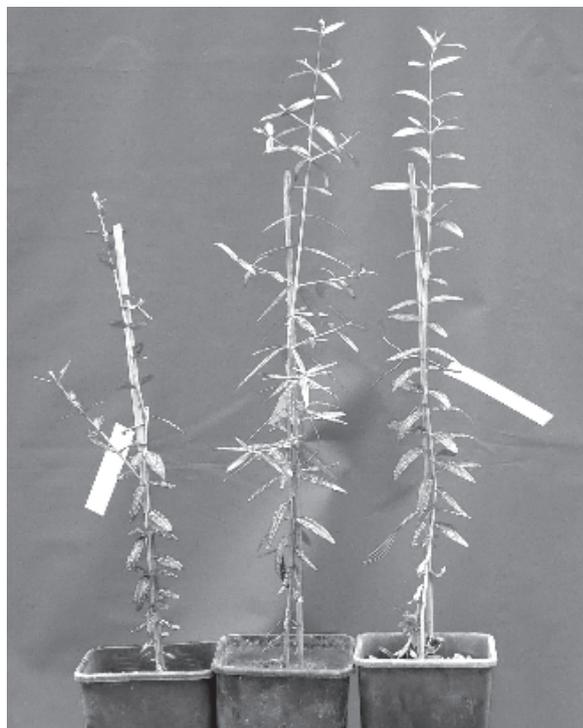


Fig. 3 - Piante in vaso degli ibridi (da sinistra a destra) subsp. *cuspidata* (Sud Africa) x Frantoio ; subsp. *cuspidata* (Cina) x Dolce Agogia ; FS17 x subsp. *cuspidata* (India).

Fig. 3 - Potted plants hybrids (from left to right) subsp. *cuspidata* (South Africa) x Frantoio; subsp. *cuspidata* (China) x Dolce Agogia; FS17 x subsp. *cuspidata* (India).

Tab. 2 - Lunghezza in paia di basi (bp) degli alleli ottenuti per ogni parentale ed ogni ibrido dopo amplificazione PCR dei tre loci analizzati (le caselle con sfondo grigio indicano i genotipi parentali, i numeri in corsivo indicano gli incroci non ibridi).  
Tab. 2 - Length in base pairs (bp) of alleles obtained for each parent and each hybrid after PCR amplification of three loci analyzed (the boxes with background dark indicate the parental genotypes, the numbers in italics indicate non-hybrid crosses).

Genotipo	Microsatelliti (SSR)		
	DCA-09	DCA-05	GAPU103A
<i>cuspidata</i> Sud Africa (♀)	167-169	196-196	Assente
Frantoio (♂)	183-206	194-202	160-172
4-1	169-206	196-202	172
4-2	169-183	194-196	160
4-3	169-183	196-202	172
4-4	169-183	196-202	160
4-6	169-206	194-196	172
4-7	169-183	196-202	172
4-10	169-183	196-202	172
<i>cuspidata</i> Sud Africa (♀)	167-169	196-196	Assente
Leccino (♂)	163-206	194-202	172-184
5-6	163-169	196-202	184
5-7	163-169	196-202	184
<i>cuspidata</i> Cina (♀)	185-187	198-198	Assente
Dolce Agogia (♂)	173-187	192-204	172-176
14	185-187	198-204	172
Dolce Agogia (♀)	173-187	192-204	172-176
<i>cuspidata</i> Sud Africa (♂)	167-169	196-196	assente
16		192-204	172
Dolce Agogia (♀)	173-187	192-204	172-176
<i>cuspidata</i> Cina (♂)	185-187	198-198	assente
17-1	185-187	198-204	172
17-2	173-185	198-204	172
17-3	185-187	192-198	172
Dolce Agogia (♀)	173-187	192-204	172-176
<i>cuspidata</i> India (♂)	185-187	198-198	assente
18	173-187	192-198	172
FS17 (♀)	206-208	202-204	173-173
<i>cuspidata</i> India (♂)	185-187	198-198	assente
21-1	185-206	198-204	173
21-2	187-208	198-204	173
21-3	187-208	198-204	173
22	206	202-204	173-173

### Conclusioni

La possibilità di incrociare le varietà coltivate di olivo con accessioni della *O. europaea* subsp. *cuspidata*, al fine di ottenere ibridi con una produzione quantitativamente e qualitativamente apprezzabile e che nel contempo presentino resistenze a stress biotici ed abiotici, è un obiettivo di grande importanza economica. La possibilità di poter inserire caratteri genetici riscontrabili nelle specie non coltivate, rende pos-

sibile la prospettiva di operare un miglioramento genetico mirato delle cultivar di olivo attraverso le tecniche dell'incrocio e della coltura *in vitro*.

### Riassunto

Il miglioramento genetico dell'olivo è da alcuni anni finalizzato al miglioramento quantitativo e qualitativo dell'olio e delle olive da tavola, oltre che all'ottenimento di genotipi resistenti a fattori biotici ed abiotici. In questo ambito si è proceduto alla realizzazione di incroci intraspecifici tra le cultivar di olivo Leccino (LE), Frantoio (FR), Dolce Agogia (DA) e FS17 e di *Olea europaea* subsp. *cuspidata* (accessioni asiatiche e africane) per ottenere genotipi con caratteristiche agronomiche di interesse. Sono state eseguite alcune combinazioni di incrocio ottenute ognuna da una cultivar di *Olea europaea* e una accessione della subsp. *cuspidata*. I fiori delle piante portaseme sono stati demasculati e l'impollinazione è stata fatta su piante in vaso in ambiente controllato con elevata percentuale di umidità relativa (% UR). Dai frutti ottenuti dagli incroci sono stati asportati i noccioli e da essi sono state estratte le mandorle (embrione, endosperma e cuticola) da cui, dopo opportuna sterilizzazione, è stato separato l'embrione, successivamente trasferito *in vitro* su substrato EZ. Sono stati ottenuti frutti dagli incroci di a) *cuspidata* Sud Africa x FR, b) *cuspidata* Sud Africa x LE, c) *cuspidata* Cina x DA, d) DA x *cuspidata* Sud Africa, e) DA x *cuspidata* Cina, f) DA x *cuspidata* India e g) FS17 x *cuspidata* India. Gli espianti ottenuti dopo 60 giorni dalla messa *in vitro* sono stati micropropagati e quindi trasferiti *in vivo* in serra, completi del proprio apparato radicale.

Dopo un periodo di acclimatazione e crescita, dalle foglie di ciascun genotipo è stato estratto il DNA, su cui sono state condotte analisi molecolari per stabilire, tramite l'utilizzo di marcatori microsatellitari (SSR), l'effettiva natura ibrida delle piante analizzate.

**Parole chiave:** incroci intraspecifici, coltura *in vitro*, SSR, *Olea europaea*.

### Bibliografia

- ACEBEDO M. M., LAVEE S., LIÑÁN J., TRONCOSO A., 1997. *In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes*. Sci. Hort. 69: 207-215.
- ALLEWELDT G., POSSINGHAM J.V., 1988. *Progress in grapevine breeding*. Theor. Appl. Genet. 75: 669-673.
- BELLINI E., GIORDANI E., ROSATI A., 2008. *Genetic improvement of olive from clonal selection to cross-breeding programs*. Adv. Hort. Sci. 22: 73-86.
- CAÑAS L.A., CARRAMOLINO L., VICENTE M., 1987. *Vegetative propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos*. Plant Sci. 50: 85-90.
- CARRIERO F., FONTANAZZA G., CELLINI F., GIORIO G., 2002. *Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (Olea europaea L.)*. Theor. Appl. Genet., 104: 301-307.
- MENCUCCINI M., 2003. *Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (Olea europaea L.) cultivars*. Sci. Hortic. 97: 129-139.
- MENCUCCINI M., MICHELI M., STANDARDI A., 1997. *Micropropagazione dell'olivo: effetto di alcune citochinine sulla proliferazione*. Italus Hortus 4: 32-37.
- MUZZALUPO I., STEFANIZZI F., SALIMONTI A., FALABELLA R., PERRI E., 2009. *Microsatellite markers for identification of a group of italian olive accessions*. Sci. Agric. 66: 685-690.
- RUGINI E. 1986. *Olive (Olea europaea L.)*. In: Y.P.S. Bajaj (ed) Trees I. Biotechnology in Agriculture and Forestry 1, vol. 1. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 253-267.
- SEFC K.M., LOPES M. S., MENDONCA D., SANTOS M.R.D., MACHADO M.L.D.C., MACHADO A.D.C., 2000. *Identification of microsatellite loci in olive (Olea europaea) and their characterization in italian and iberian olive trees*. Mol. Ecol. 9: 1171-1193.

## Indici di maturazione di alcune cultivar di olivo del Veneto

Vezzaro A.\*, Bandiera E., Cardillo V., Ferasin M., Ruperti B. e Giulivo C.

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali, Università di Padova

### Ripening indices of some olive cultivars from Veneto Region

**Abstract.** Olive growing in Veneto region can be considered extreme because almost at the upper north limit for olive tree cultivation and requires a good knowledge of olive ripening processes. The ideal harvesting period in Veneto is limited to few weeks due to climatic aspects. This harvest period can become even shorter for local cultivars such as Grignano, which, if harvested at the right time, can however produce very good quality and distinctively flavoured oils. In this study we analysed some well-known ripening parameters from two olive cultivars, Grignano, typical from Veneto, and Frantoio, which is spread throughout Italy, both harvested in an orchard in Mezzane di Sotto (VR). To this end, olive drupes have been collected during the 2009 season in ten consecutive ripening stages that covered a period of time starting from 90 DAF (days after flowering) until harvest. On these samples, loss of firmness and chlorophyll a content were measured, and displayed a gradual decrease until *véraison*. The analyses of oil accumulation confirmed that cultivar Grignano accumulates less oil and with a lower rate than cultivar Frantoio, considering data obtained both for fresh and dry weight. Moreover, volatile organic compounds (VOCs) emitted from olive fruits have been measured by means of PTR-MS (Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry). Further biochemical and molecular analyses are in progress.

**Key words:** Frantoio, Grignano, ripening, oil accumulation.

### Introduzione

L'olivicoltura veneta interessa circa 5.000 ettari nelle province di Verona, Vicenza, Padova e Treviso, per una produzione totale di circa 14.000 quintali di olio vergine (ISTAT, 2010). Trovandosi ai limiti settentrionali dell'areale di coltivazione essa è sempre stata praticata solo in ambiti molto ristretti, marginali,

protetti in particolar modo dai rigori invernali. Gli oli veneti si caratterizzano per profili organolettici particolari e graditi. Questo modello olivicolo deve tuttavia far fronte a due difficoltà: una produttività unitaria relativamente bassa e costi di produzione elevati. Le potenzialità delle cultivar locali o naturalizzate nel territorio veneto sono spesso limitate dalle carenze conoscenze della fenologia e della risposta ai fattori ambientali, che possono modificare alcune condizioni del frutto non migliorabili con la successiva trasformazione. Inoltre, la resa in olio e la presenza di aromi peculiari dipendono, oltre che dalla qualità della materia prima, principalmente dal momento della raccolta, e l'individuazione del periodo ottimale di raccolta rappresenta un obiettivo prioritario per massimizzare la resa in olio e migliorarne la qualità.

A tal fine, in questo studio è stata effettuata una analisi preliminare dei parametri classici di maturazione nei frutti della cultivar Grignano, autoctona e ritenuta di interesse per il profilo aromatico peculiare dei suoi oli, e nella cultivar Frantoio, a diffusione nazionale e assunta a cultivar standard di riferimento. I parametri di maturazione considerati hanno incluso l'analisi della perdita di consistenza e dell'evoluzione del contenuto di clorofilla a, che in generale tendono a diminuire durante la maturazione della drupa (Prasanna *et al.*, 2007), e la dinamica di inolizione.

Sono stati inoltre misurati le molecole organiche emesse dalle drupe intatte (VOCs), identificando le masse ottenute tramite l'analisi spettrometrica sulla base della letteratura precedente (Vezzaro *et al.*, 2011). In particolare, sono state analizzate le emissioni di metanolo, che è un prodotto della demetilesterificazione delle pectine durante la progressione della maturazione (Harriman *et al.*, 1991), e di etanolo e acetaldeide, che sono metaboliti collegati alla maturazione e a condizioni di stress metabolico (Pesis, 2005).

### Materiali e metodi

Le olive sono state raccolte a Mezzane di Sotto (VR) durante la stagione 2009 in dieci date successive a partire da inizio settembre fino a completa maturazione, espresse in DAF (*days after flowering*): 90 DAF, 102 DAF, 109 DAF, 116 DAF, 123 DAF, 130 DAF,

\* alice.vezzaro@unipd.it

137 DAF, 144 DAF, 151 DAF, 158 DAF. Le cultivar utilizzate sono state Frantoio, diffusa a livello nazionale, e Grignano, autoctona veneta principalmente diffusa nella valle di Mezzane e Illasi (VR). La consistenza delle drupe è stata determinata mediante un penetrometro manuale. L'analisi della percentuale di inolizione è stata effettuata tramite un estrattore Soxhlet. Il contenuto in clorofilla a è stato determinato per via spettrofotometrica su estratti con N,N-dimetilformamide come indicato da Inskeep e Bloom (1985). L'analisi PTR-MS è stata condotta in maniera non distruttiva su gruppi di 20 drupe per cultivar e data di campionamento, come descritto da Vezzaro *et al.* (2011).

### Risultati e discussione

Una prima valutazione dei parametri di maturazione ha riguardato la perdita di consistenza. Questo parametro non è apparso informativo (fig. 1), la diminuzione della consistenza è risultata infatti graduale a partire fino dalle prime date di campionamento e, soprattutto, ha evidenziato il raggiungimento di valori minimi già all'inviatura fino a maturazione avanzata.

L'analisi del contenuto in clorofilla a ha evidenziato un trend discendente fino all'inviatura, ma non apprezzabile significativamente (non mostrato).

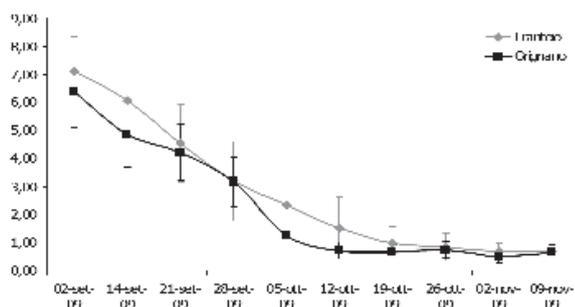


Fig. 1 - Risultati del test con penetrometro manuale sulla consistenza delle drupe.

Fig. 1 - Results of manual penetrometer analysis on drupe firmness.

Per quanto riguarda i dati di inolizione, si è osservato come la cultivar Grignano accumuli meno olio rispetto alla cultivar Frantoio, confermando quanto già noto. I dati espressi su peso fresco e peso secco hanno evidenziato come nell'annata considerata l'accumulo di olio in Grignano ha raggiunto il valore massimo già il 12/10, non modificandosi apprezzabilmente con il progredire della maturazione (fig. 2).

Per quanto riguarda l'emissione di VOCs, le due cultivar hanno presentato profili diversi come evidenziato in figura 3.

Si è osservato come il metanolo, corrispondente alla massa 33, sia aumentato con il progredire della maturazione, come è stato riscontrato anche per altri frutti carnosì. Mentre in Grignano questa tendenza è apparsa molto chiara, in Frantoio è stata riscontrata una grande variabilità delle emissioni anche se la tendenza è apparsa simile in entrambe le cv. Per quanto riguarda le emissioni di acetaldeide (massa 45), molecola che con l'etanolo fa parte del normale metabolismo del frutto, in Grignano esse sono risultate molto alte in corrispondenza dell'ultima data di maturazione, fenomeno osservato anche per le emissioni di etanolo (massa 47). In Frantoio si è invece assistito solo a un leggero aumento nelle emissioni nelle fasi finali della maturazione. Questo dato, congiuntamente all'osservazione sensoriale della comparsa di note negative nell'olio estratto da drupe di cultivar Grignano a stadi di maturazione avanzati (Vezzaro *et al.*, 2011), suggerisce la necessità di una raccolta tempestiva per questa cultivar al fine di garantire all'olio di esprimere al meglio le note aromatiche caratteristiche evitando la comparsa di note negative.

### Conclusioni

Le analisi effettuate sulla maturazione delle drupe delle due cultivar oggetto di questo studio hanno permesso una caratterizzazione preliminare della dinamica di maturazione delle olive di Grignano, in rapporto

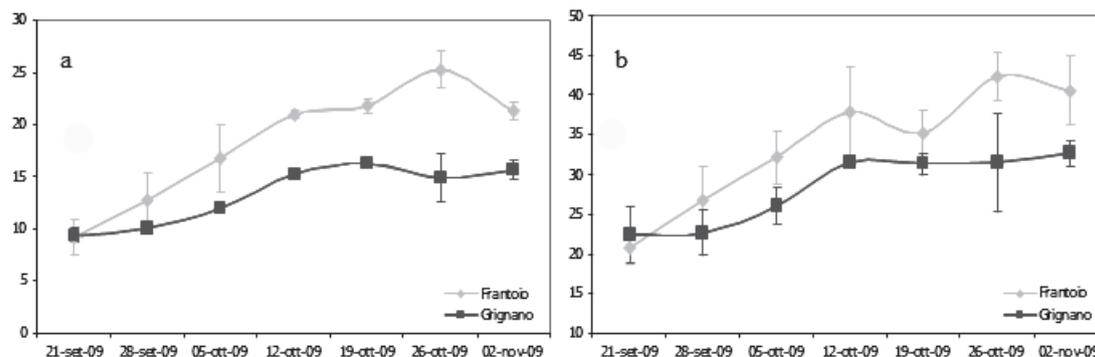


Fig. 2 - Dati di inolizione su olive di Frantoio e Grignano espressi su peso fresco (a) e secco (b).

Fig. 2 - Oil accumulation data in Grignano and Frantoio olives on the basis of fresh (a) and dry (b) weight.

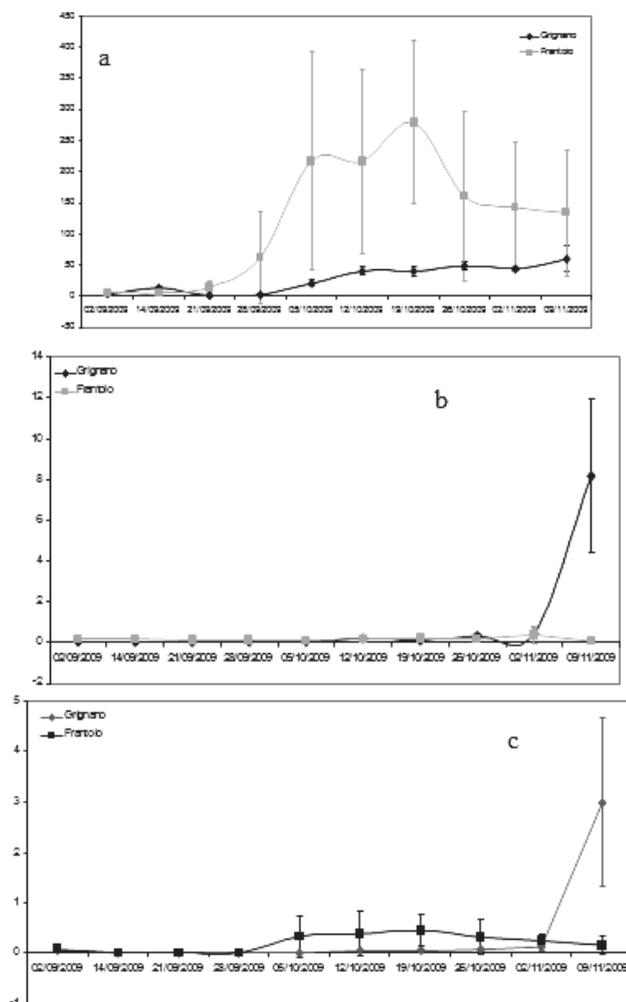


Fig. 3 - Emissione di VOCs di olive intatte delle cultivar Frantoio e Grignano per le masse 33 (a), 45 (b) e 47 (c).

Fig. 3 - VOCs emissions from intact olives of Frantoio and Grignano cultivars for masses 33 (a), 45 (b) and 47 (c).

alla più diffusa cultivar Frantoio. La dinamica di inolizione è risultata più lenta, in Grignano, e l'accumulo in olio notevolmente inferiore. Per quanto riguarda lo studio delle emissioni di VOCs, si può osservare come il metanolo aumenti gradualmente a partire dalla pre-invaiatura, mentre le emissioni di acetaldeide e etanolo restino a livelli piuttosto bassi, con un leggero aumento nelle fasi finali della maturazione, in Frantoio, mentre in Grignano aumentino a livelli apprezzabili nell'ultima data di campionamento. La comparsa di queste molecole, che possono essere correlate a note sensoriali negative nell'olio e che rappresentano uno stato di stress metabolico del frutto, rendono necessaria una attenta pianificazione della raccolta per la cultivar veneta in modo da evitare il peggioramento sensoriale dell'olio.

## Riassunto

L'olivicoltura veneta, che può essere considerata a

tutti gli effetti estrema perché al limite di latitudine per la coltivazione dell'olivo, necessita di una buona comprensione della dinamica di maturazione delle olive. L'intervallo ideale per la raccolta in Veneto è molto ristretto, limitato a poche settimane. Questa finestra di raccolta appare ulteriormente ridotta nel caso di cultivar autoctone, come la cultivar Grignano, che riescono però a fornire un olio di elevata qualità e profilo aromatico peculiare se raccolte tempestivamente nel periodo ottimale. In questo studio è stata condotta un'analisi di alcuni parametri classici di maturazione su due cultivar di olivo, la cultivar Grignano, autoctona del Veneto, e la cultivar Frantoio, utilizzata come controllo per la sua diffusione a livello nazionale, in un oliveto situato a Mezzane di Sotto (VR). A questo scopo, sono state prelevate drupe da entrambi i genotipi durante la stagione 2009 a intervalli settimanali, a dieci stadi successivi di maturazione, coprendo l'evoluzione dello sviluppo del frutto a partire da 90 DAF (*days after flowering*) fino alla raccolta. Sui campioni di olive raccolte sono stati misurati la perdita di consistenza, la concentrazione della clorofilla a, che hanno mostrato una diminuzione rapida fino all'invasatura, e il grado di inolizione che ha confermato un minore e più lento accumulo di olio nella cultivar Grignano rispetto a Frantoio. Inoltre, sono stati valutati i composti organici volatili (VOCs) emessi da olive intatte, misurati tramite PTR-MS (Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry). Ulteriori analisi a livello biochimico e molecolare sono in corso.

**Parole chiave:** Frantoio, Grignano, maturazione, inolizione.

## Bibliografia

- ISTAT, [www.agri.istat.it](http://www.agri.istat.it), consultato il 20/09/2011.
- PRASANNA V., PRABHA T.N., THARANATHAN R.N., 2007. *Fruit ripening phenomena - An overview*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 47: 1-19.
- VEZZARO A., BOSCHETTI A., DELL'ANNA R., CANTERI R., DIMAURO M., RAMINA A., FERASIN M., GIULIVO C., RUPERTI B., 2011. *Influence of olive (cv Grignano) fruit ripening and oil extraction under different nitrogen regimes on volatile organic compound emissions studied by PTR-MS technique*. Annal. Bioanal. Chem., 399: 2571-2582.
- HARRIMAN R.W., TIEMAN D.M., HANDA A.K., 1991. *Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, nonripening, and never ripe tomato fruits*. Plant Physiol., 97: 80-87.
- PESIS E., 2005. *The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration*. Postharv. Biol. Technol., 37: 1-9.
- INSKEEP W.P., BLOOM P.R., 1985. *Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone*. Plant Physiol., 77: 483-485.

## ‘Frantoio Millennio’ e ‘Leccino Millennio’: due nuove interessanti varietà di olivo da olio

Bartolini S.<sup>1\*</sup>, Guerriero R.<sup>2</sup> e Loreti F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scuola Superiore Sant’Anna (SSSA), Pisa

<sup>2</sup> Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose ‘G. Scaramuzzi’, Università di Pisa

### ‘Frantoio Millennio’ and ‘Leccino Millennio’: two new interesting oil olive cultivars

**Abstract.** A breeding program, carried out for several years in Tuscany at the Department of Fruit Science and Plant Protection of Woody Species ‘G. Scaramuzzi’ (DCDSL), University of Pisa (Italy) in collaboration with Sant’Anna School of Advanced Studies (SSSA) of Pisa (Italy), aimed to select the best genotypes based on agronomical performances of considerable interest. From this breeding work, ‘Frantoio Millennio’ and ‘Leccino Millennio’ stood out as new interesting oil olive cultivars due to several characteristics such as short unproductive period, constant yields and high rusticity. These cultivars, recently patented, have morphological characteristics of leaves, inflorescences and fruits which differing from those of standard cultivars and some remarkable biological traits: the ‘Frantoio Millennio’ shows an early color change, the ‘Leccino Millennio’ is self-fertile, allowing to have constant yields also without pollinators.

**Key words:** *Olea europaea* L., breeding, selection, Tuscan cultivars.

#### Introduzione

Il lavoro di miglioramento genetico, intrapreso da oltre un ventennio presso il Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose ‘G. Scaramuzzi’ (DCDSL) dell’Università di Pisa in collaborazione con la Scuola Superiore Sant’Anna di Pisa, iniziato con il reperimento nelle principali aree di coltura dell’olivo in Toscana di presunti cloni delle principali varietà coltivate nella regione (Guerriero *et al.*, 1988; Bartolini *et al.*, 1992; Bartolini *et al.*, 1993), ha portato alla caratterizzazione morfologica e produttiva di alcuni genotipi ritenuti interessanti per possedere alcuni caratteri morfologici distintivi da quelli

riportati in letteratura per le cultivar standard. Dopo anni di osservazioni relative al comportamento biologico-produttivo, due genotipi, frutto della selezione clonale effettuata nell’ambito delle cultivar ‘Frantoio’ e ‘Leccino’, si sono rivelati particolarmente interessanti e sono stati recentemente brevettati con la denominazione di ‘Frantoio Millennio’ (reg. RM2009NV000002) e ‘Leccino Millennio’ (reg. RM2009NV000001). Nel presente lavoro, pertanto, vengono riportate le descrizioni dei caratteri morfologici, biologici ed agronomici delle suddette cultivar.

#### Materiale e metodo

Prima di depositare il brevetto, le nuove accessioni ‘Frantoio Millennio’ (ex F3P36) e ‘Leccino Millennio’ (ex Pisa 9) sono state testate per più anni in pieno campo ed in diversi ambienti di coltivazione della Toscana (province di Lucca, Grosseto, Livorno) per verificarne le caratteristiche bio-agronomiche ed i caratteri morfologici della pianta, delle foglie, delle infiorescenze, delle drupe e dell’endocarpo. I genotipi sono stati caratterizzati utilizzando alcuni parametri descrittivi riportati nella scheda UPOV (*Union Internationale pour la Protection des Obtentions Vegetales*). Per saggiare il grado di autocompatibilità sono stati adottati test di campo e di laboratorio, secondo la metodologia descritta in Bartolini e Andreini (2011).

#### Risultati e discussione

##### ‘Leccino Millennio’

Il ‘Leccino Millennio’, originario di Bolgheri (LI), presenta caratteri morfologici differenti rispetto al ‘Leccino’ standard (Cimato *et al.*, 1997), oltre che un rilevante comportamento agronomico dato dalla buona e costante produttività, dalla precocità di entrata in produzione, dalla buona resa in olio. Di particolare rilievo è l’autocompatibilità pollinica (Bartolini e Guerriero, 1995, 2002; Bartolini e Andreini, 2011), carattere peculiare considerando che il ‘Leccino’ stan-

\* susanna.bartolini@sssup.it

dard è stato sempre ritenuto auto incompatibile. La maggiore costanza produttiva di questo clone deriverebbe appunto da questa autocompatibilità.

La pianta, piuttosto vigorosa, presenta una chioma abbastanza folta ed un portamento semi-pendulo. In tabella 1 sono riportati i principali caratteri morfologici relativi a: *foglie*, molto più grandi e di forma più allungata rispetto al ‘Leccino’; *infiorescenze*, più corte e con un numero di fiori inferiore rispetto al ‘Leccino’; *drupa*, di colore nero-rossastro alla raccol-

ta, di forma tendenzialmente più ellittico-arrotondata rispetto al ‘Leccino’ e di dimensione superiore; *endocarpo*, di dimensione più grande e di forma più allungata rispetto al ‘Leccino’.

*‘Frantoio Millennio’*

Il ‘Frantoio Millennio’, originario di Campiglia Marittima (Livorno), presenta caratteri morfologici differenti rispetto al ‘Frantoio’ standard (Cimato *et al.*, 1997). Per quanto riguarda il comportamento

Tab. 1 - Cultivar ‘Leccino Millennio’: principali caratteri morfologici di infiorescenze, foglie, drupe ed endocarpo.

Tab. 1 - ‘Leccino Millennio’ cultivar: main morphological characters of inflorescences, leaves, fruits and stones.

AIBERO	FOGLIA
VIGORIA: elevata PORTAMENTO: semi-pendulo CHIOMA: abbastanza folta	FORMA: da ellittica ad ellittico-lanceolata CURVATURA: piana SUPERFICIE: piatta
<b>INFIORESCENZA</b>	DIMENSIONE: grande
STRUTTURA: corta e rada FORMA: paniculata espiciforme LUNGH. MEDIA (mm): 20,6 N° MEDIO FIORI: 10,8	ANGOLO APICALE: acuto ANGOLO BASALE: da acuto a molto acuto POS. LARGH. MAX.: centrale COL. PAG. SUP.: verde-grigio COL. PAG. INF.: verde-cinereo
<b>DRUPA</b>	<i>DATI BIOMETRICI MEDI</i>
COLORE ALLA RACC.: nero con riflessi rossastri INVAIATURA: precoce FORMA: ovoidale SIMMETRIA: simmetrico POS. DIAM. MAX.: centrale DIMENSIONE: media APICE: arrotondato BASE: arrotondata CAVITÀ PEDUNC.: circolare EPICARPO: pruinoso	LUNGHEZZA (mm): 65,4 LARGHEZZA(mm): 15,2 LUNG./LARGH.: 4,3
<i>DATI BIOMETRICI MEDI</i>	<b>ENDOCARPO</b>
PESO 100 DRUPE (g): 316 DIAM. POLARE (mm): 21,2 DIAM. TRASV. (mm): 15,6 RAPPORTO DIAM: 1,36	FORMA: ellissoidale, leggermente allungata SIMMETRIA: legg. asimmetrico DIMENSIONE: grande POS. DIAM. MAX.: apicale SUPERFICIE: liscia SOLCHI FIBROVASCOLARI: mediamente numerosi ANDAMENTO SOLCHI: longitudinale PROFONDITÀ SOLCHI: limitata FORMA DELLA BASE: da rastremata ad arrotondata FORMA APICE: arrotondata TERMIN. APICE: breve rostro
	<i>DATI BIOMETRICI MEDI</i>
	PESO 100 NOCCIOLI (g): 66 DIAM. POLARE (mm): 15,1 DIAM. TRASV. (mm): 7,3 RAPPORTO DIAM: 2,07

Tab. 2 - Cultivar ‘Frantoio Millennio’: principali caratteri morfologici di infiorescenze, foglie, drupe ed endocarpo.

Tab. 2 - ‘Frantoio Millennio’ cultivar: main morphological characters of inflorescences, leaves, fruits and stones.

AIBERO	FOGLIA
VIGORIA: elevata PORTAMENTO: semi-pendulo CHIOMA: abbastanza folta	FORMA: ellittico-lanceolata CURVATURA: iponastica SUPERFICIE: tegente DIMENSIONE: medio-grande
<b>INFIORESCENZA</b>	ANGOLO APICALE: aperto
STRUTTURA: media e compatta FORMA: paniculata LUNGH. MEDIA (mm): 32,0 N° MEDIO FIORI: 15	ANGOLO BASALE: acuto POS. LARGH. MAX.: centrale COL. PAG. SUP.: verde COL. PAG. INF.: verde-grigio
<b>DRUPA</b>	<i>DATI BIOMETRICI MEDI</i>
COLORE ALLA RACC.: nero violaceo INVAIATURA: tardiva FORMA: ellissoidale SIMMETRIA: simmetrico POS. DIAM. MAX.: centrale DIMENSIONE: media APICE: arrotondato BASE: appiattita CAVITÀ PEDUNC.: circolare EPICARPO: pruinoso, lenticelle piccole e rade	LUNGHEZZA (mm): 70,5 LARGHEZZA(mm): 16,6 LUNG./LARGH.: 4,2
<i>DATI BIOMETRICI MEDI</i>	<b>ENDOCARPO</b>
PESO 100 DRUPE (g): 294 DIAM. POLARE (mm): 20,8 DIAM. TRASV. (mm): 15,5 RAPPORTO DIAM: 1,34	FORMA: ellissoidale SIMMETRIA: simmetrico DIMENSIONE: media POS. DIAM. MAX.: centrale SUPERFICIE: rugosa SOLCHI FIBROVASCOLARI: molto numerosi ANDAMENTO SOLCHI: longitudinale PROFONDITÀ SOLCHI: limitata FORMA BASE: rastremata FORMA APICE: appuntita TERMIN. APICE: rostro da breve a pronunciato
	<i>DATI BIOMETRICI MEDI</i>
	PESO 100 NOCCIOLI (g): 58 DIAM. POLARE (mm): 15,6 DIAM. TRASV. (mm): 8,5 RAPPORTO DIAM: 1,83

agronomico è da segnalare la precoce entrata in produzione, la buona e costante produttività, la minore scalarità di maturazione, la resa in olio superiore alla media. Di particolare rilevanza sono gli aspetti qualitativi dell'olio che presenta buone caratteristiche chimiche pregevoli come bassa acidità, elevato numero di perossidi, alto contenuto in polifenoli totali (Bartolini *et al.*, 2003). In numerose prove, condotte mediante isolamento dei rami, ha dimostrato una elevata autofertilità, quasi doppia rispetto ad altri cloni posti a confronto (8% vs 4,5%).

La pianta, caratterizzata da una chioma abbastanza folta, presenta elevata vigoria ed un portamento semi-pendulo. In tabella 2 sono riportati i principali caratteri morfologici relativi a: *foglie*, molto più grandi del 'Frantoio' standard, con curvatura iponastica e superficie tegente; *infiorescenze*, frequentemente fogliose, più corte e compatte con un numero di fiori inferiore rispetto al 'Frantoio'; *drupa*, di colore nero-violaceo a maturità, differisce dal 'Frantoio' per la forma tendenzialmente arrotondata, con maturazione meno scalare, tanto che alla raccolta le drupe risultano per oltre l'80% completamente invaiate; *endocarpo*, con apice appuntito provvisto di rostro, è di dimensione più grande e di forma più arrotondata rispetto al 'Frantoio'.

## Conclusioni

I genotipi di olivo 'Leccino Millennio' e 'Frantoio Millennio', saggiati in diverse aree di coltivazione della Toscana, hanno dimostrato di possedere differenze tali da renderli distinguibili dalle rispettive cultivar standard. In particolare, possiedono migliori caratteristiche bio-agronomiche, come costanza di produzione, buona pezzatura delle drupe, minore scalarità di maturazione per il 'Frantoio Millennio' ed un elevato grado di autocompatibilità pollinica per il 'Leccino Millennio'. In considerazione delle loro peculiari caratteristiche i genotipi 'Frantoio Millennio' e 'Leccino Millennio' sono stati recentemente brevettati.

## Riassunto

'Frantoio Millennio' e 'Leccino Millennio' sono due nuove varietà di olivo da olio recentemente brevettate, frutto di un lungo lavoro di selezione clonale intrapreso presso il Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose 'G. Scaramuzzi' (DCDSL) dell'Università di Pisa in collaborazione con la Scuola Superiore Sant'Anna di Pisa. Le cultivar presentano caratteristiche peculiari in relazione alla morfologia delle foglie, delle infiorescenze e dei frutti con elementi nettamente distintivi rispetto alle varietà standard, al comportamento agronomico, con periodo improduttivo molto breve, produzioni buone e costanti negli anni, elevata rusticità, resa in olio superiore alla media con buone caratteristiche chimiche dell'olio e all'autofertilità, consentendo di ottenere produzioni costanti, anche in assenza di impollinatori.

**Parole chiave:** *Olea europaea* L., miglioramento genetico, selezione, cultivar toscane

## Bibliografia

- BARTOLINI S., GUERRIERO R., LORETI F., VITAGLIANO C., 1992. *Caratteristiche morfologiche ed agronomiche di alcuni cloni di "Leccino" in corso di selezione*. Atti Conv. Int. "Olive oil quality", Firenze 1-3 Dicembre: 71-76.
- BARTOLINI S., GUERRIERO R., 1995. *Self-compatibility in several clones of oil olive cv. Leccino*. Adv. Hort. Sci. 9:71-74.
- BARTOLINI S., VITI R., GUERRIERO R., 2002. *Observations on the fertilization process in self-pollinated flowers of cultivar "Leccino"*. Acta Hort. 586:521-524.
- BARTOLINI S., GUERRIERO R., LORETI F., VITAGLIANO C., SAPONARI M., 2003. *Nuovi cloni di olivo virus esenti selezionati presso il D.C.D.S.L. dell'Università di Pisa*. Atti Convegno "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio", Perugia 5 Dicembre: 27-31.
- BARTOLINI S., L. ANDREINI, 2011. *Contributo allo studio della biologia florale: indagine sul grado di autocompatibilità dell'olivo in Toscana*. Acta Italus Hortus 1:178-181.
- CIMATO A., CANTINI C., SANI G., MARRANCI M., 1997. *Il germoplasma dell'olivo*. Regione Toscana-IPSL CNR-A.R.S.I.A.
- GUERRIERO R., VITAGLIANO C., BARTOLINI S., ANDREONI N., 1988. *La selezione clonale della cultivar "Leccino". Osservazioni su 31 presunti cloni nel campo di comparazione della Maremma Toscana*. Atti del Convegno sulle olive da tavola, Ascoli Piceno 25-26 Novembr: 139-152.

## Genotipizzazione di nuove accessioni di olivo siciliane

Sorrentino G.<sup>1</sup>, Fodale A.<sup>2</sup>, Mulè R.<sup>2</sup>, Russo M.P.<sup>1</sup> e Muzzalupo I.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> CRA-ACM Centro di ricerca per l'agrumicoltura e le colture mediterranee, Acireale (CT)

<sup>2</sup> CRA-SFM Unità di ricerca per il recupero e la valorizzazione delle specie floricole mediterranee, Bagheria (PA)

<sup>3</sup> CRA-OLI Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, Rende (CS)

### Genotyping of new sicilian olive accessions

**Abstract.** The olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the oldest and most important plants cultivated in the Mediterranean basin and is the only species of the genus *Olea* that produces edible fruits. The importance of production in Italy is mainly due to its derivatives, oil and table olives, which are key elements of the "Mediterranean diet". In the already vast panorama of Italian olive, some cultivars that characterize the Sicilian olive production were used to obtain the cross of merit, with a prevalent destination for table olives. The acquisition of information on varietal molecular polymorphism represents a fundamental and indispensable step for the classification of olive germplasm. The varietal classification allows access to an entirely unexplored source of variability that could represent a reservoir of useful characters that are not yet found in the few genotypes already "certified". This paper refers to five new accessions obtained from CRA, by crossing of some Sicilian cultivars of high value: 'Nocellara Belice', 'Buscioneto', 'Tonda dolce' and 'Nocellara Messina'. The following are the preliminary results of the characterization that will be used for correct classification of new accessions, within the vast heritage of Italian olive.

**Key words:** Mediterranean diet, genotyping, *Olea europaea*, olive table, SSR.

### Introduzione

La classificazione delle varietà d'olivo è molto difficile a causa della ricchezza del suo germoplasma, associata alla mancanza di riferimenti certi e di errori sulle denominazioni delle cultivar (Muzzalupo *et al.*, 2009a; 2010). Vari studi sull'identificazione delle cul-

tivar sono stati fatti negli ultimi 15 anni per mezzo di differenti marcatori molecolari (Baldoni *et al.*, 2009; Muzzalupo *et al.*, 2007; 2008; 2009a).

Nel già vasto panorama olivicolo italiano, alcune cultivar di pregio che caratterizzano la produzione olivicola Siciliana, sono state utilizzate per l'ottenimento d'incroci, con prevalente destinazione per l'oliva da mensa.

Allo scopo di ottenere un prodotto di pregio e precoce per contrastare la rilevante quota di importazione di olive da mensa, il CRA ha effettuato oltre 500 incroci, dai quali sono state ottenute 336 piante, che derivavano da Tonda Dolce di Partanna e Nocellara del Belice al fine di sfruttare da un lato la precocità della prima e dall'altro le ottime caratteristiche produttive della seconda. Parallelamente negli anni '90 sono stati effettuati incroci tra la Nocellara Messinese (Bottari e Spina, 1952) particolarmente apprezzata per alcune caratteristiche ma con una legnosità della polpa eccessiva e la Buscionetto che è caratterizzata da una polpa estremamente fine.

In questo lavoro si fa riferimento a cinque nuove accessioni ottenute dai precedenti incroci, alcuni dei quali sono già da anni sottoposti a valutazione e dopo una prima fase di caratterizzazione primaria (Fodale *et al.*, 2011), mediante valutazione dei parametri agronomici e morfologici, delle prime produzioni ottenute e del trasformato, sono ora sottoposti a caratterizzazione molecolare, per un esatto inquadramento in relazione ai parentali. I marcatori molecolari scelti sono i microsatelliti che in molti recenti studi sono stati utilizzati sia per la discriminazione varietale e l'assegnazione dell'origine geografica (Muzzalupo *et al.*, 2009b) che per i test di paternità (Rekik *et al.*, 2008) in quanto altamente polimorfici ed altamente riproducibili.

### Materiale e metodi

Il materiale vegetale utilizzato per l'estrazione del DNA è stato raccolto da piante presenti presso i campi sperimentali del CRA-ACM di Acireale (CT).

\* innocenzo.muzzalupo@entecra.it

Le caratteristiche degli incroci oggetto di studio sono:

- Nocellara del Belice x Tonda Dolce di Partanna
  - 3 A - TDxNB 1: precoce raggiungimento di elevati contenuti in olio;
  - 3 B - TDxNB 3: peso elevato del frutto ed elevata resistenza alla compressione;
  - 3 D - TDxNB 5: ridotto vigore della pianta;
  - 3 E - TDxNB 4: peso elevato del frutto, eccellente rapporto polpa/nocciolo e facile distacco della polpa dal nocciolo, elevato contenuto in zuccheri riduttori e buona precocità;
- Nocellara Messinese x Buscionetto
  - 3 C - NMxBU 1: produzione costante, distribuzione al 95% dei calibri tra 18 e 22, ottimo rapporto polpa/nocciolo e facile distacco della polpa, elevata resistenza alla compressione, ridotta legnosità della polpa, contenuto in zuccheri riduttori medio e contenuto in olio su sostanza secca medio alto.

Il DNA è stato estratto dalle foglie (100 mg) secondo il protocollo di Spreht *et al.* (1982)

Le piante di ulivo sono state genotipizzate a livello di nove loci microsatelliti nucleari: GAPU59, GAPU71A, GAPU71B, GAPU103A, DCA09, DCA18, UDO12, UDO28 e UDO39 selezionati tra quelli presenti in letteratura e che sono risultati essere particolarmente informativi (Muzzalupo *et al.*, 2009b; Baldoni *et al.*, 2009). La reazione di PCR e le condizioni di amplificazione utilizzate sono descritte in Muzzalupo *et al.* (2009b), utilizzando primers marcati (6-FAM) e l'elettroforesi è stata condotta su un 3130 Genetic Analyzer (ABI); per l'elaborazione statistica dei dati ottenuti sono stati utilizzati i software e le metodiche descritte in Rekik *et al.*, 2008.

### Risultati e discussioni

Il numero di alleli individuati, la loro dimensione in paia di basi, e l'eterozigosità osservata e attesa di ciascun locus SSR sono riportati in tabella 1.

I loci analizzati sono tutti polimorfi con un numero di alleli che varia da 2 a 6 ed un valore medio di 3,9. La variabilità genetica all'interno della popolazione totale, in considerazione del basso numero di varietà, è piuttosto elevata come indicato dagli indici di eterozigosità attesa e osservata. L'eterozigosità osservata varia fra 0,000 e 0,667 (valore medio di 0,31), mentre quella attesa varia tra 0,209 e 0,614. Da un confronto tra i loci analizzati si evince che il potere discriminante varia tra un minimo di 0,260 per UDO12 a un massimo di 0,875 per DCA09 (tab. 1).

L'analisi delle frequenze di ciascuno degli alleli individuati nei 9 loci ha evidenziato che i valori più

elevati si osservano per l'allele di 212 bp del locus GAPU59 e per quello di 214 bp del locus GAPU71A (0,7778), mentre 5 alleli sono presenti una sola volta tra quelli individuati.

Il metodo di analisi dell'UPGMA (fig. 1) raggruppa tutti i campioni classificati in due gruppi principali, riconoscendo somiglianze genetiche ed eterogeneità all'interno e tra i campioni analizzati.

Tab. 1 - Numero, lunghezza, eterozigosità osservata (Ho) e attesa (He) e potere discriminante (PD) per i 9 loci SSR studiati.

Tab. 1 - Number, length, heterozygosity observed (Ho) and expected (He) and discrimination power (PD) for the 9 SSR loci employed.

Loci	n. alleli	dimensioni (bp)	Ho	He	PD
DCA 9	6	162-210	0,222	0,203	0,875
DCA 18	4	169-181	0,222	0,294	0,757
GAPU 59	3	208-222	0,667	0,614	0,556
GAPU 71A	3	210-223	0,556	0,614	0,521
GAPU 71B	4	117-144	0,111	0,209	0,828
GAPU 103A	4	150-184	0,333	0,346	0,746
UDO 12	2	166-193	0,111	0,447	0,260
UDO 28	4	143-184	0,667	0,334	0,793
UDO 39	5	106-232	0,216	0,216	0,764
Valore medio	3,9	106-232	0,321	0,632	0,674

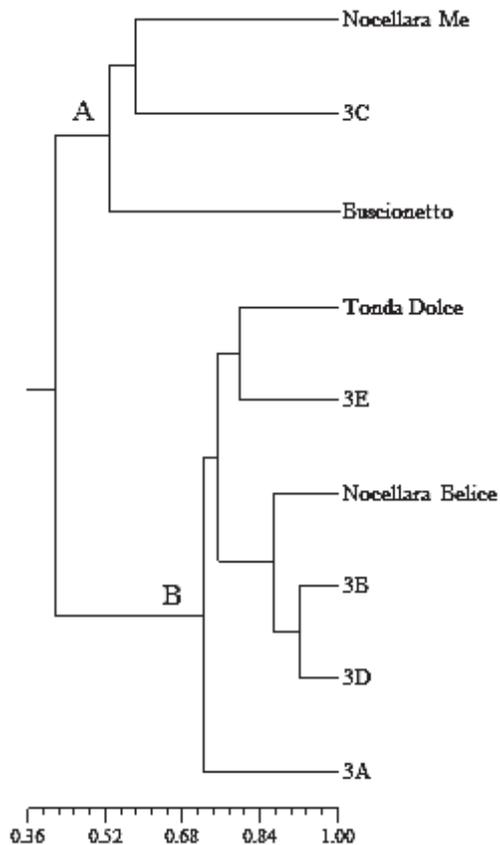


Fig. 1 - Dendrogramma risultante da appaiamenti successivi.  
Fig. 1 - Dendrogram obtained by repeatedly merging data into larger groups.

All'interno dei due cluster troviamo nel primo (A) la 'Nocellara Messinese', la 'Buscionetto' e l'incrocio denominato '3C'; nel secondo (B) troviamo invece la 'Tonda Dolce', la 'Nocellara del Belice' e gli incroci denominati '3A', '3B', '3D' e '3E'. I valori di similarità tra le piante all'interno dello stesso raggruppamento sono piuttosto elevati e ciò conferma un'alto grado di parentela tra le piante dello stesso cluster.

### Riassunto

Nel già vasto panorama olivicolo italiano, alcune cultivar di pregio che caratterizzano la produzione olivicola Siciliana, sono state utilizzate per l'ottenimento d'incroci con prevalente destinazione per l'oliva da mensa. Alcuni di questi incroci sono già da anni sottoposti a valutazione e dopo una prima fase di caratterizzazione primaria, (valutazione dei parametri agronomici e morfologici delle prime produzioni ottenute e del trasformato) sono ora sottoposti a caratterizzazione molecolare, per un esatto inquadramento in relazione ai parentali. L'obiettivo del lavoro è la caratterizzazione molecolare per una corretta classificazione delle nuove accessioni, all'interno del vastissimo patrimonio olivicolo italiano.

**Parole chiave:** dieta Mediterranea, genotipizzazione, *Olea europaea*, olive da tavola, SSR.

Ricerca finanziata dal progetto RGV-FAO.

### Bibliografia

- BALDONI L., CULTRERA N.G., MARIOTTI R., RICCIOLINI C., ARCIONI S., VENDRAMIN G.G., BUONAMICI A., PORCEDDU A., SARRI V., OJEDA M.A., TRUJILLO I., RALLO L., BELAJ A., PERRI E., SALIMONTI A., MUZZALUPO I., CASAGRANDE A., LAIN O., MESSINA R., TESTOLIN R., 2009. *A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping*. Mol. Breed. 24: 213-231.
- BOTTARI V., SPINA P., 1952. *Le varietà di olivo coltivate in Sicilia*. Istituto Poligrafico dello Stato.
- FODALE A.S., MULE' R., TUCCI A., TAGLIAVIA M., FODALE R., 2011. *Caratterizzazione primaria di 4 nuove accessioni di olivo ottenute per incrocio tra 'Nocellara del Belice' e 'Tonda dolce Partanna'*. Acta Italus Hortus, 1: 150-154
- MUZZALUPO I., CHIAPPETTA A., BENINCASA C., PERRI E., 2010. *Intra-cultivar variability of three major olive cultivars grown in different areas of central-southern Italy and studied using microsatellite markers*. Sci. Hortic-Amsterdam, 126: 324-329.
- MUZZALUPO I., FODALE A., LOMBARDO N., MULÈ R., CARAVITA M.A., SALIMONTI A., PELLEGRINO M., PERRI E., 2007. *Genetic diversity and relationships in olive Sicilian germplasm collections as determined by RAPD markers*. Adv. Hort. Sci., 21: 35-40.
- MUZZALUPO I., PERRI E., 2009a. *Genetic diversity in olive tree cultivars from Italy and other countries of the Mediterranean basin as revealed by RAPD and SSR molecular marker*. Adv. Hort. Sci., 23: 263-275.
- MUZZALUPO I., STEFANIZZI F., PERRI E., 2009b. *Evaluation of olives cultivated in Southern Italy by Simple Sequence Repeat markers*. HortScience, 44: 582-588.
- REKIK I., SALIMONTI A., GRATI KAMOUN N., MUZZALUPO I., PERRI E., REBAI A., 2008. *Characterisation and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers*. HortScience, 43: 1371-1376.
- SPECHT C.A., DI RUSSO C.C., NOVOTNY C.P., ULLRICH R.C., 1982. *A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi*. Anal. Biochem., 119:158-163.

## Giovanilità dell'olivo in micropropagazione

Cioccolanti T.<sup>1</sup>, Lodolini E.M.<sup>1</sup>, Neri D.<sup>1</sup>, Bastianelli M.<sup>1</sup>, Zuccherelli G.<sup>2</sup>, Capaccio V.<sup>2</sup> e Navacchi O.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche

<sup>2</sup> VITROPLANT S.p.A., Cesena

### Olive juvenility during *in vitro* micropropagation

**Abstract.** Juvenility is a stage of the ontogeny, referred to the whole or to a portion of the plant, characterized by a strong vegetative capacity and a temporary absence of flower differentiation. Juvenile plants show differences on tissue physiology and morphology (irregular formation of leaves and shoots, number of lateral buds, internodal length). This phase can be very long in Olive trees. Some authors observed juvenile traits in the shoots of several species after the *in vitro* propagation, but little is known about such behavior in the Olive. The present research evaluates micro-shoots, during multiplication phase after many cycles of subculture, obtained from cv Arbequina explants of 2000, 2007, 2010 and from cv Coratina and Frantoio of 2000 and 2010. Our hypothesis was that the return to juvenile characters is potentially due to the high number of subculture cycles, and that not all the shoots show the same level of juvenile characters. The possibility of a pre-selection of the micropropagated material (during multiplication or pre-acclimatization phase) with less juvenile characters was then evaluated. Shoots were measured for caliber, length, number of nodes, number of leaf/buds per nodes, anticipated shoots number, fresh and dry weight. Arbequina showed a higher morphological variability than Coratina and Frantoio that less frequently showed juvenile characters. This study suggests a different level of juvenile traits in the different shoots during micropropagation, according to the cultivar. This can have a possible influence during acclimatization and then after the planting in the field. Further experimentations are needed in order to find a reliable system for a valid pre selection of micropropagated material so to better predict the fruit bearing in the field.

**Key words:** *in vitro* culture, micropropagation, *Olea*, juvenile phase, early shoot selection.

### Introduzione

La moltiplicazione *in vitro* delle piante di olivo presenta una serie di vantaggi rispetto alle talee e all'innesto, per l'elevatissimo tasso di moltiplicazione e la sicurezza sanitaria in asepsi. Da non trascurare la più semplice commercializzazione internazionale, non soggetta a barriere di quarantena come per il materiale moltiplicato *in vivo*. Restano aperte alcune problematiche riferite ai protocolli di produzione *in vitro* e soprattutto alla minore rapidità di entrata in produzione rispetto alle piante da innesto o talea.

Il passaggio *in vitro* sembra infatti causare un ringiovanimento delle plantule messe a proliferare che per l'olivo potrebbe portare ad un ritardo significativo nell'entrata in produzione al momento del trapianto in campo. La giovanilità è infatti uno stadio fisiologico dei semenzali durante il quale la pianta non può essere indotta a fiorire e a fruttificare (Jona, 1992) e per l'olivo da seme questo stadio può durare anche vent'anni. La transizione allo stadio di maturità fisiologica non è correlata ad una mole fissa della pianta ma al superamento di una limitazione genetica.

Una volta superato questo limite assume valore regolativo il rapporto aereo radicale, e la soglia fisiologica relativa viene detta massa critica (Zucconi, 1992;1996). Superata la massa critica, la pianta entra in produzione a prescindere dalla propria grandezza fisica e dall'età temporale. Per questo è possibile anche per piante clonate da porzioni vegetative fisiologicamente mature, che non presentano uno stadio giovanile rigido, mostrare una condizione vegetativa temporanea (plasticità fenotipica). Questa condizione si manifesta dopo la propagazione ma non è legata ad un ritorno alla giovanilità, la maturità una volta raggiunta è infatti irreversibile.

La maturità è comunque uno stadio composto di più fasi, una vegetativa iniziale, una centrale equilibrata e una finale di insenilimento (Zucconi, 1991). Talee e innesti, ad esempio, mantengono caratteristiche di maturità legate al materiale di origine (topofisi), anche se, nella fase iniziale di campo, mostrano

\* emlodolini@libero.it

una diversa vigoria vegetativa legata proprio alla plasticità caratteristica dei vegetali superiori. Questo perché va ad accrescersi la sola porzione matura delle piantine, cioè la gemma apicale per l'innesto e tutta la porzione apicale della talea che proviene comunque da porzioni mature. Tuttavia alcuni autori (Peyvandi *et al.*, 2009) sostengono che il passaggio *in vitro* è in grado di cambiare lo stadio fisiologico, indipendentemente dal materiale di partenza, e addirittura il corredo genetico della plantula.

In effetti, le plantule da micropropagazione mostrano tempi variabili di entrata in produzione, una volta messe in campo, nonostante provengano da materiale clonale (Neri, 1990). Questo lascia presupporre che ci possa essere un differente posizionamento delle plantule all'interno delle varie fasi della maturità (rinvigorimento) piuttosto che un reale ritorno allo stadio giovanile. E' stata inoltre formulata l'ipotesi che un numero elevato di subcolture sia potenzialmente causa di ricomparsa dei caratteri giovanili ed è stata valutata la possibilità di individuare caratteri morfologici facilmente identificabili per poter selezionare in fase precoce (in moltiplicazione o pre-ambientamento) il materiale con minore attitudine giovanile.

**Materiali e metodi**

Sono state analizzate le cultivar di *Olea europaea* L. 'Arbequina', 'Coratina' e 'Frantoio' micropropagate nel 2010-11 dall'azienda "Vitroplant" di Cesena a partire da espianti di apici vegetativi di 2-3 cm, apicali di rami di un anno da piante in produzione. Gli espianti sono stati eseguiti in annate diverse: Arbequina nel 2000, 2007 e 2010, Coratina nel 2000 e 2010, Frantoio nel 2000. Le microtalee (germogli) originate dagli espianti dei diversi anni sono state prelevate da vasi in micropropagazione nella fase precedente l'uscita dal vitro. I germogli in vaso si presentavano come singole plantule o riuniti in ceppi (fig. 1), formatisi da un callo comune. I germogli erano di dimensioni comprese tra 0,7 a 10,7 cm di altezza e da



Fig. 1 - Ciuffi di germogli di *Olea europaea* L. micropropagati.  
Fig. 1 - Group of shoots of *Olea europaea* L. during micropagation.

0,1 a 2,2 cm di diametro, misurato alla base.

I substrati sono quelli abitualmente utilizzati dall'azienda per la produzione commerciale di olivo micropropagato, e sono caratteristici di ciascuna cultivar. Si è proceduto alla misura dei seguenti parametri biometrici dei germogli: altezza, calibro alla base, numero di nodi. Si è proceduto inoltre al conteggio del numero di foglie (ovvero dei meristemi ascellari o gemme) per germoglio, al fine di classificare i germogli in base a questo carattere rappresentativo del dimorfismo giovanile, arrotondando per eccesso i valori ottenuti dal rapporto foglie/nodo. Nella ricerca sono stati considerati più maturi i germogli con 2 foglie per nodo e più giovanili i germogli con 3 o 4 gemme per nodo (fig. 2).

Il materiale è stato esaminato con metodo distruttivo, separando i germogli appartenenti allo stesso ceppo di origine, per rilevare i parametri biometrici e il peso fresco dei singoli germogli. Tutti i germogli appartenenti allo stesso vaso sono stati essiccati in stufa a 75 °C per 72 ore, ottenendo il peso secco totale, dal quale è stato calcolato il peso medio del singolo germoglio. Per ogni varietà sono stati analizzati un numero variabile di vasi, secondo le disponibilità dell'azienda (tab. 1). Di conseguenza il numero delle

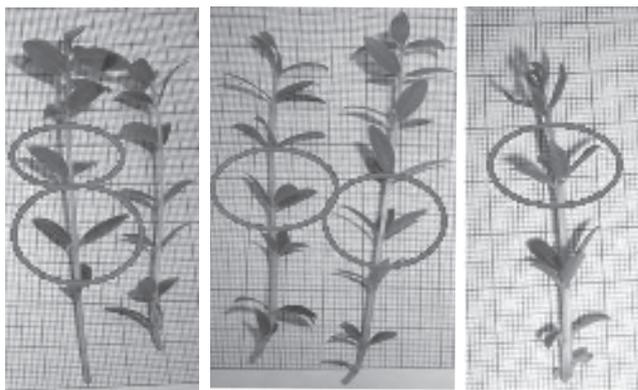


Fig. 2 - Germogli di *Olea europaea* L. micropropagati classificati in base al numero di foglie per nodo: 2foglie (sinistra), 3 foglie (centro), 4 foglie (destra).

Fig. 2 - Shoots of *Olea europaea* L. during micropagation classified by leaf number per node: 2 leaves (left), 3 leaves (middle), 4 leaves (right).

Tab. 1 - Numero di vasi e di germogli analizzati per varietà ed epoca di espianto.

Tab. 1 - Number of containers and shoots per varieties and culture age.

Cultivar	Numero di vasi	germogli
Arbequina 2000	2	112
Arbequina 2007	2	124
Arbequina 2010	3	137
Coratina 2000	1	24
Coratina 2010	3	93
Frantoio 2000	1	40

repliche (germogli) non è risultato omogeneo tra le diverse tesi.

Dall'analisi dell'altezza dei soli germogli con 2 foglie/nodo emerge che la cv Frantoio non è diversa da Coratina e Arbequina, mentre queste ultime risultano significativamente diverse tra di loro (fig. 3). Ampliando l'analisi a tutti i germogli e considerando oltre all'altezze, i diametri, non emergono differenze significative tra le cultivar e le epoche di espanto all'interno della stessa cultivar (figg. 4 e 5). Queste sono risultate quindi poco influenzate morfologicamente dalla permanenza *in vitro*. Il numero di foglie per nodo è risultato un indice di facile osservazione e di buona attendibilità che si mantiene costante sull'intero asse (fig. 2). La distribuzione degli esemplari che presentavano caratteri giovanili (3 e 4 foglie per nodo) è risultata equiparabile, per Arbequina, tra le diverse annate di espanto e si è attestata intorno al 60% della popolazione (figg. 6 e 7). Differenti distri-

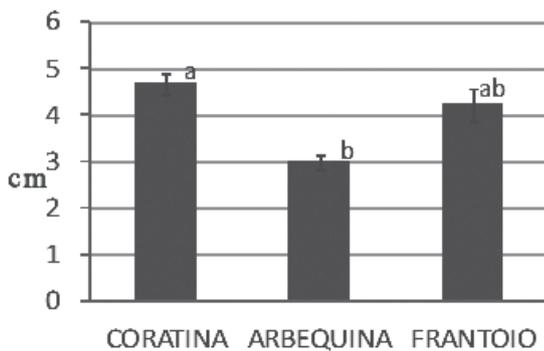


Fig. 3 - Confronto altezza media germogli con 2 foglie per nodo, su cv Arbequina, Coratina, Frantoio. Le colonne rappresentano la media + errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative (test di Tukey,  $p < 0,05$ ).

Fig. 3 - Average height of shoot with two leaves in Arbequina, Coratina and Frantoio. Columns represent average + standard error. Different letters represent significant differences (Tukey test,  $p < 0.05$ ).

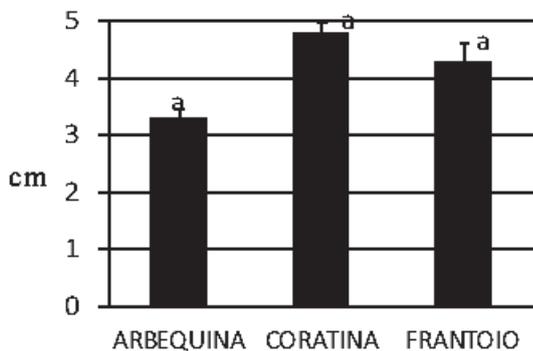


Fig. 4 - Confronto altezza media di tutti i germogli, su cv Arbequina, Coratina, Frantoio. Le colonne rappresentano la media + errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative (test di Tukey,  $p < 0,05$ ).

Fig. 4 - Average height of the all shoots in Arbequina, Coratina and Frantoio. Columns represent average + standard error. Different letters represent significant differences (Tukey test,  $p < 0.05$ ).

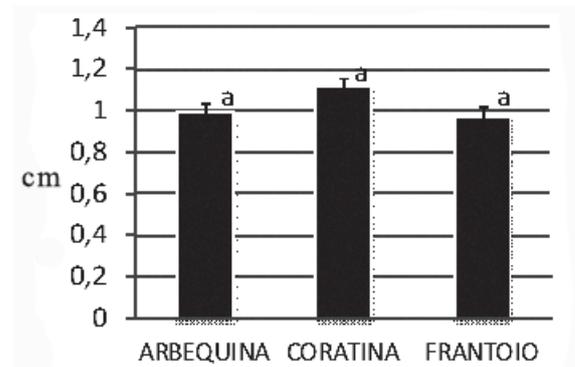


Fig. 5 - Confronto diametri medi di tutti i germogli, su cv Arbequina, Coratina, Frantoio. Le colonne rappresentano la media + errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative (test di Tukey,  $p < 0,05$ ).

Fig. 5 - Average basal diameter of the shoot in Arbequina, Coratina and Frantoio. Columns represent average + standard error. Different letters represent significant differences (Tukey test,  $p < 0.05$ ).

buzioni sono state registrate per Coratina e Frantoio che, a prescindere dalla data di espanto, si sono dimostrate meno soggette alla giovanilità (20% circa dei casi).

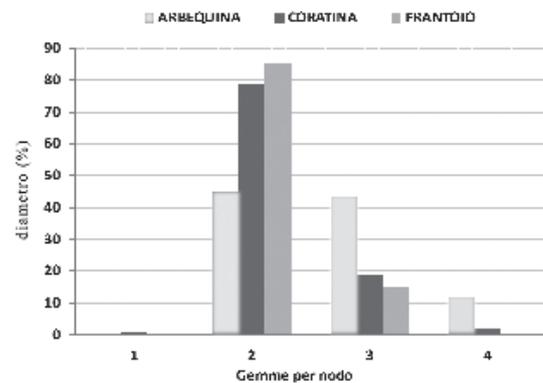


Fig. 6 - Distribuzione % dei germogli, al variare del numero di foglie per nodo, su cv Arbequina, Coratina, Frantoio. Fig. 6 - Percentage distribution of shoots with different leaves per node in Arbequina, Coratina and Frantoio.

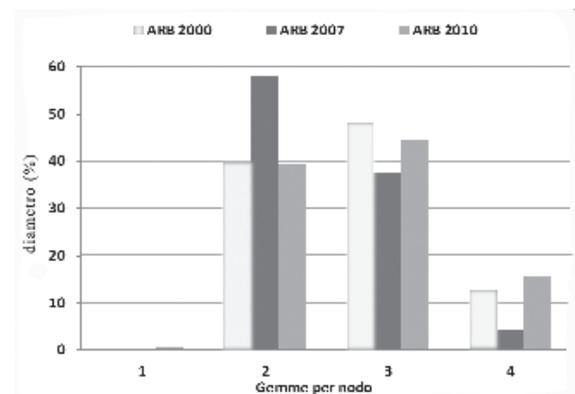


Fig. 7 - Distribuzione % dei germogli, al variare del numero di foglie per nodo, su cv Arbequina in espanti del 2000, 2007, 2010. Fig. 7 - Percentage distribution of the shoots according to the number of leaves per node in Arbequina in 2000, 2007 and 2010 explants.

Analizzando i germogli maturi (2 foglie per nodo) per le diverse cultivar, è emerso che Coratina presenta un'altezza maggiore dell'Arbequina, senza differenze significative di diametro. La differenza non è invece risultata significativa analizzando anche i campioni dei germogli ritenuti giovanili (con 3 e 4 foglie/nodo).

In ogni caso, dall'osservazione visiva si è potuto notare come Arbequina si sia comportata diversamente dalle altre cultivar, tendendo a produrre un maggiore accostamento. Coratina e Frantoio hanno sviluppato invece germogli singoli che a volte presentano uno o due germogli secondari, meno sviluppati rispetto al dominante.

L'analisi dei pesi freschi non ha evidenziato differenze significative tra le cultivar, né tra le diverse epoche di espanto all'interno della stessa cultivar.

Il peso secco medio dei germogli è risultato più basso in Arbequina e più alto in Coratina, senza differenze significative (dati non riportati).

## Conclusioni

I risultati ottenuti da questo studio preliminare sui germogli micropropagati di *Olea europaea* L. delle cultivar Arbequina, Coratina, Frantoio evidenziano la presenza di caratteri giovanili *in vitro*. Infatti sono evidenti manifestazioni tipiche di piante mature con 2 meristemi (foglie) per nodo assieme a caratteri tipici dei semenzali giovanili con 3-4 meristemi (foglie) per nodo. Tuttavia in nessun caso si sono riscontrate spinosità sui germogli, tipici delle piante ottenute da seme.

Dalla frequenza dei caratteri giovanili (3 e 4 foglie per nodo) risulta che questo parametro è caratteristico di ciascuna cultivar, avendolo riscontrato in modo simile in tutti i vasi analizzati della stessa cultivar senza relazione con l'anno di espanto. Questo ci fa ipotizzare che non ci sia correlazione tra giovanilità e permanenza *in vitro*. Anche analizzando l'altezza e i diametri non sono emerse differenze significative tra i germogli giovanili e quelli con caratteri di maturità. È risultata invece significativa la differenza di altezza per i germogli maturi con 2 foglie per nodo tra Arbequina e Coratina, dove quest'ultima risulta di maggiori dimensioni, mentre la Frantoio ha presentato valori intermedi.

La sperimentazione suggerisce di approfondire lo studio *in vitro* per dimostrare se e quanto i caratteri giovanili siano stabili in fase di moltiplicazione e con prove di campo per analizzare le reali ripercussioni sulla precocità di entrata in produzione delle diverse

tipologie di pianta ottenute a partire da micro-talee con 2, 3, 4 foglie per nodo.

Una precoce entrata in produzione delle piante moltiplicate *in vitro*, entro 3-5 anni dall'impianto in campo, suggerirebbe di escludere un ritorno allo stadio di giovanilità ma piuttosto si dovrebbe parlare di rinvigorimento delle piante micropropagate. In effetti una entrata in produzione scalare, delle piante ottenute dalle diverse tipologie di micro-germogli sopra descritte, evidenzierebbe un diverso posizionamento delle piante micro propagate all'interno delle fasi tipiche dello stadio di maturità. Tale ipotesi renderebbe commercialmente interessante la selezione precoce dei germogli.

## Riassunto

La morfologia di micro talee di Arbequina ottenute da espanti del 2000, 2007, 2010 e di Coratina e Frantoio (espanti del 2000 e del 2010) è stata studiata in fase di moltiplicazione *in vitro* durante più subculture nel 2011. L'Arbequina ha mostrato una marcata disformità morfologica, con differenze significative per i caratteri giovanili rispetto a Coratina e Frantoio. Lo studio lascia presupporre un diverso livello di giovanilità delle piante in fase di moltiplicazione *in vitro* con possibili ricadute sulle manifestazioni dei caratteri giovanili in campo, e probabilmente utile per la selezione precoce del materiale micropropagato.

**Parole chiave:** coltura *in vitro*, micropropagazione, stadio giovanile, selezione precoce germogli.

## Bibliografia

- JONA R., 1992. *Giovanilità*. In: Frutticoltura generale. REDA. 40-42.
- NERI D., 1990. *Giovanilità e ringiovanimento nelle piante arboree*. Frutticoltura, 12; 69-73.
- PEYVANDI M., NOORMOHAMMADI Z., BANIHASHEMI O., FARAHANI F., MAJAD A., 2009. *Molecular Analysis of Genetic Stability in Long-Term Micropropagated Shoots of Olea europaea L. (cv. Dezful)*. Asian Journal of Plant Sciences 8 (2): 146-152.
- ROUSSOS P.A., PONTIKIS C.A., 2002. *In vitro propagation of olive (Olea europaea L.) cv Koroneiki*. Plant Growth Regulation 37: 295-304.
- RUSSO G., RUSSO P., POTENZA M., 2009. *Risultati preliminari sul confronto tra differenti periodi di prelievo di espanti per la preparazione di colture in vitro di una varietà pugliese di olivo*. Italus Hortus.
- ZUCCHERELLI G., NAVACCHI O., 2009. *Propagazione in vitro dell'olivo: considerazioni tecnico-applicative*. Italus Hortus.
- ZUCCONI F., 2003. *Nuove tecniche per i frutteti*. Edagricole. Pp. 246.
- ZUCCONI F., NERI D., BRUNZINI L., SABBATINI P., 1996. *Nanizzazione delle piante arboree*. Spazio Verde. P128

## Indagine sulla qualità degli organi floreali della cultivar ‘Maiatica di Ferrandina’

Palese A.M.\*, Pirro S., Tataranni G. e Xiloyannis C.

*Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell’Ambiente, Università della Basilicata*

### Survey on the quality of floral organs of ‘Maiatica di Ferrandina’ olive cultivar

**Abstract.** A survey on the quality of male and female reproductive organs in flowers of olive trees belonging to “Maiatica di Ferrandina” cultivar (dual purpose variety, autochthonous of Basilicata region) was performed in 2010. Self-pollination and cross-pollination trials were also carried out. The percentage of ovary abortion was normal and did not affect the productive potential of the variety. Fruit set was good resulting in good commercial yield for all tests of pollination. An unusual scarcity of pollen was found on the anthers examined in 2010, which were empty and translucent. Nevertheless, the pollen taken from them showed a good vitality. Microscopic observations of the anthers, performed at the 2011 bloom, underlined a satisfactory production of pollen grains. The findings from this study confirm the influence of exogenous factors, especially the climatic ones, in controlling the productivity of this variety. Further investigations should be carried out to better understand the problem.

**Key words:** sterility, ovary abortion, pollen vitality, pollination, fruit set.

### Introduzione

La ‘Maiatica di Ferrandina’ è una varietà a duplice attitudine, autoctona della Basilicata (Lombardo, 2003). La tipicità di questa varietà è data, oltre che dalla forte radicazione geografica, dalla modalità di trasformazione delle olive da tavola che avviene secondo una tecnica tradizionale del luogo (il cosiddetto ‘metodo Ferrandina’) (Balatsouras et al., 1996; Brighigna, 1998). La bassa produttività di questa varietà, lamentata dagli olivicoltori della zona anche in annate di carica, determina forti oscillazioni nella quantità e nelle caratteristiche merceologiche del prodotto che annualmente viene immesso sul mercato con ovvie conseguenze economiche. I fattori che

influenzano la produttività dell’olivo sono spesso correlati alla biologia floreale della specie (Tombesi, 2003). Un gran numero di cultivar presentano problemi di sterilità che possono comprometterne significativamente la capacità produttiva. Pertanto si è inteso indagare sulla qualità degli organi riproduttivi, maschili e femminili, di fiori prelevati da olivi maturi della cv ‘Maiatica di Ferrandina’. Inoltre, sono state effettuate prove di impollinazione per valutare il grado di autocompatibilità e la sua risposta all’impollinazione incrociata con altre cultivar (Frantoio, Leccino e Picholine).

### Materiali e metodi

L’attività sperimentale è stata condotta nel 2010 presso l’azienda olivicola “Maffei” situata in agro di Ferrandina (MT) (40°29’ N, 16°28’ E) a 350 m sul livello del mare ove la cultivar prevalente è la Maiatica di Ferrandina. Sono comunque presenti in azienda piante di altre varietà non autoctone, quali Frantoio, Leccino, Picholine, messe a dimora di recente. Il clima dell’area in cui ricade l’azienda è semi-arido mediterraneo caratterizzato da una precipitazione media annua di 561 mm (media 1976-2006) e da temperature medie annuali comprese tra 15-17 °C. Alla mignolatura sono state scelte casualmente 6 piante di olivo mature della cv Maiatica di Ferrandina, omogenee per età e vigoria, allevate in coltura asciutta. Intorno alla chioma di ciascuna di esse sono state etichettate 5 branchette per le misure dei parametri floreali e le prove di impollinazione. Sono stati condotti i seguenti rilievi: a) conteggio delle mignole sulle branchette scelte; b) conteggio dei fiori e valutazione della percentuale dell’aborto ovarico su un numero rappresentativo di mignole prelevate poco prima della fioritura; c) osservazioni al microscopio del gineceo e dell’androceo di fiori campionati alla fioritura; d) test di vitalità del polline eseguito mediante colorazione con fluorescina diacetato (FDA) (Heslop-Harrison e Heslop-Harrison, 1970); e) prove di autoimpollinazione, impollinazione libera ed incrociata con Frantoio, Leccino e Picholine e valutazione della percentuale di allegazione.

\* assunta.palese@unibas.it

**Risultati e discussione**

La percentuale di aborto dell'ovario è risultata nella norma e tale da non compromettere le potenzialità produttive della varietà (tab. 1 e fig. 1). La percentuale di allegagione è rientrata nei valori considerati ottimali per una buona resa produttiva per tutte le prove di impollinazione (tab. 2) (Lavee, 1986). Una inaspettata scarsità di polline è stata riscontrata nelle antere esaminate nel 2010: esse si presentavano traslucide e vuote al contrario di quanto riscontrato per la cv Leccino (fig. 2). I campioni di polline esaminati hanno presentato una vitalità elevata (51,2%) secondo la classificazione di Rovira e Tous (2002) (fig. 3). Una scarsa produzione di polline è stata riscontrata da altri autori su varietà (Tanche, Verdale) definite per questo androsterili (Besnard *et al.*, 2000; Guerin e Sedgley, 2007). In particolare, Guerin e Sedgley

Tab. 1 - Parametri fiorali determinati su infiorescenze della cv Maiatica di Ferrandina (media ± deviazione standard).

Tab. 1 - Floral parameters measured on Maiatica di Ferrandina inflorescences (media ± standard deviation).

fiori/mignola	fiori perfetti/mignola	fiori imperfetti/mignola	% aborto dell'ovario
11±3,9	9±3,7	2±2,5	20

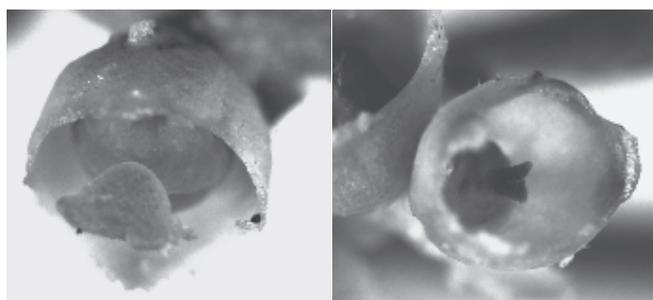


Fig 1 - A sinistra: fiore perfetto con ovario nella norma. A destra: fiore imperfetto con ovario abortito (cv Maiatica di Ferrandina).

Fig. 1 - On the left: perfect flower with a normal ovary. On the right: imperfect flower with aborted ovary (Maiatica di Ferrandina).

Tab. 2 - Numero di drupe per mignola (media ± deviazione standard) e percentuale di allegagione per le diverse combinazioni di impollinazione. Rilievo effettuato il 30-6-2010 (32 giorni dalla piena fioritura).

Tab. 2 - Fruit number per inflorescence (mean ± standard deviation) and fruit set percentage for the different pollination combinations. Measurement performed the 30 June 2010 (32 days after full bloom).

Tesi	N. drupe/mignola	% allegagione
Maiatica x Frantoio	0,34 ± 0,14	3
Maiatica x Leccino	0,32 ± 0,08	3
Impollinazione libera	0,35 ± 0,17	3
Maiatica x Maiatica	0,27 ± 0,06	3
Maiatica x Picholine	0,32 ± 0,16	3
Significatività	ns	-

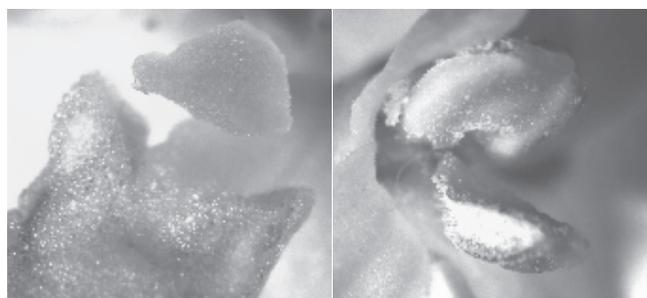


Fig. 2 - A sinistra: antere traslucide caratterizzate da scarsa presenza di polline (cv Maiatica di Ferrandina - 2010). A destra: antere con granuli pollinici (cv Leccino - 2010).

Fig. 2 - On the left: translucent anthers, lacking in pollen grains (Maiatica di Ferrandina - 2010). On the right: anthers with pollen grains (Leccino - 2010).

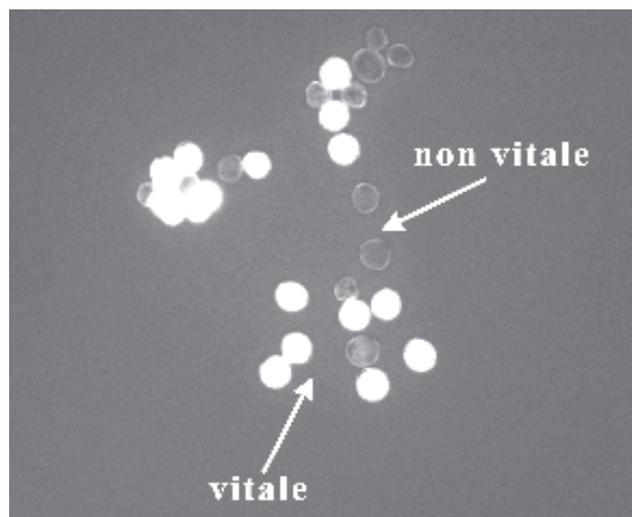


Fig 3 - Micrografia in epifluorescenza che evidenzia granuli pollinici vitali e non vitali (cv Maiatica di Ferrandina -2010).

Fig. 3 - Viable and non viable pollen grains observed under fluorescence microscopy (Maiatica di Ferrandina - 2010).

(2007), sebbene avessero recuperato con difficoltà il polline dalle piante studiate della cv Verdale, hanno evidenziato, mediante analisi di paternità, il suo contributo genetico come donatore di polline in 19 embrioni prelevati da altre varietà. Diversamente da quanto riscontrato nel 2010, le osservazioni al microscopio di antere mature di Maiatica di Ferrandina, eseguite alla fioritura 2011, hanno messo in evidenza una soddisfacente produzione di granuli pollinici (fig. 4).

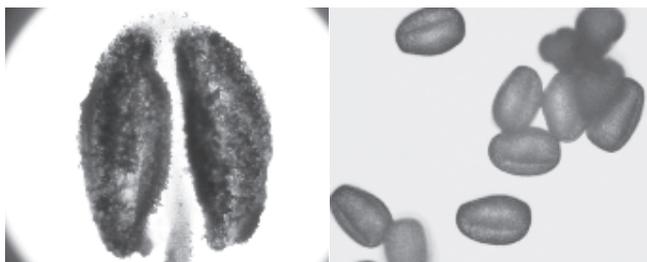


Fig. 4 - A sinistra: antere mature ricche di granuli pollinici. A destra: granuli pollinici (cv Maiatica di Ferrandina - 2011).

Fig. 4 - On the left: mature anthers with pollen grains. On the right: pollen grains (Maiatica di Ferrandina - 2011).

## Conclusioni

Le osservazioni condotte hanno messo in evidenza una qualità nella norma del gineceo ed una buona vitalità del polline prodotto dai fiori della cv Maiatica di Ferrandina. La anomalia nella produzione di polline, riscontrata nel 2010 e non confermata dalle osservazioni al microscopio condotte nel 2011, evidenzia la necessità di realizzare ulteriori indagini per verificare l'influenza dei fattori esogeni, specialmente di natura climatica, sulla qualità dell'androceo di questa varietà.

## Ringraziamenti

Si ringraziano sentitamente il Sig. Manuel Maffei per aver messo a disposizione l'azienda ed il Dott. Luca Lombardo per la sua preziosa collaborazione in campo ed in laboratorio.

## Riassunto

Nel 2010 è stata valutata la qualità degli organi riproduttivi, maschili e femminili, di fiori prelevati da piante di "Maiatica di Ferrandina" (varietà a duplice attitudine autoctona della Basilicata). Inoltre sono state effettuate prove di autoimpollinazione, impollinazione libera ed incrociata. La percentuale di aborto ovarico è risultata nella norma e tale da non compromettere le potenzialità produttive della varietà. La percentuale di allegagione è rientrata nei valori considerati ottimali per una buona resa produttiva per tutte le prove di impollinazione. Una inconsueta scarsità di polline è stata riscontrata nelle antere esaminate nel 2010 le quali si presentavano traslucide e vuote.

Nonostante ciò, il polline da esse prelevato ha presentato una buona vitalità. Osservazioni al microscopio delle antere, eseguite alla fioritura 2011, hanno invece messo in evidenza una soddisfacente produzione di granuli pollinici. Quanto riscontrato dal presente lavoro conferma l'influenza di fattori esogeni, specialmente di natura climatica, nel controllo della produttività di questa varietà e suggerisce di realizzare ulteriori indagini per la comprensione del problema.

**Parole chiave:** sterilità, aborto ovarico, vitalità del polline, impollinazione, allegagione.

## Bibliografia

- BALATSOURAS G., BRIGHIGNA A., DOUTSIAS G., GARRIDO FERNÁNDEZ A., 1996. *Table olive processing technology*. In: World Olive Encyclopaedia, Plaza & Janés Editores, S.A., Barcelona, Spain. Int. Olive Oil Council: 295-344.
- BESNARD G., KHADARI B., VILLEMUR P., BERVILLÉ A., 2000. *Cytoplasmic male sterility in the olive (Olea europaea L.)*. Theor. Appl. Genet., 100: 1018-1024.
- BRIGHIGNA A., 1998. *Le Olive da tavola. Varietà, Lavorazioni, Legislazione, Impiantistica e Analitica di controllo*, Edagricole, pp. 205.
- GUERIN J., SEDGLEY M., 2007. *Cross-pollination in Olive Cultivars*. Rural Industries Research and Development Corporation. pp 43.
- HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y., 1970. *Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate*. Stain Tech. 45: 115-120.
- LAVEE S., 1986. *Olive*. In: Handbook of fruit set and development. Monselise Ed., CRC Press Inc., Boca Raton (USA): 261-276.
- LOMBARDO N., 2003. *Descrizione delle principali cultivar di olivo da olio e da tavola italiane*. Olea: Trattato di Olivicoltura. (a cura di Piero Fiorino). Il Sole 24 ORE Edagricole: 169-193.
- ROVIRA M., TOUS J., 2002. *Pollen viability in several "Arbequina" olive oil clones*. Acta Hort. 586: 197-200
- TOMBESI A., 2003. *Biologia fiorale e di fruttificazione*. Olea: Trattato di Olivicoltura. (a cura di Piero Fiorino). Il Sole 24 ORE Edagricole: 35-55.

## Iniziative di cooperazione internazionale nel settore delle colture *in vitro* dell'olivo: esperienze condotte presso il DSAA di Perugia

Micheli M.<sup>1\*</sup>, Gardi T.<sup>1</sup>, El Behi A.W.<sup>2</sup>, Hafiz I.A.<sup>3</sup>, Hassanein A.M.<sup>4</sup> e Momeni A.H.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia

<sup>3</sup> Department of Horticulture, University of Arid Agriculture, Rawalpindi (Pakistan)

<sup>4</sup> Genetic Engineering Laboratory, Faculty of Science, Sohag (Egitto)

<sup>5</sup> Department of Horticulture, Agri-Jehad Organization, Kermanshah (Iran)

### International cooperation on *in vitro* cultures of olive: experiences of collaboration with the DSAA (University of Perugia)

**Abstract.** Due to the increased interest in oliviculture on an international scale, some foreign researchers routinely attend the “Laboratory of *in vitro* cultures” at the Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali-DSAA (University of Perugia) and they are involved in different scientific collaborations to gain specific knowledges and proficiencies in micropropagation and encapsulation technology of olive. In this work some interesting results are reported with respect to the *in vitro* stabilization of two iranian cultivars, the effects of kinetin on the proliferation of ‘Moraiolo’ and ‘Dolce Agogia’ and the improvement of protocols concerning the production of capsules and synthetic seeds of olive by *vitro*-derived propagules.

**Key words:** *Olea europaea*, micropropagation, stabilization, encapsulation, microcutting.

### Introduzione

Negli ultimi anni si sta assistendo ad una fortissima diffusione della coltivazione dell'olivo, soprattutto fuori dal bacino del Mediterraneo, che continua a rappresentare comunque la zona di produzione classica. Tra i Paesi principalmente coinvolti in questo fenomeno possiamo annoverare, tra gli altri, Stati Uniti, Messico, Brasile, Cile, Argentina, Australia, Nuova Zelanda, Iran, Egitto, Pakistan, Giappone, Thailandia, India e Cina, nella maggior parte dei quali la costituzione dei nuovi impianti si basa sull'utilizzo di poche

cultivar, per lo più di provenienza europea. Ciò dà un'idea solo parziale dell'importanza economica del “nuovo” vivaismo olivicolo mondiale e di come sia indispensabile rendere più funzionale ed organizzato il commercio del materiale di propagazione verso i Paesi olivicoli emergenti. Inoltre, risulta crescente la richiesta da parte di questi di conoscenze in materia di propagazione, tecniche colturali e tecnologie di trasformazione. In questo contesto si inseriscono le ormai numerose iniziative inerenti la formazione e la ricerca, che coinvolgono i Paesi produttori tradizionali e quelli emergenti e che si traducono in scambi tecnico-scientifici tra tecnici e ricercatori di istituzioni pubbliche e private interessate all'olivicultura.

A tale proposito, in tempi recenti, numerose sono state le esperienze condotte presso il “Laboratorio di colture *in vitro*” del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DSAA) dell'Università degli Studi di Perugia, attraverso collaborazioni diversificate, incentrate prevalentemente sulla micropropagazione dell'olivo e volte principalmente a contribuire all'accrescimento delle conoscenze e delle competenze dei ricercatori coinvolti, interessati a tecniche e tecnologie innovative nella prospettiva di poter disporre, anche nei loro Paesi di origine, di materiale vivaistico certificato (sia dal punto di vista sanitario che genetico), che possa qualificare le produzioni olivicole locali.

Di seguito saranno sinteticamente riportati alcuni di questi risultati, con particolare riferimento ad alcune ricerche inerenti la fase di stabilizzazione in asepsi (Esperimento 1), la proliferazione *in vitro* (Esperimento 2) e l'incapsulamento di propaguli unipolari *vitro*-derivati (Esperimento 3).

### Materiali e metodi

#### Esperimento 1

Oggetto di studio sono state due cultivar tra le più diffuse in Iran (‘Rooghani’ e ‘Zard’). Le ricerche sono

\*maurizio.micheli@unipg.it

state condotte utilizzando due diverse tipologie di materiale vegetale di partenza: nuovi germogli dell'anno prelevati direttamente da piante madri adulte (Sh) e barbatelle prodotte in vivaio e trapiantate in vaso (Cu). Nel primo caso, il prelievo in campo è stato effettuato in tre epoche diverse: a marzo e settembre del 2010 e a gennaio 2011. I getti, privati delle foglie, ma con porzioni basali di picciolo di 1-2 mm, sono stati bagnati in acqua corrente per 20 minuti e successivamente sono stati mantenuti a 4 °C avvolti in cotone inumidito, fino al momento dell'impiego. Le barbatelle, invece, sono state trapiantate in vaso utilizzando un terriccio di torba e perlite (3:1); dopo due mesi di sosta in piena aria, le piantine sono state posizionate in serra, eseguendo irrigazione periodica, concimazioni e un trattamento antifungino a base di metile tiofanato (2 g l<sup>-1</sup>), subito prima del prelievo degli espianti da utilizzare per la sterilizzazione.

La metodologia di base adottata per l'avvio delle colture asettiche ha sempre previsto l'impiego di porzioni uninodali di 5-10 mm di lunghezza, prive di foglie, come espianti di partenza. Questi sono stati mantenuti in immersione in una soluzione acquosa addizionata di acido citrico (100 mg l<sup>-1</sup>), prima della sterilizzazione. Per la stabilizzazione sono state impiegate le due formulazioni nutritive MS (Murashige e Skoog, 1962) e OMM (Mencuccini *et al.*, 1997), addizionate di 15 g l<sup>-1</sup> di saccarosio e 7 g l<sup>-1</sup> di agar. In ogni caso il valore del pH è stato tamponato al valore di 5,5. Nel corso delle attività sperimentali sono stati studiati numerosi fattori ed i loro effetti sulla stabilizzazione *in vitro* degli espianti di 'Zard' e 'Rooghani':

- *epoca del prelievo in campo*;
- *tipologia del materiale di origine degli espianti iniziali* (Sh e Cu);
- *cultivar* ('Rooghani' e 'Zard');
- *tipologia e concentrazione dell'agente sterilizzante e durata del trattamento* (NaClO alle concentrazioni di 10, 20 e 30% (v/v) per 20 minuti; HgCl<sub>2</sub> allo 0,07% per 10 o 20 minuti se utilizzato da solo oppure allo 0,05%, 0,1% e 0,2% per 10, 15 o 20 minuti, in combinazione con NaClO o etanolo o perossido di idrogeno; etanolo al 70% per 3 secondi, se in combinazione con NaClO, oppure al 30% per 15 minuti, se combinato con il trattamento di HgCl<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% per 15 minuti in combinazione con NaClO o con HgCl<sub>2</sub> o con entrambi;
- *composizione dei substrati di stabilizzazione* addizionati di PPM, alle concentrazioni di 0-0,5-1-2-3-5-10 ml l<sup>-1</sup>, oltre che di zeatina (1 mg l<sup>-1</sup>) o di 0,1-1-2 mg l<sup>-1</sup> di BAP.

### Esperimento 2

È noto che tra i fitormoni impiegati per promuovere la proliferazione *in vitro* dell'olivo la zeatina sembra essere quello maggiormente efficace, anche se molto costoso (Rugini e Baldoni, 2004). Lo scopo di questo esperimento è stato quello di studiare la possibilità di ridurre l'uso nella fase di moltiplicazione di due cultivar molto diffuse nell'Italia Centrale ('Dolce Agogia' e 'Moraiolo'). Sono stati impiegati espianti uninodali di 10 mm di lunghezza, prelevati da masse proliferate, che sono stati posti verticalmente su OMM agarizzato, addizionato di zeatina e kinetina, da sole o in combinazione, alle concentrazioni di 2 e 4 mg l<sup>-1</sup>. Al termine di tre successive subcolture di 45 giorni si è proceduto alla valutazione dell'influenza della componente ormonale sulla vitalità (frequenza di espianti verdi), sul coefficiente di moltiplicazione (nodi riutilizzabili per avviare subcolture), nonché sul numero e sulla lunghezza dei germogli proliferati.

### Esperimento 3

Da germogli di 'Moraiolo' proliferati *in vitro* secondo la procedura riportata da Mencuccini e coll. (1997) sono state prelevate porzioni uninodali di 3-4 mm di lunghezza, prive di foglie (*microtalee*). Queste sono state sottoposte ad incapsulamento secondo quanto riportato da Micheli e Standardi (2005). Poiché le *microtalee* sono espianti unipolari, per ottenere i semi sintetici sono state sottoposte, prima dell'incapsulamento, ad un trattamento induttivo rizogeno utilizzando una soluzione acquosa contenente 5 mg l<sup>-1</sup> di IBA e 15 g l<sup>-1</sup> di saccarosio, secondo la procedura riportata da Capuano *et al.* (1998), che prevedeva una successiva fase di pre-emissione delle radici (Procedura A). In alternativa, una parte delle *microtalee* è stata sottoposta al trattamento rizogeno subito dopo l'incapsulamento, mantenendole in immersione nella soluzione induttiva per tre giorni al buio in camera di crescita (Procedura B). Infine, è stato testato anche l'effetto di un breve periodo di stoccaggio al freddo; infatti, una ulteriore parte di *microtalee* è stata sottoposta ad una procedura identica a quella denominata B e poi mantenuta per 7 giorni a 4 °C al buio (Procedura C). In tutti i casi, i semi sintetici sono stati seminati su substrato agarizzato OMM privo della componente ormonale. Dopo 45 giorni di permanenza in camera di crescita, è stata effettuata la valutazione finale, rilevando la vitalità, la ripresa (frequenza di *microtalee* che hanno prodotto 1 o più germogli di almeno 3 mm di lunghezza), radicazione (frequenza di *microtalee* che hanno prodotto 1 o più radici di almeno 2 mm di lunghezza), conversione (frequenza di *microtalee* che hanno sviluppato plantule complete).

In tutti gli esperimenti i substrati e i contenitori sono stati sottoposti a cicli di sterilizzazione in autoclave a 115 °C per 20 minuti e le colture sono state poste in cella climatica caratterizzata da un fotoperiodo di 16 ore di luce ( $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e da una temperatura di  $22 \pm 2$  °C. I dati raccolti sono stati sottoposti alle procedure G.L.M. (General Linear Models) del S.A.S. (Statistical Analysis System) e la significatività saggiata mediante il test di Duncan ( $\alpha < 0,05$ ).

## Risultati e discussioni

### Esperimento 1

Relativamente al materiale prelevato da piante adulte in pieno campo (Sh), il problema maggiore è stato rappresentato dalla difficoltà di controllare lo sviluppo delle contaminazioni fungine (60% dei casi) e batteriche (30%), mentre il 10% degli espianti è risultato necrotizzato. Tutti i casi di batteriosi sono stati riscontrati su materiale prelevato a settembre; l'ipoclorito di sodio sembra essere più efficace nel controllare le contaminazioni fungine, mentre né l'etanolo, né il perossido di idrogeno sembrano efficaci nel controllo delle contaminazioni. 'Zard' è risultata più suscettibile alle micosi (71%) rispetto a 'Rooghani' (47%); gli espianti apicali sono risultati più sensibili alla sterilizzazione (36% di necrosi). Non sono emerse differenze significative tra le formulazioni nutritive. In conclusione, l'elemento principale che emerge da una analisi generale dei dati raccolti sembra essere rappresentato dal fatto che il problema delle contaminazioni riscontrato durante la sperimentazione possa ritenersi attribuibile soprattutto allo stato sanitario del materiale di origine, cioè delle piante madri allevate in Iran. Invece, utilizzando gli espianti prelevati dalle barbatelle (Cu), in nessun caso sono state rilevate contaminazioni (batteriche o fungine), presumibilmente grazie al maggiore livello di sanità delle piantine allevate in serra (Lambardi e Rugini, 2003). È stata riscontrata, invece, una maggiore sensibilità degli espianti iniziali alla sterilizzazione (circa il 90% dei casi), dovuta probabilmente alla minore coriaceità dei tessuti vegetali. Allo stato attuale il 10% di espianti sani è in stabilizzazione su OM addizionato di zeatina ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ).

### Esperimento 2

I dati raccolti hanno messo in evidenza in tutti i casi soddisfacenti livelli di vitalità, tranne quando la zeatina era combinata con la kinetina alla concentrazione maggiore. Relativamente al numero di germogli prodotti, si conferma quanto espresso da altri autori circa l'effetto del genotipo. Infatti, mentre in

'Moraiolo' il valore più elevato di questo parametro è stato registrato in presenza della combinazione delle due citochinine alla concentrazione più bassa (2,1), in 'Dolce Agogia' non sono emerse differenze significative tra questa combinazione e l'uso di zeatina da sola a  $4 \text{ mg l}^{-1}$ , che, nella corrente gestione di mantenimento delle colture presso il nostro laboratorio, rappresenta lo standard operativo. Invece, in entrambe le cultivar la maggiore concentrazione di zeatina ha indotto la maggiore lunghezza dei germogli ( $40,3 \text{ mm}$  per 'Moraiolo' e  $47,5 \text{ mm}$  per 'Dolce Agogia'), mentre la combinazione di citochinine con maggiore concentrazione sembra aver inibito l'allungamento, come riportato da altri autori (Ali *et al.*, 2009). Per quanto concerne il coefficiente di moltiplicazione, in 'Moraiolo' i valori più elevati sono stati riscontrati sotto l'effetto della sola zeatina a 2 e  $4 \text{ mg l}^{-1}$  (rispettivamente pari a 8,2 e 8,8); interessante sembra quanto registrato in 'Dolce Agogia', che ha fornito il coefficiente maggiore (8,4) in presenza della combinazione di zeatina e kinetina alla concentrazione più bassa, confermando precedenti studi sul positivo sinergismo di combinazioni di citochinine (García-Férriz *et al.*, 2002).

### Esperimento 3

I semi sintetici ottenuti secondo la Procedura B (trattamento induttivo dopo l'incapsulamento) hanno mostrato il 100% di vitalità e ripresa. In relazione alla sola attività rizogena, non sono emerse differenze statisticamente significative tra quella riscontrata nelle microtalee sottoposte alla Procedura A (40%) e alla Procedura B (43,3%), mentre leggermente inferiore (32,7%) è risultata nel caso delle microtalee sottoposte anche allo stoccaggio al freddo. Per quanto riguarda la conversione, essa è risultata pari al 36,7% per i semi sintetici ottenuti con la Procedura B, mentre del tutto insufficiente (13%) è risultata quella conseguita dai semi prodotti con la Procedura A. Ciò confermerebbe la possibilità di semplificare il procedimento per ottenere semi sintetici di olivo. Interessante, inoltre, sembra il dato registrato con i semi sintetici sottoposti allo stoccaggio al freddo (Procedura C), che con il 32,7% di conversione (statisticamente uguale a quella dei semi della Procedura B) confermerebbe la possibilità di ricorrere a questa pratica anche nei casi in cui, qualora la tecnologia dell'incapsulamento fosse impiegata nell'attività vivaistica, sia necessario conservare materiale vegetale per breve periodo, senza limitarne eccessivamente la capacità vegetativa e rizogena. Rimane, tuttavia, indispensabile utilizzare queste informazioni preliminari per cercare di ottimizzare la metodologia per incrementare le performance dei semi sintetici di olivo.

## Conclusioni

Le collaborazioni condotte con ricercatori di diversi Paesi nel settore delle colture *in vitro* dell'olivo presso il Laboratorio del DSAA di Perugia hanno consentito di raggiungere innanzitutto l'obiettivo di approfondire conoscenze ed acquisire esperienze da parte di tali soggetti. Quanto sinteticamente descritto in precedenza, ha permesso inoltre di produrre lavori scientifici pubblicati a livello internazionale, valorizzando gli studi svolti e il contributo di quanti hanno partecipato alle attività sperimentali.

## Riassunto

Sono riportati i principali risultati scientifici ottenuti attraverso alcune collaborazioni con ricercatori stranieri che hanno frequentato a vario titolo il "Laboratorio di colture *in vitro*" del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DSAA) dell'Università degli Studi di Perugia, interessati ad acquisire esperienze e competenze su alcuni temi inerenti la micropropagazione e la tecnologia dell'incapsulamento in olivo. In particolare, gli studi hanno riguardato la fase di stabilizzazione di due cultivar iraniane, l'uso della kinetina per la proliferazione *in vitro* di espianti di 'Moraiolo' e 'Dolce Agogia' e il tentativo di migliorare i protocolli di incapsulamento.

**Parole chiave:** *Olea europaea*, micropropagazione, stabilizzazione, incapsulamento, microtalea.

## Bibliografia

- ALI A., AHMAD T., ABBASI N.A., HAFIZ I.A., 2009. *Effect of different media and growth regulators on "in vitro" shoot proliferation of olive cultivar 'Moraiolo'*. Pak. J. Bot. 41(2): 783-795.
- CAPUANO G., PICCIONI E., STANDARDI A., 1998. *Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds*. J. Hort. Science. & Biotechnology. 73: 299-305.
- GARCÍA-FÉRRIZ L., GHORBEL R.R., YBARRA M., MARI A., BELAJ A., TRUJILLO I., 2002. *Micropropagation from adult olive trees*. Acta Hort. 586: 879-882.
- LAMBARDI M., RUGINI E., 2003. *Micropropagation of olive (Olea europaea L.)*. In: S.M. Jain & K. Ishii, Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Kluwer Ac. Pub.: 621-646.
- MENCUCINI M., MICHELI M., STANDARDI A., 1997. *Micropropagazione dell'olivo: effetto di alcune citochinine sulla proliferazione*. Italus Hortus, 4(6): 32-37.
- MICHELI M., STANDARDI A., 2005. *Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (cv. Moraiolo). I: Effects of pretreatments, their size and the coating*. Current Topics in Biotechnology (Research Trends) 2: 81-86.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 437-497.
- RUGINI E., BALDONI L., 2004. *Olea europaea - Olive*. In: R.E. Litz, Biotechnology of Fruit and Nut crops, Chap. 15, Noworty Way, Wallingford, Oxfordshire, UK: 404-428.

# Nuove visualizzazioni anatomiche dell'olivo attraverso la crio-microscopia elettronica a scansione di campioni idratati-congelati

Minnocci A.\* e Sebastiani L.

Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

## New anatomical visualizations of olive through cryo-scanning electron microscopy of frozen-hydrated samples

**Abstract.** In this article, the use of cryo-scanning electron microscopy in olive researches is reviewed by exploring how these results have clarified paradigms of plant functions and interactions with their ambient. Its power to arrest and stabilize plant parts in milliseconds, holding water and soluble components *in situ*, makes possible the analysis of the soluble elements at cell level and the distinction of gas and liquid containing regions, allowing examination at micrometer resolution and offering new views on olive plant function. Changes in the leaf structure during the entire development, accurately measurements of stomatal aperture and ion contents in guard cell during active transpiration, salt distribution in "in vitro" leaf tissues, fruit skin degeneration and salt uptake during debittering processes in table olive, analysis of particulate matter trapped from atmosphere by leaves, xylem characteristics and content in drought conditions was provided during several researches using cryo-SEM.

**Key words:** cryo-scanning electron microscopy, x-ray microanalysis, *Olea europaea*.

### Introduzione

La possibilità di esaminare la morfologia e l'anatomia dei diversi organi di olivo analizzando i campioni nel loro stato naturale di idratazione, attraverso l'uso della crio-microscopia elettronica a scansione (Cryo-SEM), è indispensabile per esaminare le strutture a livello cellulare, permettendo analisi originali sulla funzionalità della pianta (Mc Cully *et al.*, 2009 e 2010). Infatti, le strutture esterne e interne, se criofis-

sate, conservano la loro originale natura trifasica e distribuzione degli elementi chimici. Quindi la possibilità di mantenere il campione nella sua condizione naturale idratata, mentre se ne esplora la struttura e la composizione interna attraverso crio-fratturazione, è davvero unica. Negli ultimi anni abbiamo studiato per mezzo del Cryo-SEM, alcuni aspetti di foglie, fiori, frutti e colture *in vitro* di olivo e qui si riportano alcuni dei risultati su: le variazioni nella struttura della foglia durante il suo sviluppo (Marchi *et al.*, 2008); gli effetti dell'inquinamento atmosferico sul funzionamento degli stomi (Minnocci *et al.*, 1999; Tognetti *et al.*, 2001, 2002; Sebastiani *et al.*, 2002); l'assorbimento e lo stoccaggio del sale in foglie di piante micropropagate (Bracci *et al.*, 2008); le modifiche nel frutto in seguito all'uso di un processo innovativo di deamarizzazione (Servili *et al.*, 2008); la natura del particolato intercettato dall'aria dalle foglie (Minnocci e Sebastiani, 2010); i parametri dei vasi xilematici in piante sottoposte a lunghi periodi di siccità (Torres *et al.*, 2011).

### Materiali e metodi

Porzioni dei diversi organi di olivo sono state prelevate e immediatamente crio-fissate in azoto liquido, nel quale sono stati conservati fino all'analisi, con le modalità riferite nei diversi lavori citati (Bracci *et al.* 2008; Marchi *et al.*, 2008; Servili *et al.*, 2008).

### Risultati e discussione

#### Struttura delle foglie

Le variazioni nella capacità fotosintetica e la loro correlazione con le caratteristiche anatomiche sono state studiate durante l'intero sviluppo fogliare, confrontando una specie sempreverde come l'olivo con una a foglie decidue, *Prunus persica* (Marchi *et al.*, 2008). Attraverso l'utilizzo del Cryo-SEM, che mantiene tutte le caratteristiche tridimensionali e volumetriche naturali, è stato possibile dimostrare che il pieno sviluppo degli stomi è raggiunto prima in olivo

\* antonio.minnocci@sssup.it

che in pesco e che lo spessore del mesofillo si raddoppia, passando dallo stadio iniziale (fig. 1, in basso) fino alla fase finale di sviluppo della foglia, dove in olivo si raggiunge uno spessore doppio che in pesco. E' stato inoltre possibile calcolare che la superficie delle cellule del mesofillo, esposta agli spazi intercellulari per unità di superficie della foglia, diminuisce con la crescita dell'espansione fogliare, mentre la frazione di volume occupato dagli spazi intercellulari aumenta fortemente. Si è così potuto dimostrare che nell'olivo, specie sclerofilla, rispetto al pesco (latifolia), ha priorità la protezione meccanica delle cellule del mesofillo rispetto all'efficienza dei meccanismi fotochimici. Questo studio conferma l'importanza dello studio dei cambiamenti strutturali, se correlati con le caratteristiche funzionali, perché rivelano quali adattamenti vantaggiosi per sopravvivere in ambienti semi-aridi hanno differenziato le foglie di piante della macchia mediterranea nei confronti di quelle mesofite.

#### Effetti dell'ozono troposferico

In seguito alla fumigazione a lungo termine con livelli di ozono realistici è stato possibile dimostrare che nelle piante delle cultivar Frantoio e Moraiolo si rilevano riduzioni sia nella superficie traspirante degli stomi che nei parametri degli scambi gassosi, mentre sintomi visibili appaiono solo nelle foglie della cultivar Moraiolo (Minnocci *et al.*, 1999).

Tali risultati sono stati ottenuti su campioni di foglie nel loro stato naturale, che hanno conservato le reali aperture e densità stomatiche, non modificate dalla fissazione chimica e successiva disidratazione. Le aperture stomatiche sono diminuite in entrambe le cultivar rispetto ai loro controlli, più nel Frantoio (63,6%) che nel Moraiolo (54,8%), mentre la densità stomatica è aumentata in entrambe. La relativa superficie traspirante stomatica in Frantoio varia dallo 0,54% (controllo) allo 0,27% (trattato) della superficie fogliare totale e da 0,79% (controllo) allo 0,42% (trattato) in Moraiolo. Questo significa che durante la fumigazione le foglie di Moraiolo sono state potenzialmente in grado di assorbire ozono 1,5 volte rispetto a Frantoio. Questo può spiegare perché le foglie hanno mostrato i sintomi solo in Moraiolo. Ulteriori studi fisiologici e biochimici eseguiti su impianti di Frantoio e Moraiolo sottoposti ad un periodo più lungo (18 mesi) di trattamento (100 e 50 ppb con ozono), hanno confermato il diverso comportamento delle due cultivar studiate (Sebastiani *et al.*, 2002), e la maggiore sensibilità all'ozono di Moraiolo.

#### Effetti del "Global Change"

In campo, piante di cinque anni di due cultivar di

olivo (Frantoio e Moraiolo), sono stati esposti per otto mesi a concentrazione di CO<sub>2</sub> ambientale o elevata (Tognetti *et al.*, 2001). L'esposizione a elevata CO<sub>2</sub> incrementa il tasso di fotosintesi netta e diminuisce la conduttanza stomatica. Utilizzando il Cryo-SEM è stato possibile dimostrare che anche la densità degli stomi è diminuita in risposta ad elevata CO<sub>2</sub>.

#### Assorbimento e stoccaggio del sale

Piantine *in vitro* (fig. 1, in alto), originate da piante liberamente impollinate di cultivar 'Frantoio' e 'Moraiolo', sono state utilizzate per valutare nei germogli la tolleranza al sale (0, 50, 100 e 200 mM di

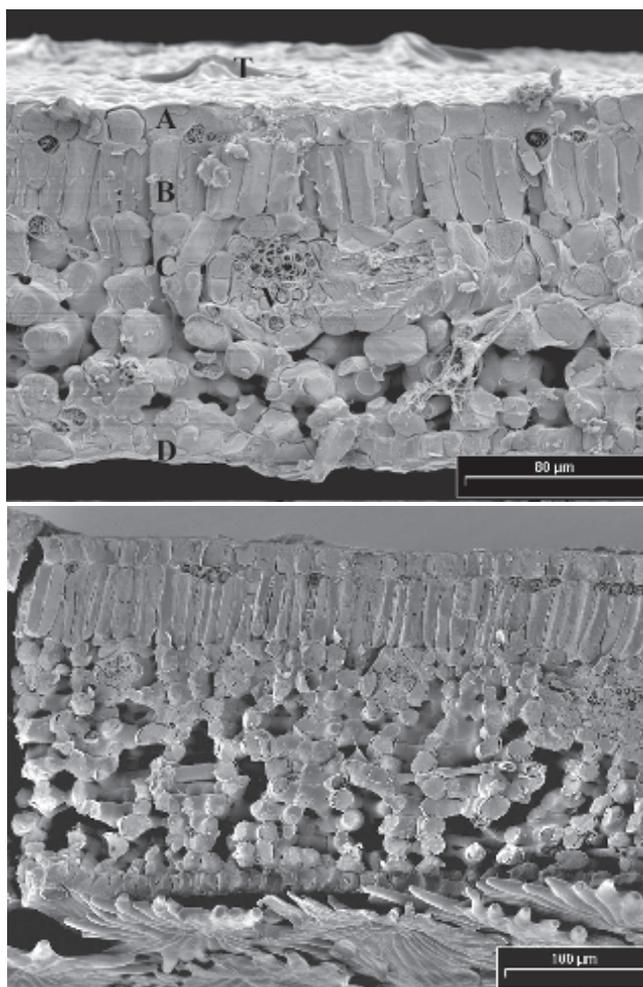


Fig. 1 - Immagine Cryo-SEM di foglie *in vitro* (in alto) e giovane *in vivo* (in basso), fratturate trasversalmente. I diversi strati cellulari sono mantenuti nel loro stato naturale, inclusi gli spazi intercellulari. A (epidermide superiore), B (parenchima a palizzata), C (parenchima spugnoso), D (epidermide inferiore), un tricoma visto di profilo (T) e, all'interno del parenchima spugnoso, la zona dei vasi fratturata trasversalmente (V).

Fig. 1 - Cryo-SEM of *in vitro* (upper) and young *in vivo* (lower) leaves, freeze fractured transversally. The different cell layers are preserved in their natural state, including the intercellular spaces. A (upper epidermis), B (palisade parenchyma), C (spongy parenchyma), D (lower epidermis), a trichome seen from the side (T) and, within the spongy parenchyma, a vein fractured transversally (V).

NaCl). La distribuzione degli elementi nei tessuti della foglia è stata studiata su campioni idratati-congelati con Cryo-SEM e microanalisi a raggi X a dispersione di energia. La distribuzione elementare ha mostrato che Frantoio Z e Moraiolo J sono le linee che più hanno accumulato sale all'interno delle foglie più vecchie, e Frantoio Z anche con una modalità tessuto-specifica. Il contenuto in Na è risultato maggiore nel parenchima spugnoso e a palizzata, mentre il Cl è risultato più alto nel parenchima spugnoso. In Frantoio Z e Moraiolo J la distribuzione di Cl è maggiore nello spugnoso che nel parenchima a palizzata, mentre in Frantoio C e Moraiolo Z la distribuzione è risultata simile. Grazie a questo approccio è stato quindi possibile dimostrare che Frantoio Z è la linea più resistente al sale (Bracci *et al.*, 2008).

#### *Modificazioni del frutto in seguito a "fermentazione naturale"*

I frutti contengono alte concentrazioni di fenoli, che vengono profondamente modificate dalle condizioni di salamoia, anche se i fattori coinvolti sono ancora in parte sconosciuti. In questo studio (Servili *et al.*, 2008) le olive sono state trattate con fermentazione naturale (senza un trattamento preliminare con NaOH), utilizzando *Lactobacillus pentosus* 1 MO. Olive della cultivar Coratina sono stati analizzate al Cryo-SEM e microanalisi a raggi X, sia sulla superficie della drupa che al suo interno, sui piani ottenuti con criofratture trasversali (fig. 2). I campioni del controllo risultano compatti ed integri sia all'esterno che all'interno, mentre dopo la fermentazione l'epicarpo appare degradato e tutti i tessuti interni risultano danneggiati, sia le cellule dell'epidermide che quelle parenchimatiche, il cui contenuto citoplasmatico appare coagulato e staccato internamente dalle membrane.

Le modifiche strutturali osservate nelle olive, dopo la fermentazione con *Lb. pentosus* 1 MO, può spiegare il rilascio immediato dei fenoli nella salamoia, perché il degrado della cuticola riduce la capacità delle cellule della polpa di trattenerli al loro interno. In questo modo sembra possibile spiegare il veloce rilascio di fenoli in seguito alla deamarizzazione biologica. Invece dall'analisi dei modelli di distribuzione di Na e Cl, che dopo la salamoia risultano assolutamente analoghi per tutti i campioni, si può affermare che il fenomeno di degenerazione della buccia non sia dovuto all'assorbimento del sale.

L'analisi delle caratteristiche strutturali e chimiche del frutto con il Cryo-SEM ha permesso di distinguere le modificazioni strutturali all'interno dei tessuti e la distribuzione degli elementi inorganici all'interno

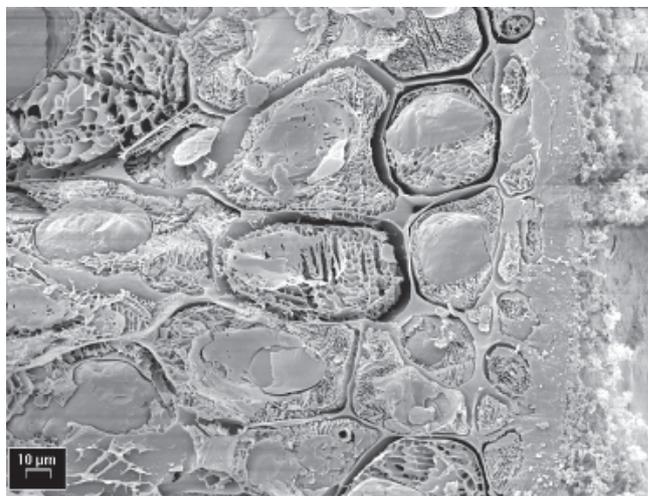


Fig. 2 - Immagine Cryo-SEM di drupa (Coratina, controllo) idratata-congelata e fratturata trasversalmente. Vicino al bordo destro è visibile in prospettiva la superficie esterna del frutto con il suo strato di cere epicuticulari. Sul piano di frattura, a partire dalla parte destra, sotto la superficie esterna è visibile uno strato compatto di cuticola ed immediatamente più in basso un singolo strato di cellule epidermiche ed i primi tre strati di cellule parenchimatiche.

*Fig. 2 - Cryo-SEM image of a freeze-fractured frozen hydrated fruit (Coratina, control). Close to the right border is discernible the fruit external surface in perspective showing the epicuticular wax layer. On the transversal freeze-fracture surface, beginning from the right side below the outer surface, a compact layer of cuticle is shown, and immediately below it, a single layer of epidermal cells and the first three layers of parenchyma cells are shown.*

delle cellule, mostrando le forti modificazioni avvenute a carico della cuticola e del contenuto delle cellule parenchimatiche in seguito alla fermentazione con *Lb. pentosus* 1 MO, nonostante il tempo relativamente breve di applicazione.

#### *Intercettazione del particolato atmosferico*

Le piante possono ridurre l'inquinamento da polveri sottili con le loro foglie intercettando le particelle sospese e agendo, quindi, in qualità di un filtro biologico. L'olivo potrebbe risultare utile per la riduzione del particolato, sia perché si tratta di un sempreverde, sia per l'abbondanza di "scaglie peltate" che coprono entrambe le superfici della foglia, caratteristiche positive in funzione della sua intercettazione. Le procedure di analisi standard comportano la rimozione di particelle dalla superficie della pianta o, in ogni caso, la disidratazione del campione. Per mantenere le originali caratteristiche fisiche e chimiche del materiale particolato sono state criofissate le foglie *in situ* e analizzate "idratate-congelate" con il Cryo-SEM e la microanalisi a raggi X (Minnocci e Sebastiani, 2010). In questo lavoro abbiamo applicato questo sistema di indagine fisica e chimica delle particelle intercettate dalla superficie superiore ed inferiore di foglie di

piante di olivo poste lungo le strade della città.

Le foglie di olivo hanno mostrato una elevata capacità di intercettazione, soprattutto per quanto riguarda la superficie inferiore, ed in particolare per il PM 2.5. L'olivo ha quindi dimostrato di essere una specie interessante per il ruolo potenziale di intercettazione di particelle sospese, come già indicato per altre specie arboree.

#### *Caratteristiche dello xilema in piante sottoposte a stress idraulico*

Per valutare l'influenza dei trattamenti irrigui sulle caratteristiche anatomiche e l'efficienza idraulica dello xilema di germogli dell'anno, sono stati confrontati campioni di piante non irrigate e irrigate a goccia (Torres-Ruiz *et al.*, 2011). La stessa parte del campione utilizzato per le misure di conducibilità idraulica è stata criofissata per l'osservazione al crio-SEM, per determinare la frequenza dei vasi xilematici (vasi xilematici mm<sup>-2</sup>) e la loro distribuzione per classi, ad intervalli di 2 micron di diametro. L'analisi anatomica non ha mostrato differenze tra i trattamenti nella frequenza dei vasi. Il numero dei vasi con diametro inferiore è superiore, tuttavia, nel non irrigato rispetto alle piante irrigate a goccia. Questo potrebbe spiegare la mancanza di differenze nella conducibilità idraulica (Kh) dello xilema rilevata tra i due trattamenti studiati. Infatti, l'incidenza della cavitazione è minore in vasi di diametro ridotto. Inoltre, la riduzione del diametro comporta una minore area delle punteggiature tra i vasi, che può ridurre l'incidenza dell'embolismo. Pertanto, il maggior numero di vasi con diametro ridotto indotto dal maggiore stress idrico subito dalle piante non irrigate si è dimostrato efficiente nel mantenere nelle piante simili condizioni di conducibilità idraulica rispetto a quelle irrigate.

#### **Riassunto**

L'applicazione della crio-microscopia elettronica a scansione ad alcune ricerche sull'olivo viene qui revisionato per esaminare alcuni paradigmi relativi alle funzioni dei diversi organi della pianta in risposta alle interazioni con il loro ambiente. La possibilità di stabilizzare le parti della pianta in millisecondi, tenendo acqua e componenti *in situ*, rende possibile l'analisi degli elementi solubili a livello cellulare e la distinzione tra gas e liquidi contenuti nelle aree esaminate, consentendone l'esame a risoluzione micrometrica e offrendo nuovi punti di vista su alcune funzioni della

pianta. Durante diverse ricerche da noi realizzate è stato possibile analizzare: i cambiamenti nella struttura fogliare durante l'intero sviluppo, le singole aperture stomatiche e il contenuto in ioni delle cellule di guardia in stress da ozono, la distribuzione del sale nei tessuti fogliari di piante "*in vitro*", la degenerazione dell'epicarpo della drupa durante i processi di deamarizzazione delle olive da tavola, il particolato atmosferico sequestrato dalle foglie, le caratteristiche dello xilema nelle condizioni di aridità delle piante.

**Parole chiave:** crio-SEM, microanalisi a raggi X, *Olea europaea*.

#### **Bibliografia**

- BRACCI T., MINNOCCI A., SEBASTIANI L., 2008. *In vitro olive (Olea europaea L.) cvs Frantoio and Moraiolo microshoot tolerance to NaCl*. Pl. Biosyst., 142: 563-571.
- MARCHI S., TOGNETTI R., MINNOCCI A., BORGHI M., SEBASTIANI L., 2008. *Variation in mesophyll anatomy and photosynthetic capacity during leaf development in a deciduous mesophyte fruit tree (Prunus persica) and an evergreen sclerophyllous Mediterranean shrub (Olea europaea)*. Trees, 22: 559-571.
- MCCULLY M.E., CANNY M.J., HUANG C.X., 2009. *Cryo-scanning electron microscopy (CSEM) in the advancement of functional plant biology. Morphological and anatomical applications*. Funct. Pl. Biol., 36: 97-124.
- MCCULLY M.E., CANNY M.J., HUANG C.X., MILLER C., BRINK F., 2010. *Cryo-scanning electron microscopy (CSEM) in the advancement of functional plant biology: energy dispersive X-ray microanalysis (CEDX) applications*. Funct. Pl. Biol., 37: 1011-1040.
- MINNOCCI A., PANICUCCI A., SEBASTIANI L., LORENZINI G., VITAGLIANO C., 1999. *Physiological and morphological responses of olive plants to ozone exposure during a growing season*. Tree Physiol., 19: 391-397.
- MINNOCCI A., SEBASTIANI L., 2010. *Analisi CryoSEM e EDXMA del particolato intercettato da piante di olivo in una rotatoria*. Flortecnica, 05: 25-27.
- SEBASTIANI L., MINNOCCI A., SCEBBA F., VITAGLIANO C., PANICUCCI A., LORENZINI G., 2002. *Physiological and biochemical reactions of olive genotypes during site-relevant ozone exposure*. Acta Hort., 586: 445-448.
- SERVILI M., MINNOCCI A., VENEZIANI G., TATICCHI A., URBANI S., ESPOSTO S., SEBASTIANI L., VALMORRI S., CORSETTI A., 2008. *Compositional and tissue modifications induced by natural fermentation process in table olives*. J. Agr. Food Ch., 56: 6389-6396.
- TOGNETTI R., SEBASTIANI L., VITAGLIANO C., RASCHI A., MINNOCCI A., 2001. *Responses of two olive tree (Olea europaea L.) cultivars to elevated CO<sub>2</sub> concentration in the field*. Photosynthetica, 39: 403-410.
- TOGNETTI R., COSTAGLI G., MINNOCCI A., GUCCI R., 2002. *Stomatal behaviour and water use efficiency in two cultivars of Olea europaea L.* Agr. Med., 132: 90-97.
- TORRES-RUIZ J.M., DIAZ-ESPEJO A., CHAMORRO V., FERNÁNDEZ J.E., SEBASTIANI L., MINNOCCI A., INFANTE J.M., 2011. *Influence of the water treatment on the xylem anatomy and functionality of current year shoots of olive trees*. Acta Hort., 922: 203-208.

## Produzioni olivicole: variabilità genetica e variabilità agrometeorologica

Mulas M.<sup>1\*</sup>, Cauli E.<sup>2</sup>, Bandino G.<sup>3</sup> e Sedda P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio, Università di Sassari

<sup>2</sup> Borsista della Regione Autonoma della Sardegna

<sup>3</sup> Dipartimento per la Ricerca nella Arboricoltura, AGRIS-Sardegna

### Olive yield: genetic and agrometeorological variability

**Abstract.** The trend of observation of olive crop yield on regional scale in Sardinia was possible by using data on processed olives available in factories for a 14-year period and organized in 15 sub regional areas. Data elaboration showed that year rainfall (particularly spring-summer rainfall) positively influenced more the yield of the following year than the current-season yield. Correlations between agrometeorological variables and genetic variability were studied in an experimental plot containing 20 olive cultivars located in South Sardinia (Villasor). Homogeneous field management and water supply made possible the comparison among cultivars, as more directly influenced by air temperature evolution. Hour-degree sums were calculated using the temperature thresholds of 7.5, 12.5 and 20 °C. The number of degree-units over 20 °C observed in October was negatively correlated with the next-year yield of about all the cultivars.

**Key words:** *Olea europaea*, alternate bearing, cultivar, rainfall, temperature.

### Introduzione

Il contesto generale dell'olivicoltura in Sardegna vede una larga diffusione di modelli di coltivazione tradizionali, nei quali la possibilità di somministrare irrigazione anche nella forma "di soccorso" è assolutamente limitata ad una porzione minoritaria degli oliveti (Mulas, 2011). In questo contesto è evidente come la diffusa alternanza di produzione degli impianti subisca notevolmente l'influenza delle variabili meteorologiche. Dopo aver riferito sulle osservazioni relative alle correlazioni tra temperature e produzione nell'intero territorio regionale, in questa nota vengono analizzate le correlazioni tra distribuzione delle piogge e produzioni indicizzate rispetto alla media del periodo (Mulas *et al.*, 2011). Considerata

anche l'importanza delle caratteristiche del genotipo rispetto all'influenza delle temperature sulle produzioni medie per pianta è stata impostata una ricerca mirata ad evidenziare questo aspetto nel sito sperimentale di Villasor (CA).

### Materiali e metodi

Partendo dai dati storici di produzione registrati dai conferimenti in frantoio sono state individuate 15 aree dislocate nelle principali zone olivicole della Regione Sardegna. I dati storici riferiti alle produzioni sono stati forniti da AGRIS-Sardegna. Le aree sono state scelte in modo da poter comprendere nel loro interno una stazione agrometeorologica di riferimento. Per ciascuna stazione è stato possibile ottenere i dati storici dei principali parametri meteorologici, quali le temperature giornaliere e le pluviometrie (fig. 1). La disponibilità dei dati meteorologici interessa un periodo di 9 anni a partire dal 1995.

I dati di produzione delle differenti aree sono stati indicizzati rispetto alla media degli anni a disposizione. Per ciascun area sono stati calcolati gli indici di alternanza (fig. 1). L'indice utilizzato è quello di Hoblin (Bandino *et al.*, 2001). Sono state ricercate le correlazioni lineari tra pluviometria e produzioni dello stesso anno e dell'anno successivo per ciascuna area e per ciascun mese.

Le osservazioni sulle relazioni tra fattori meteorologici e variabilità genetica sono state effettuate utilizzando i dati storici di produzione, per pianta, riferiti al campo collezione ubicato nel territorio di Villasor (CA), nella Sardegna meridionale (39° 21' di latitudine Nord) all'interno dell'area 5 (Villacidrese) già delimitata nello studio a livello regionale. Nel campo è stato possibile analizzare il comportamento produttivo di 20 varietà di olivo con 5 piante per varietà, disposte in maniera randomizzata (Bandino *et al.*, 2001).

Le somme termiche sono state calcolate in particolare modo per i periodi invernali, usando le temperature soglia di 7,5 e 12,5 °C e, in riferimento al notevole sviluppo vegetativo che si registra in primavera e in minor misura in autunno, sono state calcolate le

\*mmulas@uniss.it



n° area	denominazione	Indice di alternanza
area 1	Algherese	0,32
area 2	Sassarese	0,34
area 3	Berchidda	0,28
area 4	Parteolla	0,40
area 5	Villacidrese	0,66
area 6	Bassu marmillu	0,41
area 7	Oristanese	0,35
area 8	Seneghe	0,44
area 9	Paulilatino	0,33
area 10	Cuglieri-Bosa	0,47
area 11	Alta marmilla	0,48
area 12	Nuorese	0,45
area 13	Dorgali-Siniscola	0,34
area 14	Ierzu-Tertenia	0,37
area 15	Lanusei-Illorri	0,58

Fig. 1 - Localizzazione delle aree di osservazione delle produzioni olivicole e delle variabili agrometeorologiche.  
 Fig. 1 - Homogeneous areas of olive production and agrometeorological observation.

somme termiche riferite alla soglia di 20 °C. Le correlazioni sono state calcolate a seconda dei casi con lo stesso anno di produzione o con le produzioni dell'anno successivo.

## Risultati e discussione

L'indice di alternanza produttiva calcolato sulle produzioni totali delle aree, indicativo dell'intero andamento nel territorio regionale è stato di 0,35. L'area che si mostra più alternante con un indice di 0,66 è quella relativa al Villacidrese (area 5).

Nella tabella 1 sono riportati i coefficienti di correlazione esistenti tra le pluviometrie mensili di ciascun anno per ciascun area e le produzioni registrate nell'anno successivo. Dall'osservazione di questi dati emergono dei risultati a prima vista contrastanti sull'influenza che le precipitazioni possono avere sulle produzioni. Se si esaminano i valori nell'insieme delle aree si possono apprezzare delle differenze tra i diversi mesi. In particolare, le produzioni dell'anno successivo appaiono più correlate con le precipitazioni del mese di febbraio, di marzo, di maggio e di giugno a seconda dell'area. Queste correlazioni sono in generale positive per tutti i mesi, come nel caso del mese di febbraio per le aree 1, 2, 4, 6, 7, 8, del mese di marzo per l'area 14, e del mese di aprile per le aree 9 e 12.

Esaminando le correlazioni ottenute tra le pluviometrie mensili e le produzioni dello stesso anno (dati non mostrati), si può notare a prima vista un livello di

correlazione poco significativo, con valori tendenzialmente positivi. Molto più significativi appaiono invece i legami tra il cumulato di precipitazione dei mesi primaverili e le produzioni dell'anno successivo. Le correlazioni calcolate tra queste due variabili si mostrano sempre positive in numerose elaborazioni condotte aggregando i dati di diversi mesi o di tutte le aree.

Non è difficile interpretare questi andamenti nel senso di un più marcato effetto delle piogge primaverili sull'intensità del flusso vegetativo che condiziona la produttività dell'anno successivo, piuttosto che sul sostegno alla produzione pendente.

Per quanto riguarda le osservazioni svolte nel campo di Villasor su 20 cultivar di olivo, l'andamento delle produzioni relative alle singole cultivar e di tutto l'oliveto si mostrava estremamente sincronizzato con una elevata alternanza di produzione.

Le prime relazioni ricercate con gli andamenti termici, sono state quelle legate alle medie mensili registrate ogni singolo anno dalla stazione meteorologica ubicata a poca distanza dal sito. Dalle numerose elaborazioni effettuate si osserva che le correlazioni più significative si rilevano nei periodi primaverili e autunnali. Usando le temperature di soglia testate in diversi studi effettuati in passato e sulla base delle conoscenze attuali sul comportamento fenologico delle piante di olivo nei climi in cui la specie si è adattata, si è cercato di evidenziare l'influenza di differenti livelli termici sul ciclo produttivo.

Le relazioni con l'accumulo di ore di freddo infe-

Tab. 1 - Correlazioni esistenti (r) tra le precipitazioni mensili e le produzioni dell'anno successivo registrate nel periodo di osservazione per ciascuna delle aree olivicole.

Tab. 1 - Correlations (r) between month rainfall and next-year yield as observed in every area.

Mese	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	Area 8	Area 9	Area 10	Area 11	Area 12	Area 13	Area 14	Area 15
G	0,26	0,08	0,70*	-0,32	-0,46	-0,15	0,15	0,09	-0,03	0,61	-0,47	-0,48	0,25	-0,35	-0,32
F	0,67*	0,79**	0,56	0,67*	0,49	0,82**	0,78*	0,64*	0,19	0,56	0,58	0,21	0,53	0,51	0,19
M	0,37	0,51	0,48	0,61	0,31	0,44	0,47	0,42	-0,11	0,32	0,19	0,19	0,59	0,65*	0,37
A	-0,01	-0,02	0,10	0,30	0,38	0,31	-0,22	0,34	0,80**	0,03	0,28	0,92**	-0,37	0,32	0,36
M	0,42	0,51	0,74*	0,62	0,58	0,49	0,63*	0,53	-0,03	0,60	0,19	0,64*	0,16	0,87**	0,43
G	0,49	0,48	-0,49	0,56	0,77*	0,67*	0,62	0,59	0,24	0,41	0,56	0,23	0,58	0,37	0,20
L	-0,11	-0,01	-0,33	0,47	0,02	-0,13	-0,12	-0,36	-0,12	-0,32	-0,44	0,18	-0,63*	0,12	0,4
A	-0,36	-0,34	-0,19	0,12	-0,02	0,28	-0,07	-0,09	0,45	-0,32	0,44	0,72*	-0,31	0,26	0,43
S	0,13	0,0	0,31	0,10	0,73*	0,77*	0,62	-0,36	0,40	0,22	0,45	0,60	0,23	0,04	0,50
O	0,31	0,21	-0,47	0,43	0,92**	0,55	0,56	0,42	0,28	-0,12	0,52	0,02	0,18	-0,27	-0,14
N	-0,02	-0,27	-0,45	-0,14	-0,06	-0,60	0,13	-0,10	-0,30	0,07	-0,29	-0,21	-0,65*	-0,23	-0,23
D	0,16	0,28	0,06	0,74*	0,61	0,45	0,53	0,63	0,23	0,19	0,33	0,48	0,31	0,19	0,51

riori ai 7,5 °C nel mese di dicembre sembrerebbero mostrare delle differenze di comportamento per alcune cultivar, ma un limitato supporto statistico a tale influenza (dati non mostrati).

Le temperature soglia che meglio si adattavano a mostrare la loro influenza sulla produttività delle

piante erano quelle di 12,5 °C nel mese di dicembre, di 20 °C nel mese di aprile e di 20 °C nel mese di ottobre. Le correlazioni tra andamenti produttivi medi per pianta delle singole varietà e queste somme termiche sono riportate nella tabella 2. Qui sono riportate sia le correlazioni delle temperature con lo stesso

Tab. 2 - Correlazioni (r) tra somme termiche superiori ai valori soglia (ore di T > di 12,5; 20; 20 °C rispettivamente nei mesi di dicembre, ottobre e aprile) e produzioni di ciascuna cultivar (9 anni di dati).

Tab. 2 - Correlations (r) between hour-degree sums over threshold values (hours over 12,5; 20; 20 °C respectively in December, October and April) and cultivar production (data of 9 years).

Varietà	T > 12,5 °C mese di dicembre		T > 20 °C mese di ottobre		T > 20 °C mese di aprile	
	stesso anno	anno successivo.	stesso anno	anno successivo	stesso anno	anno successivo
Tonda di CA	0,22	-0,45	0,43	-0,72*	-0,25	-0,02
Nera di Gonnos	0,07	-0,40	0,48	-0,70*	-0,20	0,15
Manna	0,16	-0,50	0,45	-0,61	-0,15	0,17
Confetto	0,13	-0,45	0,45	-0,69*	-0,25	0,02
Majorca	0,10	-0,34	0,49	-0,67*	-0,14	0,24
Olianedda	0,19	-0,72*	0,04	-0,37	-0,09	0,04
Tonda di Villacidro	0,29	-0,71*	0,11	-0,4	-0,1	0,02
Terza grande	0,21	-0,62	0,12	-0,57	-0,24	-0,14
Terza piccola	0,26	-0,70*	0,10	-0,44	-0,12	0,0
Paschixedda	0,34	-0,71*	0,13	-0,36	-0,04	0,11
Corsicana da mensa	0,30	-0,71*	0,12	-0,42	-0,11	0,01
Semidana	-0,12	-0,06	0,67*	-0,64*	-0,08	0,42
Cariasina	-0,2	-0,17	0,70*	-0,64*	-0,19	0,26
Sivigliana da olio	-0,23	-0,15	0,67*	-0,56	-0,01	0,54
Pizz'e carroga	-0,07	-0,65*	0,12	-0,40	-0,03	0,25
Pezz'e quaddu	0,17	-0,72*	0,05	-0,33	-0,06	0,09
Sassarese	0,04	-0,31	0,59*	-0,75*	-0,26	0,10
Palma	0,02	-0,19	0,71*	-0,74*	-0,26	0,13
Corsicana da olio	-0,23	0,04	0,64*	-0,60	-0,14	0,51
Bosana	-0,12	-0,17	0,55	-0,65*	-0,10	0,35
Prod. tot del campo	0,03	-0,38	0,52	-0,67*	-0,17	0,24

anno di produzione che quelle legate all'anno successivo. La significatività di queste correlazioni mostra in maniera abbastanza evidente le relazioni che esistono tra le alte temperature del mese di dicembre e le produzioni dell'anno successivo. Queste relazioni sono inversamente proporzionali in maniera più o meno marcata a seconda della varietà. Le correlazioni con le somme termiche orarie calcolate per il mese di ottobre utilizzando come soglia la temperatura di 20 °C, appaiono relativamente elevate sia con le produzioni dell'anno che con quelle dell'anno successivo. In particolare, però, è possibile notare che le correlazioni più elevate sembrano essere quelle con le produzioni dell'anno successivo che sono negative.

### Riassunto

Lo studio a livello regionale delle dinamiche di produzione dell'olivo in Sardegna è stato realizzato utilizzando i dati delle produzioni registrate nei frantoi per 14 anni ed aggregati in 15 macroaree subregionali, di cui erano anche disponibili i dati dei principali parametri meteorologici. Dalle elaborazioni si osserva che il cumulato di precipitazioni annuali (soprattutto quelle primaverili-estive), più che condizionare il comportamento produttivo dell'anno in corso, è in grado di influenzare in maniera marcata le produzioni dell'anno successivo in senso positivo. Le relazioni

tra fattori meteorici e variabilità genetica sono state studiate in un campo collezione di 20 cultivar ubicato a Villasor (CA), nella Sardegna meridionale. L'omogeneità delle condizioni colturali e la disponibilità dell'irrigazione hanno reso possibile il confronto tra le cultivar, correlando in maniera diretta le loro produzioni con gli andamenti termici di ciascun anno. Le somme termiche sono state calcolate usando le temperature soglia di 7,5, 12,5 e 20 °C e diverse combinazioni di periodi. Il numero di ore con temperatura superiore a 20 °C nel mese di ottobre, in particolare, sono risultate correlate negativamente con la produzione dell'anno successivo per quasi tutte le cultivar.

**Parole chiave:** *Olea europaea*, alternanza di produzione, cultivar, precipitazioni, temperature.

### Bibliografia

- BANDINO G., MULAS M., SEDDA P., MORO C., 2001 - *Le varietà di olivo della Sardegna*. Consorzio Interprovinciale per la Frutticoltura, Cagliari: 253.
- MULAS M., 2011. *L'intensificazione colturale e l'olivicoltura della Sardegna*. Atti della "Giornata di Studio su Intensificazione Colturale in Olivicoltura". Sassari, 12 novembre 2010. Supplemento a "I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili", Anno 2010, Serie VIII, Vol. 7: 121 - 136.
- MULAS M., CAULI E., BANDINO G., SEDDA P., 2011. *Soglie termiche significative per la produttività dell'olivo*. Acta Italus Hortus, 1: 164-169.

## Studio della biologia florale e delle performance riproduttive di tre cultivar di *Olea europaea* L. tunisine

El Behi A.W., Orlandi F., Bonofiglio T., Romano B. e Fornaciari M.

Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia

### Study on flower biology and reproductive performances of three Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars

**Abstract.** Olive orchards in Tunisia are characterized by a variable fruit setting despite the abundant flowering of the plant. This may be due to the adoption of the monoculture by olive grower who, associating inadequate cultivars, have amplified the drawbacks of the self-incompatibility which is considered one of the principal causes of low fruiting in olive. In order to have a descriptive comprehension of the reproductive abilities and potentialities in olive, a study on floral biology of the three major Tunisian olive cultivars was conducted. It includes a survey on flowering level, hermaphrodite and staminate flowers percentages and fruit set rate under free pollination condition. The main results showed that the flower number per inflorescences in the three cultivars was 19,97 for cv'Chetoui', 21,1 for cv 'Chemlali' and 12,95 for cv'Meski. The uppermost flower abortion rate was registered for cv'Chetoui' however, the lowest one was of the cv'Chemlali'. The cv'Chetoui' registered the highest pollen viability (67,66 %) yet, the *in vitro* germinability values did not differ significantly between the cultivars. The fruit set rate was high in cv'Chemlali' (15,39 %) and the lowest one was registered in the cv'Meski' (5,67 %).

**Key words:** *Olea europaea* L. floral biology, viability, *in vitro* germination, fruit set.

### Introduzione

Lo studio della biologia della riproduzione in olivo coinvolge vari aspetti: morfologici, fenologici e citostologici, rivolti a comprendere il comportamento della pianta durante tutte le fasi del ciclo vegeto-ripro-

duativo. Malgrado una fioritura abbondante, l'olivo presenta una percentuale molto bassa di fiori che riescono ad allegare. Per questo motivo, approfondire le indagini rivolte ad identificare e caratterizzare fenomeni o ostacoli biologici che impediscono il miglioramento produttivo è fondamentale. Precedenti studi hanno descritto le correlazioni tra lo sviluppo florale, il numero di fiori per mignola e la produzione (Reale et al., 2006); le relazioni molto strette tra pistillo e tubetto pollinico (Cuevas, 1992) ed il ruolo cruciale dello stigma nel riconoscimento del polline e nel successivo sviluppo del tubetto pollinico (Serrano et al., 2008). Inoltre, lo studio del comportamento del tubetto pollinico lungo il pistillo permette di determinare il grado di auto-compatibilità in olivo (Bartolini e Andreini, 2011; Cuevas et al., 1994). Lo studio della biologia florale permette di seguire l'andamento della fioritura, la carica florale e la produzione. Tale indagine viene completata da test di vitalità e di germinabilità pollinica che permettono di stabilire le potenzialità riproduttive del microgametofito ovvero, la fertilità e la capacità fecondativa del polline (Dafni, 1992). Lo scopo del nostro lavoro è di estendere parte delle precedenti indagini alle tre principali cultivar di olivo tunisine al fine di migliorare il livello di conoscenza della loro biologia florale.

### Materiali e metodi

Lo studio ha interessato le tre cultivar di olivo tunisine di maggior interesse economico ovvero due cultivar da olio: cv 'Chetoui', la cv 'Chemlali' e una cultivar da mensa: cv'Meski'. Il materiale vegetale di origine genetica accertata, coevo e in buono stato fitosanitario è stato individuato presso la Banca del Germoplasma dell'Institut de l'Olivier di Tunisi. Per lo studio morfologico, dalla pre-antesi alla post-antesi, sono state prelevate 10-30 mignole da tre esemplari di ogni cultivar settimanalmente. Su queste sono state effettuate le seguenti indagini: calcolo del numero medio di fiori per mignola, percentuale di fiori aperti, numero medio di fiori ermafroditi e staminiferi per

mignola e numero di fiori allegati. La vitalità pollinica è stata saggiata su fiori prelevati durante tutto il periodo antesico. I granuli di polline sono stati subito colorati con diacetato di fluoresceina (FDA), sciolto in acetone e aggiunto ad una soluzione di saccarosio al 10 % e quindi osservati al microscopio ottico dotato di epifluorescenza e filtro di eccitazione BP 450-490 e filtro di sbarramento LP 515. (Heslop-Harrison e Heslop-Harrison, 1970). Il saggio della germinabilità pollinica *in vitro* è stato eseguito seminando granuli pollinici maturi raccolti da antere prelevate durante tutto il periodo antesico su un substrato liquido costituito da vari componenti secondo il procedimento proposto da Brewbaker e Kwack, (1963) e messi a germinare al buio e a 25 °C in stufa termostata. Il polline è stato osservato al microscopio ottico (DMLB, Leika, Germania).

## Risultati

I dati riportati in tabella 1 evidenziano che tra le tre cultivar il numero medio di fiori per mignola ha una bassa variabilità. La cv 'Chemlali' presenta il numero di fiori per mignola più alto seguita dalla cv 'Chetoui' e la cv 'Meski'. Le tre cultivar avviano il loro processo antesico contemporaneamente il 26/04/2011 per raggiungere la piena fioritura il 03/05/2011 (tab. 1). Il confronto dei dati di fioritura (tab. 2) riflette che le cultivars 'Chetoui' e 'Chemlali' presentano un numero medio di fiori per mignola superiore in pre-antesi a quello in post antesi. Invece, la cv 'Meski' presenta un numero medio di fiori per mignola non significativamente differente tra i due periodi. I dati relativi alle percentuali di fiori ermafroditi e staminiferi nelle mignola mostrano che la cv 'Chemlali' presenta sia la percentuale di fiori ermafroditi più alta che la percentuale di fiori staminiferi più bassa. Inoltre presenta la percentuale di frutti allegati più alta (tab. 2). La cv 'Chetoui' ha evidenziato la

Tab. 2 - Numero medio di fiori /mignola in pre e post-antesi, percentuale media di fiori ermafroditi e staminiferi ( $\pm$  errore standard).

*Tab. 2 - Number of flowers per inflorescence in pre and post anthesis, mean percentage of hermaphrodite and staminate flowers ( $\pm$  standard error).*

Parametri	cv Chetoui	cv Chemlali	cv Meski
Pre- antesi	21,67 $\pm$ 0,6	21,98 $\pm$ 0,79	12,93 $\pm$ 0,46
Post- antesi	17,60 $\pm$ 1,22	19,325 $\pm$ 0,43	12,98 $\pm$ 0,84
% fiori ermafroditi	79,84 $\pm$ 3,45	96,35 $\pm$ 1,03	89,81 $\pm$ 2,67
% fiori staminiferi	20,15 $\pm$ 3,45	3,64 $\pm$ 1,03	11,97 $\pm$ 2,07

Tab. 3 - Percentuale di frutti allegati.

*Tab. 3 - Fruit set rate.*

Cultivar	Impollinazione libera	
	% fiori perfetti	%frutti allegati
Chetoui	79,84	9,38
Chemlali	96,35	15,39
Meski	89,81	5,67

percentuale di fiori ermafroditi più bassa e la percentuale di aborto fiorale più alta tra le tre cultivar invece, la cv 'Meski' mostra valori intermedi (tab. 2). Dalle tabelle 2 e 3 si nota che malgrado una percentuale di fiori perfetti superiore (89,81 %), la cv 'Meski' presenta un tasso di allegazione inferiore alla cv 'Chetoui'. I risultati dei test di vitalità pollinica effettuati attraverso il metodo fluorimetrico (fig. 1) evidenziano che in pre-antesi, la cv 'Chetoui' presenta i valori più alti seguita dalle cv 'Chemlali' e 'Meski'. I valori massimi della vitalità pollinica sono raggiunti durante la piena fioritura e oscillano tra il 69,55 % e il 76,22 %. Successivamente, la vitalità tende a diminuire mantenendo però valori abbastanza alti tra 56 % e 65 %. In figura 2 si evidenzia che la germinabilità pollinica *in vitro* inizia ad aumentare subito dopo l'antesi toccando 3 giorni dopo i valori massimi in tutte le cultivar per calare una settimana dopo l'antesi in media del 7-8 %. In media in tutte e tre le cultivar la percentuale di germinabilità *in vitro* è bassa e si

Tab 1 - Numero medio di fiori / mignola ( $\pm$  errore standard) e percentuale di fiori aperti.

*Tab 1 - Number of flowers per inflorescence ( $\pm$  standard error) and percentage of opened flowers.*

Data	cv Chetoui		cv Chemlali		cv Meski	
	n. fiori/mignola	% fiori aperti	n. fiori/mignola	% fiori aperti	n. fiori/mignola	% fiori aperti
28 marzo 2011	18,60		17,10		13,10	
04 aprile 2011	23,10		24,40		12,50	
11 aprile 2011	22,30		23,10		13,66	
19 aprile 2011	21,60		21,80		13,67	
26 aprile 2011	18,30	27,32	18,40	19,02	12,60	23,80
03 maggio 2011	21,30	78,40	19,90	87,94	15,50	87,74
10 maggio 2011	14,70	99,32	20,20	100,00	10,20	100,00
Media	19,975 $\pm$ 0,84		21,1 $\pm$ 0,65		12,95 $\pm$ 0,42	

Fig. 1 - Vitalità pollinica (% ± errore standard).  
Fig. 1 - Pollen variability (% ± standard error).

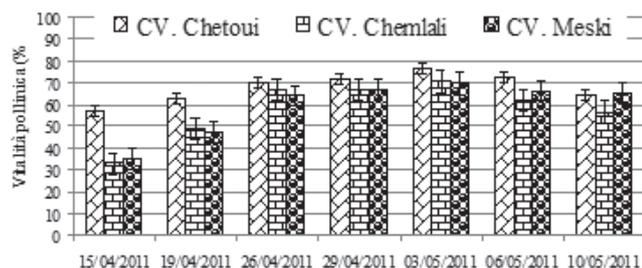
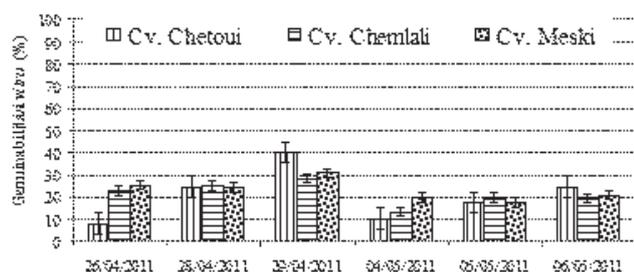


Fig. 2 - Germinabilità *in vitro* (% ± errore standard).  
Fig. 2 - In vitro pollen germination (% ± standard error).



Tab. 4 - Germinabilità *in vitro* con estratto pistillare.  
Tab. 4 - In vitro germinability with pistillar extract.

Cultivar	Germinabilità <i>in vitro</i> media (%)	
	Controllo	Estratto pistillare
Chetoui	20,80	11,96
Chemlali	21,50	36,31
Meski	22,95	16,06

aggira in torno a 20 % per la cv 'Chetoui'; 21,5 % per la cv 'Chemlali' e 22,95 % per la cv 'Meski'. Dalla tabella 4, si nota che l'aggiunta dell'estratto pistillare al substrato di germinabilità ha avuto effetti diversi sulla crescita del micro-gametofito. Mentre sulla cv 'Chetoui' e cv 'Meski' l'estratto ha diminuito la germinabilità *in vitro* senza per tanto inibirla del tutto, nella cv 'Chemlali' invece l'ha stimolata.

### Discussione

Le tre cultivar presentano un andamento della fioritura pressoché omogeneo e un numero medio di fiori per mignola poco variabile durante l'antesi. Il numero medio di fiori per mignola in pre-antesi è superiore a quello in post-antesi nelle cv 'Chetoui' che presenta inoltre il tasso di aborto fiorale più alto. In questo caso, si nota che ad un maggior carico florale in pre-antesi corrisponde un maggior numero di fiori affetti da aborto con un calo netto del tasso di allegazione probabilmente causato dalla competizione nella mignola tra fiori ermafroditi e quelli staminiferi (Reale et al., 2006). Il tasso di allegazione inversamente proporzionale alla percentuale di fiori stamini-

feri tra le cvs 'Chetoui' e 'Meski' fa presumere che nel caso di quest'ultima, esso sia parzialmente controllato dalla carica florale iniziale delle mignole e che il calo del tasso di allegazione sia dovuto oltre che all'aborto fiorale (11,97%) anche a quello ovarico (Cuevas et al., 1992). Riguardo le caratteristiche del microgametofito, la cv 'Chetoui' è considerata la più efficiente seguita dalla cv 'Chemlali' e la cv 'Meski'. I valori bassi di germinabilità *in vitro* non rappresentano un calo delle performance delle cultivar ma è stato evidenziato che tali valori, pur essendo bassi, sono in grado di produrre livelli di allegazione soddisfacenti *in vivo* (Dafni, 1992). I risultati ottenuti con l'aggiunta dell'estratto pistillare al substrato di crescita del polline portano a concludere che esso oltre al ruolo nutrizionale, sia anche coinvolto nel processo di riconoscimento del polline compatibile in olivo (Serrano et al., 2008).

### Conclusioni

L'avvio dell'antesi nelle tre cultivar è all'incirca contemporaneo con una fioritura pressoché omogenea durante tutto il periodo antesico.

La cv 'Chemlali' presenta la più alta carica florale seguita dalle cvs 'Chetoui' e 'Meski'.

Per la cv 'Meski', il tasso di allegazione è parzialmente controllato dalla carica florale iniziale che fa pensare al coinvolgimento di qualche forma d'incompatibilità.

La prova della germinabilità con l'estratto pistillare evidenzia da un lato un certo grado di auto-compatibilità della cv 'Chemlali'; dall'altro, evidenzia un certo grado di auto-incompatibilità delle cvs 'Chetoui' e 'Meski'.

### Riassunto

Lo studio della biologia florale in olivo coinvolge vari aspetti scientifici quali morfologici, fenologici e cito-istologici rivolti a comprendere il comportamento della pianta durante questa fase. Malgrado una fioritura abbondante, la percentuale di fiori che riesce ad allegare e quindi a trasformarsi in frutti è molto bassa. Per questo motivo, approfondire le indagini rivolte ad identificare e caratterizzare fenomeni o ostacoli biologici che impediscono il miglioramento produttivo è fondamentale. Lo scopo del nostro lavoro è migliorare il livello di conoscenza sulla biologia florale e sulle performance riproduttive di tre principali cultivar di olivo tunisine: cv 'Chetoui', 'Chemlali' e 'Meski'. Sul materiale prelevato, è stato eseguito uno studio della morfologia florale oltre a test di vitalità e di germina-

bilità *in vitro* del polline. I risultati hanno mostrato che durante il biennio di studio, il numero medio di fiori per mignola è costante ('Chetoui': 19,97; 'Chemlali': 21,1; 'Meski': 12,95). Il valore di aborto fiorale più basso è stato registrato nella cv 'Chemlali' mentre quello più alto nella cv 'Chetoui'. Inoltre, nella cv 'Chetoui' è stata registrata la più alta percentuale di vitalità pollinica seguita dalle cvs 'Chemlali' e 'Meski'. A differenza della vitalità, la percentuale di germinabilità *in vitro* più alta è stata registrata nella cv 'Chemlali' seguita dalle cv 'Chetoui' e 'Meski'. In condizioni di impollinazione libera, il tasso di allegazione più alto è stato registrato dalla cv 'Chemlali' (15,39 %); seguita dalla cv 'Chetoui' (9,38 %); e dalla cv 'Meski' (5,67 %). I risultati evidenziano che la cv 'Meski' risulta meno performante dal punto di vista produttivo.

**Parole chiave:** *Olea europaea* L., biologia fiorale, vitalità, germinabilità *in vitro*, allegazione.

## Bibliografia

- BREWBAKER J.L., KWACK B.H., 1963. *The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth*. Am. J. Bot. 50: 859-865.
- CUEVAS J., 1992. *Incompatibilidad polen-pistilo, proceso gaméticos y fruttification en cultivares de olivo (Olea europea L.)*. Tesis Doctoral. Universidad de Cordoba,.
- CUEVAS J., RALLO L., RAPOPORT H.F., 1994. *Staining procedure for the observation of olive pollen tube behaviour*. Acta Hort. 356(II): 264-267.
- DAFNI A., 1992. *Pollen and stigma biology*. In: Pollination Ecology: a practical approach. pp 250.
- HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y., 1970. *Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate*. Stain Technol. 30: 115-120.
- REALE L., SGROMO C., BONOFILIO T., ORLANDI F., FORNACIARI M., FERRANTI F., ROMANO B., 2006. *Reproductive biology of olive (Olea europaea L.) DOP Umbria cultivars*. Sexual Plant Reproduction. DOI 10.1007/s 00497-006-0032-6
- SERRANO I., SUÀREZ C., OLMEDILLA A., RAPOPORT H.F., RODRÍGUEZ- GARCÍA M.I., 2008. *Structural organization and cytochemical features of the pistil in olive (Olea europaea L.) cv. Picual at anthesis*. Sexual Plant Reproduction 21: 99-111.

## Uso del D-Mannitolo nell'ambito delle strategie di conservazione *in vitro* di olivo (*Olea europaea* L.)

Concezzi L.\*, Desantis F. e Gramaccia M.

3A Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria, Fraz. Pantalla di Todi (PG)

### D-Mannitol use for *in vitro* conservation strategies of olive (*Olea europaea* L.)

**Abstract.** The use of D-Mannitol in *in vitro* culture is long time well documented on several species with diverse aims. Among others, it is used as an osmotic agent reducing the plant capacity to absorb the organic and mineral components added to the culture medium. This paper reports the results of a trial aiming to verify how olive shoots respond to long time exposures to variable D-Mannitol concentrations. The trial was set up in order to assess if the slow growth induced by D-Mannitol can be considered as equivalent to that induced by low temperature storage. This latter method resulted indeed not successful in olive shoots under the slow growth conditions adopted in the *in vitro* genebank of Umbria Region.

**Key words:** Slow growth, osmotic regulation.

### Introduzione

Nell'ambito delle strategie di conservazione del germoplasma mediante la tecnica della coltura *in vitro*, si annovera anche l'utilizzo di sostanze che, aumentando la pressione osmotica nel substrato di coltura, riducono la capacità di assorbimento degli elementi nutritivi da parte delle cellule, determinando così un rallentamento della crescita dei germogli (Shibli *et al.*, 2006; Golmirzaie *et al.*, 1999). Il D-Mannitolo rientra in questa categoria di agenti osmotici ed è documentato in letteratura l'effetto ritardante sulla crescita in numerose specie sia arboree che erbacee (Shibli *et al.*, 1999; Charoensub *et al.*, 2004; Mitoi *et al.*, 2009). In olivo, alcuni studi (Leva *et al.*, 1994) mostrano invece che l'uso del D-Mannitolo come unica fonte di carbonio migliora gli aspetti della proliferazione rispetto al Saccarosio. La prova sperimentale qui descritta origina dalla difficoltà di adattamento delle varietà di Olivo, presenti nella Banca del germoplasma *in vitro* (allestita presso la 3A Parco Tecnologico

Agroalimentare dell'Umbria), al protocollo di conservazione alle basse temperature (Concezzi *et al.*, 2010) cui sono sottoposti tutti i genotipi in collezione. Data la scarsa adattabilità alla frigoconservazione a 4 °C delle cvs di Olivo presenti in collezione, si è voluto saggiare la possibilità di ricorrere al D-Mannitolo per simulare un effetto analogo a quello delle basse temperature (rallentamento della crescita, allungamento del ciclo delle subcolture), mantenendo però gli espianti sempre in cella climatica a 24 °C.

### Materiali e metodi

La prova sperimentale è stata eseguita sulla cv Tendellone ed è avvenuta in due fasi. La prima per verificare gli effetti diretti del D-Mannitolo sulla crescita degli espianti, la seconda per mettere in luce eventuali effetti indiretti sugli espianti dovuti alla esposizione di questi al D-Mannitolo per periodi di tempo prolungati.

#### Prima fase

Sono state valutate due differenti concentrazioni di D-Mannitolo, 1,5% e 3%, aggiunte al terreno di coltura utilizzato per Olivo (OMM con 3% di Saccarosio e 2mg/l di Zeatina) (Mencuccini *et al.*, 1997) sul quale sono stati fatti crescere gli espianti per due distinti periodi di tempo: il primo di 6 mesi (in 2 cicli consecutivi) ed il secondo di 12 mesi (in un unico ciclo). La prova sperimentale è stata impostata come segue:

- preparazione di microtalee uninodali (lunghezza tra 5 e 10mm) prelevate nella porzione centrale del germoglio;
- 7 repliche costituite da 5 tubi in vetro contenente ciascuno una microtalea e addizionati con circa 40ml di terreno fresco, con 0% (controllo), 1,5% (tesi A) e 3% (tesi B) di D-Mannitolo;
- posizionamento dei tubi in cella climatica a  $23 \pm 1$  °C con fotoperiodo di 16h di luce ed intensità luminosa di  $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Allo scadere del periodo di proliferazione previsto (6 mesi, due cicli consecutivi; 12 mesi, un unico ciclo), sugli espianti sono stati rilevati i seguenti parametri quantitativi: numero dei germogli; lunghezza

\* lconcezzi@parco3a.org

dei germogli (mm); lunghezza degli internodi (mm); numero dei nodi. Sono stati inoltre rilevati (come percentuale sul totale) i seguenti parametri qualitativi: sviluppo di callo, germogli non sviluppati, necrosi, vitrescenza, malformazioni.

*Seconda fase*

Obiettivo di questa fase è stata la verifica di eventuali alterazioni nel comportamento proliferativo degli espianti indotte dalla esposizione prolungata al D-Mannitolo. La prova è stata così impostata:

- preparazione di microtalee uninodali (lunghezza tra 5 e 10mm);
- 5 repliche formate da 6 vasi magenta GA7<sup>®</sup> contenente ciascuno 5 microtalee e addizionati con circa 50ml di terreno fresco per Olivo (OMM con 2mg/l di Zeatina).

Come controllo sono stati utilizzati espianti di cv Tendellone non esposti al D-Mannitolo. In questa fase i rilievi (che hanno riguardato gli stessi parametri quali-quantitativi sopra indicati) sono stati eseguiti al termine di un periodo di proliferazione in cella climatica di 40 giorni e per 5 subcolture consecutive.

**Risultati e discussione**

I dati rilevati in entrambe le fasi sono stati analizzati mediante test *t-student* con significatività del 95% ( $p < 0,05$ ).

*Prima fase*

Al termine dei due cicli di 6 mesi gli espianti mostravano dimensioni significativamente ridotte rispetto al controllo (fig. 1) e con uno sviluppo notevole di callo. Tra le due tesi invece sussistono differenze statisticamente significative solo per i parametri “numero di germogli” (rilevato al termine del 1° ciclo di 6 mesi) e “lunghezza degli internodi” (rilevato al termine del 2° ciclo di 6 mesi). Riguardo i parametri qualitativi, sono state osservate percentuali elevate di necrosi per entrambe le tesi rispetto al controllo nel 1° ciclo, poi ridotte a valori molto più contenuti e in linea con quelli del controllo nel 2° ciclo. Le malformazioni, riconducibili per lo più a germogli fascicolati (con 3 foglie per nodo) sono assenti per le due tesi nel 1° ciclo e compaiono solo nel 2° ciclo con valori comunque inferiori della metà rispetto al controllo.

Relativamente al periodo di 12 mesi con D-Mannitolo, si sono registrati valori di necrosi dei germogli pari a 96% per la tesi A e 86% per la tesi B, cosa che pur non inficiando l’allestimento della prova di verifica della seconda fase, non ha permesso un confronto statistico dei valori dei parametri quantitativi.

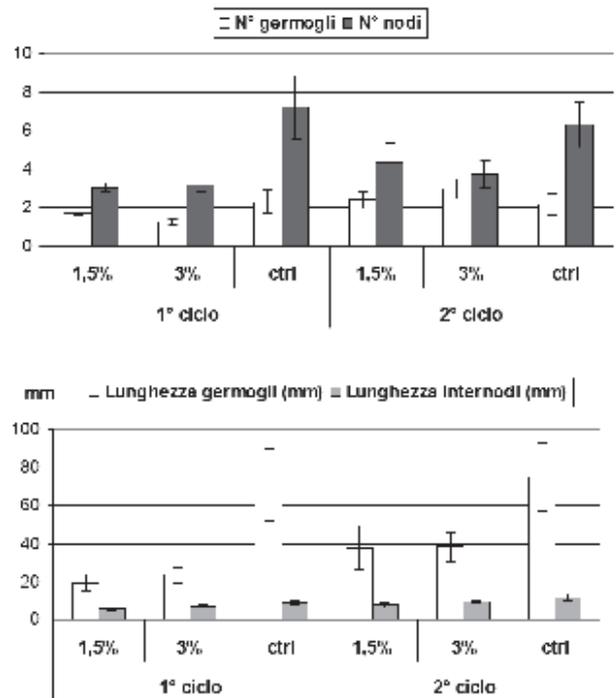


Fig. 1 - Prima fase. Valori medi dei parametri quantitativi rilevati al termine del periodo di 6 mesi in D-Mannitolo.

Fig. 1 - Firts phase. Average values of quantitatives parameters measured after 6 month of D-Mannitol exposition

*Seconda fase*

Relativamente alla verifica del comportamento proliferativo degli espianti dopo il periodo di esposizione al D-Mannitolo, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ , test *t-student*) per i valori dei parametri quantitativi delle due tesi né rispetto al controllo né tra di loro, sia per il periodo dei 6 mesi (fig. 2) che per quello dei 12 mesi (fig. 3). Lo stesso si può affermare anche per i valori percentuali dei parametri qualitativi: sebbene, infatti, si registrino andamenti leggermente diversi per ogni singolo parametro, i valori sono comunque contenuti e sempre inferiori al 10% sul totale.

**Conclusioni**

Lo studio condotto ha permesso di confermare che anche per Olivo in coltura *in vitro*, l’aggiunta del D-Mannitolo al terreno di proliferazione, nelle condizioni descritte, determina un sensibile rallentamento della crescita degli espianti e, almeno nel caso qui discusso del periodo di 6 mesi, non induce effetti negativi (diretti e indiretti) tali da compromettere un normale sviluppo dei germogli. Il periodo dei 12 mesi risulta per gli espianti eccessivamente lungo e ne causa una elevata percentuale di necrosi, sebbene poi quelli sopravvissuti non manifestino alterazioni nel comportamento proliferativo.

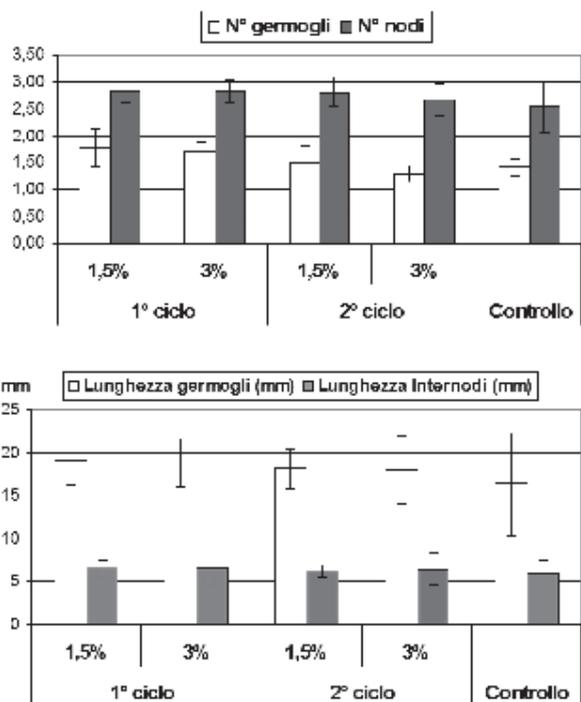


Fig. 2 - Seconda fase. Valori dei parametri quantitativi rilevati al termine della prova di verifica del periodo di 6 mesi in D-Mannitolo (Media di 5 subcolture consecutive).

Fig. 2 - Second phase. Quantitative parameters values measured at the end of 6 months D-Mannitol exposition trial (Average of 5 consecutive subcultures).

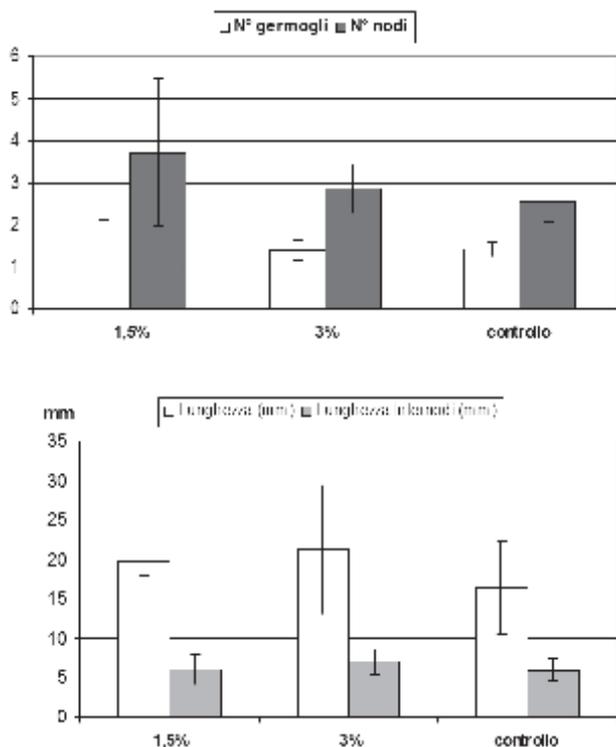


Fig. 3 - Seconda fase. Valori dei parametri quantitativi rilevati al termine della prova di verifica del periodo di 12 mesi in D-Mannitolo (Media di 5 subcolture consecutive).

Fig. 3 - Second phase. Quantitative parameters values measured at the end of 12 months D-Mannitol exposition trial (Average of 5 consecutive subcultures).

## Ringraziamenti

Gli Autori desiderano esprimere la loro riconoscenza al Dr. Maurizio Micheli e al Dr. Tiziano Gardi del DSAA di Perugia per i loro suggerimenti e consigli. Desiderano ringraziare per la preziosa collaborazione la Dr.ssa Giulia Gervasi, la Dr.ssa Scilla Valecchi, il Dr. Marco Caffarelli, la Dr.ssa Francesca Moretti e la Dr.ssa Livia Polegri.

## Riassunto

L'impiego del D-Mannitolo nella coltura *in vitro* è da anni documentato su diverse specie e con diverse finalità, tra le quali quella di agente osmotico che permette di ridurre la capacità di assorbimento delle componenti organo minerali addizionate al terreno di coltura. In questo contributo si è voluto verificare l'effetto della esposizione per periodi prolungati a diverse concentrazioni di D-Mannitolo, su germogli di Olivo. Obiettivo della prova è stato quello di valutare se il rallentamento della crescita indotto dall'aggiunta del D-Mannitolo al terreno di coltura potesse sortire effetti analoghi a quelli ottenuti mediante crescita alle basse temperature, che in Olivo, nelle condizioni sperimentate presso la Banca del germoplasma *in vitro* della Regione Umbria, non ha dato un buon esito.

**Parole chiave:** crescita rallentata, regolazione osmotica.

## Bibliografia

- SHIBLI R.A., SHATNAWI M.A., SUBAIIH W.S., AJLOUNI M.M., 2006. *In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review*. World J. Agr. Sc. 2 (4): 372-382.
- GOLMIRZAI A., TOLEDO J., 1999. *Noncryogenic, long-term germplasm storage*. In Hall (ed.) Methods in Molecular Biology, Vol. 111: Plant Cell Culture Protocols. Humana Press Inc., Totowa: 95-101.
- SHIBLI R.A., SHATNAWI M.A., SUBAIIH W.S., AJLOUNI M.M., JARADAT A., ADHAM Y., 1999. *Slow growth in vitro conservation of bitter almond (Amygdalus communis L.)*. Advances in Hort. Sci., 13:133-134.
- CHAROENSUB R., PHANSIRI S., 2004. *In vitro Conservation of rose coloured leadwort: effect of mannitol on growth of plantlets*. Kasetsart J. Nat. Sci. 38 : 97-102.
- MITOI E. M., HOLOBIUC I., BLINDU R., 2009. *The effect of mannitol and antioxidative enzymes in vitro long termcultures of Dianthus tenuifolius and Dianthus spiculifolius*. Rom. J. Biol. - Plant Biol., 54(1): 25-33.
- LEVA A.R., PETRUCCELLI R., BARTOLINI G., 1994. *Mannitol in vitro culture of Olea europaea L. (cv. Maurino)*. 2° Int. Symp. Olive Growing. Acta Hort. 356: 43-46.
- CONCEZZI L., DESANTIS F., GRAMACCIA M., PALADIN C., 2010. *Le attività di conservazione di varietà locali di fruttiferi presso la banca del germoplasma in vitro della Regione Umbria*. Acta Italus Hortus 1: 70-73.
- MENCUCINI M., MICHELI M., STANDARDI A., 1997. *Micropropagazione dell'Olivo: effetto di alcune citochinine sulla proliferazione*. Italus Hortus 4(6): 32-37.

## Variabilità dei tratti morfologici e bio-molecolari nella cultivar di olivo calabrese ‘Ottobratica’

Mafrica R.<sup>1\*</sup>, Costa F.<sup>2</sup>, Fiore M.C.<sup>2</sup>, Marchese A.<sup>2</sup>, Marra F.P.<sup>2</sup>, Pangallo S.<sup>1</sup>, Pellegrino P.<sup>1</sup> e Caruso T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari e Forestali, Università Mediterranea di Reggio Calabria

<sup>2</sup> Dipartimento DEMETRA, Università di Palermo

### Variability of the morphological and molecular traits of calabrian olive cultivar ‘Ottobratica’

**Abstract.** ‘Ottobratica’ is one of the main olive oil cultivar grown in Calabria since ancient time and extremely wide-spread throughout the region. However, several different types and denominations of ‘Ottobratica’ are known indicating that this name may refer to a pool of different genotypes (polyclonal cultivars). The aim of this study was to verify the hypothesis that ‘Ottobratica’ may not be a ‘unique’ cultivar and in particular to assess the degree of morphological and genetic variability within this cultivar. An extensive territorial survey, conducted in the traditional growing areas of the cultivar, initially allowed to identify different accessions of ‘Ottobratica’. Subsequently the identified accessions were described both at the morphological and molecular levels. The morphological characterization has been carried out using as reference the descriptor list proposed by the International Olive Oil Council (IOOC) integrated with suitable descriptors, suggested by other Authors (Caruso *et al.*, 2007; Bellini *et al.*, 2007). Molecular characterization has been carried out by using a set of polymorphic and reliable microsatellite (*Simple Sequence Repeat*) markers. To avoid cases of homonymy and/or synonymy the morphological and genetic profiles of identified accessions were compared to the standard type of ‘Ottobratica’ and those of other olive varieties cultivated in South Calabria. Results allowed establishing that many genotypes called ‘Ottobratica’ share some phenotypic traits such as vigorous tree, small and elongated fruits, early time of change of skin colour. However, under this name we found genotypes with spherical or ovoidal shaped fruits. Molecular studies revealed significant differences between the various accessions analyzed.

**Key words:** polyclonal cultivars, morphological traits, genetic resources, olive germplasm.

### Introduzione

Tra le varietà di olivo coltivate nella Calabria meridionale ‘Ottobratica’ è sicuramente tra le più diffuse. Diversamente da altre cultivar di olivo autoctone presenti nel suddetto territorio, che spesso risultano presenti in areali abbastanza circoscritti e definiti, l’Ottobratica è invece ampiamente coltivata sia sul versante tirrenico che su quello jonico. Benché le prime testimonianze scritte sulla sua presenza in Calabria risalgono al XIX secolo (AA.VV., 1883), la coltivazione di ‘Ottobratica’ può certamente vantare tradizioni molto più antiche. Secondo Inglese e Calabrò (2002) ‘Ottobratica’ sarebbe stata selezionata alcuni secoli prima, nell’ambito di una popolazione da seme, in un areale abbastanza circoscritto del versante tirrenico della provincia di Reggio Calabria. Successivamente, da detti i luoghi la cultivar si sarebbe diffusa prima su gran parte del versante tirrenico meridionale della regione e successivamente anche su quello jonico. L’elevata produttività e la notevole rusticità della cultivar sono state senza dubbio gli elementi che ne hanno favorito la diffusione in molti areali olivicoli della Calabria meridionale dove in molti casi ha sostituito le cultivar a drupa grossa, tradizionalmente coltivate in tali territori (Pasquale, 1863). Le antiche origini e l’ampia diffusione raggiunta hanno dato luogo, nel tempo, a diverse ‘forme’ di ‘Ottobratica’. Nonostante la presenza sul territorio calabrese di diversi ‘tipi’ di ‘Ottobratica’ sia stata confermata da tempo da diversi ricercatori (Caruso, 1883; AA.VV., 1893; Zito, 1931; D’Amore *et al.*, 1977; Motisi *et al.*, 2001), non risulta sia mai stato condotto alcuno studio per valutare l’effettivo grado di variabilità presente nell’ambito di tale cultivar. Per colmare tale lacuna è stato condotto lo studio di cui si riferisce nella presente nota.

### Materiali e metodi

La ricerca è iniziata con un’estesa ed approfondita attività d’indagine territoriale condotta nei tradizionali

\* rocco.mafrica@unirc.it

areali di coltivazione della cultivar che ha consentito di individuare, anche grazie alle segnalazioni di agricoltori, frantoiani e vivaisti, le diverse accessioni di “Ottobratica” presenti in Calabria. Su ciascuna entità individuata, successivamente, è stata condotta la caratterizzazione morfologica e molecolare. La descrizione dei tratti morfologici è stata effettuata facendo riferimento ai caratteri indicati nella scheda del Consiglio Oleicolo Internazionale (COI) integrata con descrittori proposti da altri Autori (Caruso *et al.*, 2007; Bellini *et al.*, 2007). L’indagine molecolare è stata invece condotta mediante marcatori SSR (*Simple Sequence Repeat* o Microsatelliti). In particolare sono stati utilizzati sette marcatori molecolari SSR, scelti tra quelli pubblicati in letteratura per l’alto grado di polimorfismo e la riproducibilità: *ssrOeUA-DCA: 3, 5 e 18* (Sefc *et al.*, 2000), *GAPU: 45, 71b e 101* (Carriero *et al.*, 2002), e *EMOL* (De La Rosa, 2002). Al fine di individuare eventuali casi di omonimia o sinonimia, sia il profilo morfologico sia quello molecolare delle diverse accessioni in studio sono stati confrontati con quelli di larga parte delle varietà di olivo autoctone a drupa piccola coltivate nella Calabria meridionale.

**Risultati e discussione**

E’emersa una notevole variabilità all’interno della cultivar “Ottobratica”, come testimoniato dall’identificazione di ben 16 diversi genotipi. Accanto al genotipo più diffuso, che per convenzione viene qui definito “standard”, sono state individuate altre 15 accessioni di “Ottobratica”, molte delle quali non risulta siano state mai segnalate in letteratura. I genotipi individuati presentano caratteristiche biometriche e morfologiche alquanto diversificate (fig. 1) che si contraddistinguono per avere alberi piuttosto vigorosi e drupe di piccola pezzatura e di forma allungata. Riguardo quest’ultimo aspetto non mancano le accessioni con drupe di forma ovoidale o rotondeggiante. Si tratta di genotipi che sono utilizzati essenzialmente per la produzione di olio.

Il dendrogramma costruito sulla base delle variabili morfologiche evidenzia una certa diversità sia tra le varie accessioni di “Ottobratica” e sia tra queste e il panorama varietale autoctono, a drupa piccola, molto rappresentato nella Calabria meridionale (fig. 2). Quanto appena rilevato trova conferma anche nei risultati dell’analisi molecolare (fig. 3). Solo in due casi, infatti, le vicinanze genetiche risultano particolarmente evidenti: il primo caso riguarda le accessioni “O. foriata” e “O. Novelleto” e il secondo le accessioni “O. promentina” ed “O. standard”. Per quanto concerne il primo caso, il profilo genetico è risultato iden-

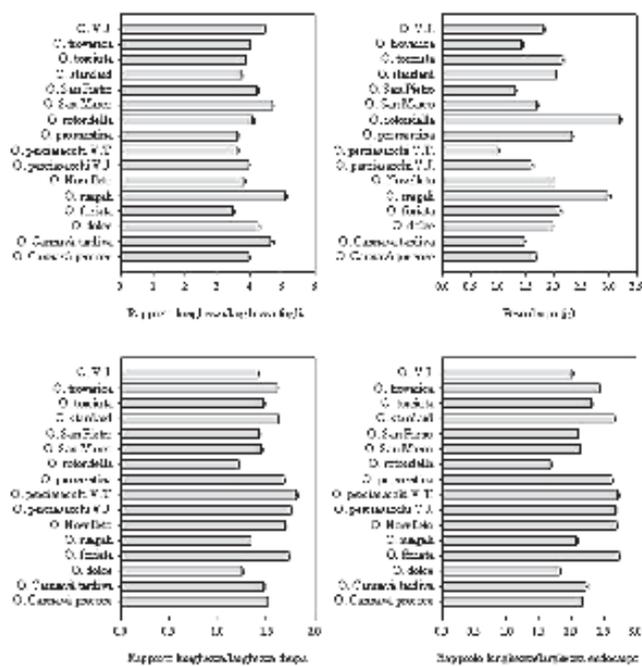


Fig. 1 - Principali caratteristiche biometriche della foglia, del frutto e dell’endocarpo delle 16 accessioni di ‘Ottobratica’. Le barre orizzontali indicano l’errore standard.

Fig. 1 - Main biometric characteristics of leaf, fruit and stone of 16 accessions of ‘Ottobratica’ selected in the South Calabria. Vertical bars indicate standard error.

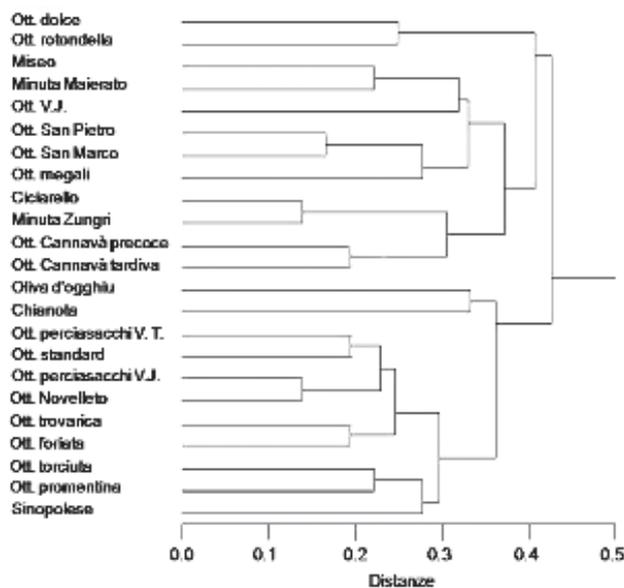


Fig. 2 - Dendrogramma delle 16 accessioni di “Ottobratica” a confronto con varietà autoctone di olivo a drupa piccola coltivate in Calabria meridionale costruito in base alle variabili morfologiche. Fig. 2 - Similarity on the basis of morphological traits, among 16 accessions of ‘Ottobratica’ and some common olive varieties cultivated in South Calabria.

tico per tutti e 7 i primers utilizzati. Sebbene non sia possibile avere la certezza dell’identità di due genotipi analizzando una modesta porzione di DNA, è molto probabile che ci si trovi di fronte ad un caso di sinonimia o comunque di due cloni originatesi dalla stessa

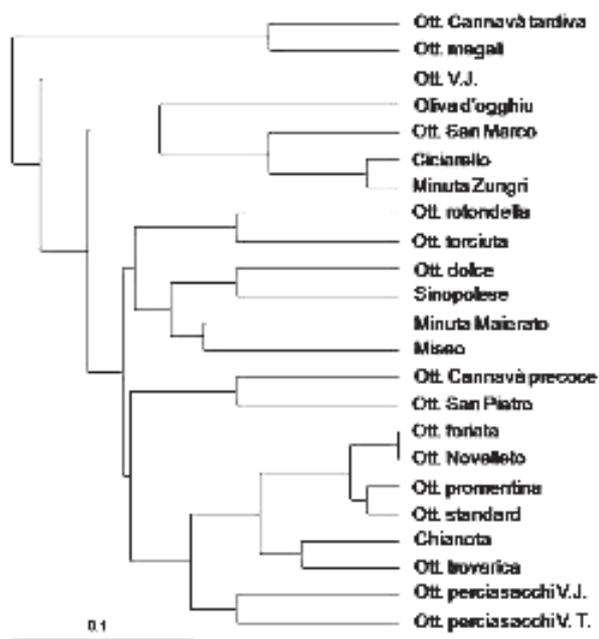


Fig. 3 - Dendrogramma UPGMA basato sul coefficiente Simple matching delle 16 accessioni di "Ottobratica" a confronto con varietà autoctone di olivo a drupa piccola coltivate nella Calabria meridionale costruito sulla base di 7 marcatori SSR.

Fig. 3 - UPGMA dendrogram of genetic similarity on the basis of 7 SSR molecular markers, among 16 accessions of 'Ottobratica' and some common olive varieties cultivated in South Calabria.

matrice genetica. A dimostrazione di detta ipotesi il dendrogramma costruito sulla base delle variabili morfologiche evidenzia, pur limitate, differenze riguardanti caratteristiche delle mignole, delle foglie e degli endocarpi. Le due accessioni in questione hanno inoltre in comune il medesimo areale di coltivazione: i territori interni dell'area grecanica nel Basso Jonio reggino. Nel secondo caso, ovvero quello relativo ad "O. promentina" ed "O. standard", alla vicinanza genetica si contrappone una sostanziale differenza morfologica. I due genotipi presentano, infatti, differenze per oltre il 30% dei caratteri presi in considerazione. I risultati ottenuti consentono inoltre di escludere l'esistenza di casi di sinonimia con le altre varietà a drupa piccola coltivate nella Calabria meridionale.

## Conclusioni

Con la denominazione "Ottobratica" viene indicata una cultivar popolazione le cui accessioni sono accomunate, dal punto di vista agronomico, dalla pezzatura medio piccola dei frutti e dall'epoca di invaiatura precoce, ma diversificate da tratti morfologici e genetici piuttosto importanti. Nell'ambito della biodiversità rilevata si sono inoltre evidenziati genotipi di un certo interesse per quanto attiene alla resistenza alla sindrome della lebbra (*Colletotrichum* spp) cui la cul-

tivar popolazione, nella sua complessità, risulta estremamente sensibile. Tale materiale, se ben organizzato, potrà certamente contribuire ad abbassare l'impatto sull'ambiente della coltivazione dell'"Ottobratica", in particolare nei territori collinari del versante tirrenico, dove tradizionalmente questa malattia crea notevoli problemi alla coltura dell'olivo penalizzando fortemente la qualità dell'olio prodotto e di conseguenza i redditi degli olivicoltori.

## Riassunto

Tra le cultivar di olivo coltivate in Calabria "Ottobratica" è certamente una tra quelle che vanta maggiori tradizioni e diffusione. Tali aspetti possono aver contribuito a dare origine, nel tempo, a variabilità genetica per cui sotto la denominazione "Ottobratica" più che un'unica cultivar potrebbe celarsi un pool di diversi genotipi (cultivar policlonale). In questa nota gli Autori riferiscono del lavoro effettuato per verificare tale ipotesi ed in particolare dei risultati di ricerche condotte per valutare il grado di variabilità morfologica e genetica presente all'interno di tale cultivar. Un'estesa ed approfondita attività d'indagine territoriale, condotta nei tradizionali areali di coltivazione della cultivar, ha consentito inizialmente di individuare diverse accessioni di "Ottobratica"; successivamente si è proceduto alla relativa caratterizzazione sia dal punto di vista fenotipico che molecolare. La descrizione dei tratti morfologici è stata effettuata facendo riferimento ai caratteri indicati nella scheda del Consiglio Oleicolo Internazionale (COI) integrata con descrittori proposti da Caruso *et al.* (2007) e da Bellini *et al.* (2007). Per le indagini sui tratti molecolari sono stati utilizzati marcatori *Simple Sequenze Repeat* (SSR). I risultati ottenuti hanno consentito di accertare che con il nome "Ottobratica" vengono denominati numerosi genotipi accomunati per lo più dai seguenti caratteri fenotipici: albero vigoroso, drupa piccola ed allungata, invaiatura precoce. Nell'ambito della suddetta denominazione sono stati però rinvenuti anche genotipi che producono frutti con forma ovoidale o rotondeggiante. Dalle indagini molecolari sono emerse significative differenze tra le varie accessioni studiate.

**Parole chiave:** cultivar policlonale, tratti morfologici, risorse genetiche, germoplasma olivicolo.

## Bibliografia

AA.VV., 1883. *Atti della giunta per l'inchiesta agraria e sulle condizioni della classe agricola. Relazione del commissario*

- Comm. On. Ascanio Branca*. Monografia agraria sul circondario di Reggio Calabria. Tipografia Forzani e C., Roma.
- AA.VV., 1893. *Bollettino del Regio Oleificio sperimentale di Palmi - Reggio Calabria*, Tipografia Nistri, Pisa.
- BELLINI E., GIANNELLI G., GIORDANI E., PICARDI E., 2007. *Descriptor List Olea europaea L.* in “Le specie legnose da frutto - Liste dei caratteri descrittivi”. Arsia – Agenzia Regionale per lo sviluppo e l’innovazione nel settore Agricolo-forestale, Firenze.
- CARRIERO F., FONTANAZZA G., CELLINI F., GIORIO G., 2002. *Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (Olea europaea L.)*. Theor. Appl. Genetics., 104: 301-307.
- CARUSO G., 1883. *Monografia dell’olivo*. Enciclopedia Agraria Italiana, vol. III, parte V. UTET Edizioni, Torino.
- CARUSO T., CARTABELLOTTA D., MOTISI A., 2007. *Manuale per la caratterizzazione primaria di cultivar di olivo siciliane* In: *Cultivar di Olivo Siciliane*. Palermo.
- D’AMORE R., IANNOTTA N., PERRI L., 1977. *Contributo allo studio delle principali cultivar di olivo presenti in Calabria*. Annali Istituto Sperimentale per l’Olivicoltura. Numero speciale: vol. I, Cosenza.
- DE LA ROSA R., JAMES C.M., TOBUTT K.R., 2002. *Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (Olea europaea L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae*. Mol. Ecol. Notes 2, 265–267.
- INGLESE P., CALABRÒ T., 2002. *Olivicoltura e paesaggio nella Piana di Gioia Tauro*. Laruffa Editore.
- MOTISI A., MARRA F.P., ZAPPÀ R., MAFRICA R., 2001. *Indagine sulle caratteristiche biometriche di 18 biotipi di olivo del germoplasma calabrese*. Atti VI Convegno Nazionale “Biodiversità: opportunità di sviluppo sostenibile”. Bari, 6-7 settembre.
- IOOC, 1996. *Metodologia per la caratterizzazione primaria delle varietà dell’olivo*. Progetto ResGen-CT 96-97, Madrid (Spagna).
- PASQUALE G.A., 1863. *Relazione sullo stato fisico-economico-agrario della Prima Calabria Ulteriore*. Tipografia del R. Albergo de’ Poveri, Napoli. Riedizione, Franco Pancallo Editore 2002.
- SEFC K.M., LOPES M.S., MENDOCA D., RODRIGUES DOS SANTOS M., LAIMER DA CAMARA MACHADO M., DA CAMARA MACHADO A., 2000. *Identification of microsatellite loci in olive (Olea europaea) and their characterization in Italian and Iberian olive trees*. Mol. Ecol., 9: 1171-1173.
- ZITO F., 1931. *Contributo alla conoscenza delle varietà della zona di Palmi*. In “Le varietà di olivo da olio in Italia”. Roma.

## Primi studi sull'autocompatibilità ed intercompatibilità delle cultivar 'Rustica' e 'Gentile dell'Aquila' coltivate in Abruzzo

Zema V.A.<sup>1</sup>, Ricci A.<sup>1</sup>, Visco T.<sup>1</sup> e Tombesi S.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Regione Abruzzo, Direzione politiche agricole e di sviluppo rurale, forestale, caccia e pesca, emigrazione, ex ARSSA

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

### Preliminary studies on self-compatibility and cross-compatibility of 'Rustica' and 'Gentile dell'Aquila' in Abruzzo, Italy

**Abstract.** In Peligna valley, Abruzzo region, in 2011 was carried out a study on self-compatibility and cross-compatibility of the two main cultivated cultivars ('Rustica' and 'Gentile dell'Aquila'). Before bloom, flowering branches were isolated from pollination by paper bags. At 70% of bloom 6 bags were moved from branches of one cultivar to the other and vice versa (thesis B) in order to test the cross-compatibility between cultivars; on other branches paper bags were removed at the end of bloom (thesis A) in order to test the cultivars' self-compatibility. Control thesis was represented by open pollination. On each cultivar each thesis was repeated 6 times. Every 20 days from the end of bloom to September, fruit set was measured. These preliminary data suggest that both cultivars are self-incompatible even though very poor fruit set was observed in self-pollinated 'Gentile dell'Aquila'. However they both resulted reciprocally compatible. Further investigations are needed in order to assess whether 'Gentile dell'Aquila' is self-compatible or not and if the use of other cultivars may improve fruit set in these two cultivars.

**Key words:** pollination, self-incompatible, 'Rustica', 'Gentile dell'Aquila', Valle Peligna.

### Introduzione

Nell'ambito delle singole specie vegetali, uno dei fattori che influenza la loro produttività è il livello di compatibilità del polline tra piante appartenenti o meno alla stessa varietà. Il grado di auto-compatibilità nell'olivo è un tema tutt'oggi controverso (Cuevas *et*

*al.* 2009) ma l'efficacia dell'impollinazione eterologa in impianti commerciali è stata estensivamente dimostrata (Morettini, 1972; Lavee e Datt, 1978; Fernandez-Escobar e Gomez-Valledor, 1985; Cuevas *et al.* 2001; Farinelli *et al.* 2004).

In provincia dell'Aquila, in Valle Peligna, gli oliveti, localizzati nella fascia pedemontana, a ridosso del monte Morrone, per una superficie di circa 1000 ha sono costituiti prevalentemente da due varietà, la Rustica e la Gentile dell'Aquila diffuse ormai da tempo in zona per la loro adattabilità al clima continentale. Il nome delle due cultivar ha attinenza con le loro caratteristiche morfologiche. La 'Rustica' dal tronco ricco di protuberanze, il portamento frastagliato, il frutto allungato e asimmetrico; la 'Gentile dell'Aquila' dal tronco liscio, il portamento assurgente, il frutto tondeggiano. Relegato inizialmente ad una zona marginale, poco adatta alla coltivazione di altre specie, questo comprensorio olivicolo ha segnato, in questi ultimi anni, un grande sviluppo grazie alle elevate caratteristiche organolettiche e salutistiche del suo olio. Nello stesso tempo sono state intraprese iniziative di diversa natura volte al miglioramento delle tecniche di coltivazione e di trasformazione al fine di ottenere ogni anno buone produzioni qualitative e quantitative. In quest'ambito si inserisce lo studio effettuato per verificare il grado di autocompatibilità e intercompatibilità delle due cultivar al fine di valutare la possibilità di introduzione di nuove cultivar che fungano da impollinatori, preservando comunque la tipicità del prodotto.

### Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta a Sulmona presso l'azienda agricola biologica Rosso Bruno. L'oliveto oggetto dell'indagine ha una superficie di 7.800 m<sup>2</sup> con circa 260 piante allevate a vaso cespugliato con distanze di m 6x5. Il patrimonio genetico è costituito nella quasi totalità dalle due varietà oggetto di studio

\* sergio.tombesi@libero.it

ed in particolare dall'80% di Rustica e dal 20% circa dalla Gentile dell'Aquila. Nell'oliveto, condotto in asciutto, viene effettuata annualmente, nel mese di febbraio, una concimazione organica distribuendo sull'intera superficie 25 t di letame misto e 10 t di pollina. Nei periodi di aprile, giugno-luglio, e settembre-ottobre, si effettuano 3 erpicature ed annualmente la potatura. La difesa prevede trattamenti a base rameica nel periodo di marzo-aprile e agosto-settembre.

Nel 2011 le precipitazioni totali nella zona sono state pari a 592 mm. Il clima della zona è caratterizzato da temperature minime invernali che hanno toccato nel 2011 punte di -6 °C e massime nel periodo estivo di 39 °C. Per entrambe le cultivar sono state eseguite due tesi: nella prima tesi (tesi A) volta a verificare il grado di autocompatibilità, è stato effettuato l'isolamento di branchette fiorifere tramite sacchetti di carta prima dell'antesi (28 maggio 2011). I sacchetti sono stati agitati poco prima della fioritura per favorire la diffusione del polline e successivamente sono stati rimossi ad allegagione avvenuta (18 giugno 2011). Nella seconda tesi (tesi B), volta a studiare il grado di intercompatibilità tra le due cultivar, è stato effettuato l'isolamento di branchette fiorifere seguendo le modalità adottate per la tesi A. Al 70% di fioritura (6 giugno 2011), si è proceduto allo scambio tra sacchetti posizionati sulle branchette appartenenti alle due cultivar coprendo temporaneamente le branche da cui erano stati rimossi gli isolatori. Allo scambio dei sacchetti è seguita l'agitazione degli stessi per facilitare la diffusione del polline. Infine come per la tesi A, ad allegagione avvenuta si è proceduto alla rimozione dei sacchetti. La tesi controllo era rappresentata da branchette fiorifere lasciate alla libera impollinazione. Per ciascuna tesi e per ciascuna cultivar sono state effettuate 6 ripetizioni.

Relativamente ai rilievi, sulle branchette selezionate, si è proceduto, al momento dell'insacchettamento al conteggio delle infiorescenze, mentre ad allegagione avvenuta, ad intervalli di circa 20 giorni, fino ai primi giorni di settembre, è stato effettuato il conteggio delle drupe allegate annotando l'evoluzione dei frutti con sviluppo regolare e di quelli partenocarpici. Le frequenze di frutti allegati per mignola sono stati analizzati tramite il test del  $\chi^2$  per  $P < 0,05$ .

## Risultati e discussione

I rilievi effettuati nel periodo successivo l'allegagione, hanno evidenziato una progressiva cascola delle drupe, per entrambe le cultivar, in tutte le tesi (figg. 1 e 2). In dettaglio, la cascola è stata maggiore nei mesi di giugno e luglio, mentre tra luglio e settem-

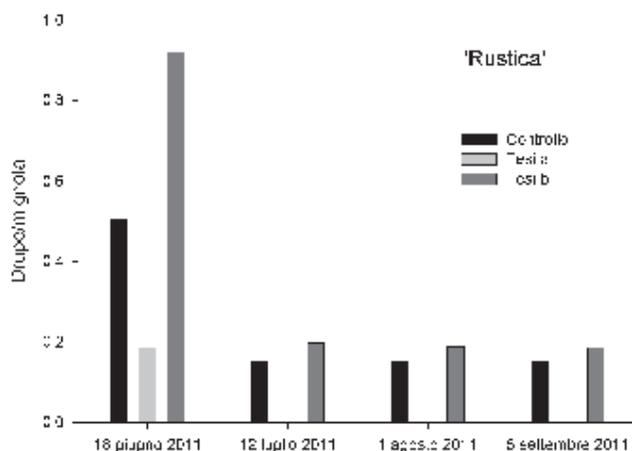


Fig. 1 - Cultivar Rustica. Allegagione rilevata in diverse date per la tesi controllo, autoimpollinazione (tesi a) e impollinazione reciproca (tesi b).

Fig. 1 - Fruit set at different dates in the control, self-pollination and cross-pollination in Rustica.

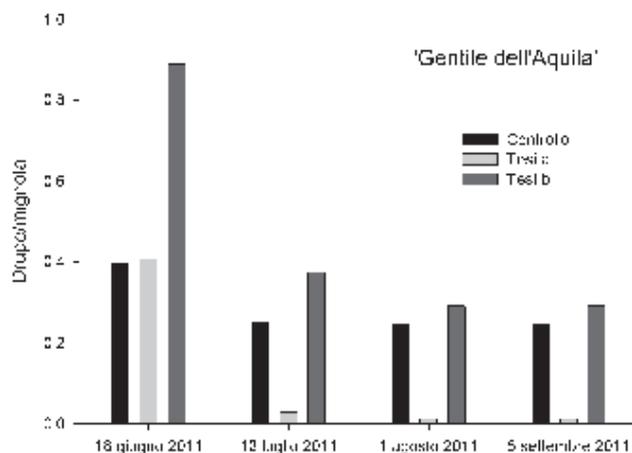


Fig. 2 - Cultivar Gentile dell'Aquila. Allegagione rilevata in diverse date per la tesi controllo, autoimpollinazione (tesi a) e impollinazione reciproca (tesi b).

Fig. 2 - Fruit set at different dates in the control, self-pollination and cross-pollination in Gentile dell'Aquila.

bre non si sono registrate variazioni significative, nel numero dei frutti cascolati, rispetto al periodo precedente. Relativamente alla Rustica, già nei rilievi di luglio è stata evidente la completa mancanza di allegagione dei frutti nella tesi relativa allo studio dell'autocompatibilità (fig. 3), mentre sono stati riscontrati livelli simili di allegagione tra la tesi controllo e la tesi relativa allo studio dell'intercompatibilità (tab. 1). Simili risultati sono stati riscontrati anche per la 'Gentile dell'Aquila' con la differenza di qualche frutto allegato nella tesi relativa alla verifica dell'autocompatibilità (fig. 4). Ciò potrebbe essere dovuto ad un possibile inquinamento con polline eterologo, tesi sostenuta dal fatto che gli unici frutti allegati erano relativi alla medesima ripetizione. Questi dati sono in accordo con quanto riportato precedentemente riguardo ad un gran numero di cultivar (Farinelli *et al.*



Fig. 3 - Cultivar 'Gentile dell'Aquila'. Branchette fiorifere relative alle tesi (da sinistra a destra) libera impollinazione, autoimpollinazione e impollinazione incrociata.

Fig. 3 - Fruit bearing shots of 'Gentile dell'Aquila' of thesis (from left to right) control, self-pollination and cross-pollination.



Fig. 4 - Cultivar 'Rustica'. Branchette fiorifere relative alle tesi (da sinistra a destra) libera impollinazione, autoimpollinazione e impollinazione incrociata.

Fig. 4 - Fruit-bearing shots of 'Rustica' of thesis (from left to right) control, self-pollination and cross-pollination.

Tab. 1 - Frutti/mignola nelle cv Rustica e Gentile dell'Aquila nelle varie epoche nelle tre tesi. Ogni dato è il frutto del rapporto tra numero dei frutti allegati e numero di mignole su 6 branchette per tesi. I valori accompagnati da differenti lettere sono differenti per  $P < 0,05$  ( $\chi^2$  test)

Tab. 1 - Fruits/inflorescence at different time in the three thesis. Each data was obtained as the ratio between set fruits and number of inflorescences on 6 branches per thesis. Numbers with different lower case letters are different per  $P < 0.05$  ( $\chi^2$  test).

Cultivar	Tesi	Frutti/mignola			
		18/06	12/07	01/08	05/09
Rustica	Libera impoll.	0,51 b	0,15 a	0,15 a	0,15 a
	Tesi a (x Rustica)	0,19 c	0 b	0 b	0 b
	Tesi b (x Gentile)	0,92 a	0,2 a	0,19 a	0,18 a
Gentile dell'Aquila	Libera impoll.	0,4 b	0,25 a	0,25 a	0,25 a
	Tesi a (x Gentile)	0,41 b	0,03 b	0,01 b	0,01 b
	Tesi b (x Rustica)	0,89 a	0,37 a	0,29 a	0,29 a

2006) e suggeriscono l'importanza dell'inclusione di varietà impollinatrici negli impianti. I dati ottenuti

indicano che sia Rustica che Gentile dell'Aquila sono auto incompatibili anche se tali risultati necessitano di ulteriori indagini per escludere in maniera definitiva la possibilità di basse percentuali di autocompatibilità che, seppure di limitato interesse per la coltivazione di queste due cultivar, potrebbero essere significative a scopi di miglioramento genetico. Sia Rustica che Gentile dell'Aquila hanno mostrato buone allegagioni, non particolarmente dissimili tra le tesi controllo (libera impollinazione) e la tesi relativa allo studio dell'intercompatibilità (Tesi B). In futuro potrebbe essere utile verificare se l'introduzione di altre varietà possa consentire un aumento dell'efficienza d'impollinazione riscontrabile nell'incremento dell'allegagione, considerando inoltre che l'inserimento di impollinatori è comunque raccomandabile affinché, in situazioni di alternanza di fioritura, sia garantita una adeguata quantità di polline compatibile.

## Conclusioni

Sia Rustica che Gentile dell'Aquila sono risultate auto-sterili. Le due cultivar hanno mostrato un buon grado di intercompatibilità dando un livello di allegagione comparabile alla libera impollinazione. Sono comunque necessari ulteriori studi per confermare la completa autosterilità e verificare se l'inserimento di altre varietà come impollinatori possa incrementare l'allegagione delle due cultivar.

## Riassunto

In Abruzzo, in provincia di L'Aquila, in Valle Peligna, nel 2011 è stato effettuato uno studio per verificare il grado di autocompatibilità e di intercompatibilità delle due cultivar di olivo maggiormente diffuse nella zona, la Rustica e la Gentile dell'Aquila, al fine di migliorare la produttività del settore. Per entrambe le cultivar, prima della fioritura è stato effettuato l'isolamento delle branchette tramite sacchetti di carta. Per verificare il grado di autocompatibilità, (tesi A), è stata effettuata la rimozione dei sacchetti ad allegagione avvenuta. Per verificare il grado di intercompatibilità, (tesi B) al momento del 70% di fioritura, si è proceduto allo scambio tra sacchetti posti sulle branchette delle due varietà, successivamente rimossi ad allegagione avvenuta. Il controllo era rappresentato da branchette fiorifere lasciate alla libera impollinazione. Per entrambe le cultivar e per ogni tesi sono state effettuate sei ripetizioni. Al momento dell'insacchettamento è stato effettuato il conteggio delle infiorescenze sulle branchette selezionate, mentre ad allegagione

avvenuta fino a settembre, ad intervalli di tempo di circa 20 giorni, è stato effettuato il conto dei frutticini. I primi studi suggeriscono che le cultivar Rustica e Gentile dell'Aquila sono compatibili tra di loro. La cultivar Rustica risulta essere auto incompatibile mentre la Gentile dell'Aquila ha mostrato una parziale autocompatibilità. Sono comunque necessarie ulteriori indagini per verificare il reale grado di autocompatibilità della cultivar Gentile dell'Aquila e per valutare se l'introduzione di nuove varietà possa incrementare il livello di allegagione delle due cultivar.

**Parole chiave:** impollinazione, autosterile, 'Rustica', 'Gentile dell'Aquila', Valle Peligna.

## Bibliografia

- CUEVAS J., ZIAZ-HERMOSI A.J., GALIÀN D., HUESO S.S., PINILLOS V., PRIETO M., SOLA D., POLITO V.S., 2001. *Risposta dell'impollinazione incrociata e scelta di impollinatori per le cultivar di olivo (Olea europaea L.) 'Manzanilla de Sivilla', 'Hojiblanca' e 'Picual'*. *Olivae* 85:26-32.
- CUEVAS J., PINILLOS V., POLITO V.S., 2009. *Effective pollination period for 'Manzanillo' and 'Picual' olive trees*. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 84: 370-374.
- FARINELLI D., BOCO M., TOMBESI A., 2006. *Results of four years of observations on self-sterility behaviour of several olive cultivars and significance of cross-pollination*. *Olivebioteq 2006-November 5<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> Mazzara del Vallo, Marsala, I: 275-282.*
- FARINELLI D., HASSANI D., TOMBESI A. 2004. *Self-sterility and cross-pollination responses of nine olive cultivars in Central Italy*. *Acta Horticulturae* 791: 127-136.
- FERNANDEZ-ESCOBAR R., GOMEZ-VALLEDOR G., 1985. *Cross-pollination in 'Gordal Sevillana' olives*. *HortScience* 20:191-192.
- LAVEE S., DATT Z., 1978. *The necessity of cross pollination for fruit set of Manzanillo olives*. *J. Hortic. Sci.* 53:261-266.
- MORETTINI A., 1972. *Olivicoltura*. Ramo editoriale degli agricoltori, Roma: 92-128.

