

## Biologia e Miglioramento Genetico

### Relazioni intra- ed inter-varietali tra il seme e le diverse componenti del frutto in olivo

D. Farinelli<sup>1</sup>, D. Filugelli<sup>1</sup>, A. Baldicchi<sup>1</sup>, T. Frioni<sup>1</sup>, A. Rosati<sup>2</sup> e F. Famiani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari 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)

Negli anni 2011-2013 sono state studiate le relazioni sia inter- che intra-varietali tra il peso dei semi e quello dei frutti, utilizzando diverse cultivar di olivo caratterizzate da notevoli differenze nei pesi finali delle olive (Arbequina, Ascolana Tenera, Bella di Cerignola, Canino, Carolea, Frantoio, Galega Grada de Serpa, Gordal Sevillana, Kalamon, Leccino, Maurino, Moraiolo, Orbetana, Picholine, Sorani). La sperimentazione è stata condotta in centro Italia, utilizzando i frutti prelevati, durante il normale periodo di raccolta (prima parte di novembre), da piante in buone condizioni di sviluppo, situate nel campo collezione varietale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia, in località Prepo (PG). Nei frutti sono stati determinati i pesi sia freschi sia secchi dell'intera drupa, della polpa (epicarpo + mesocarpo), del nocciolo e del seme. I dati ottenuti sono stati elaborati calcolando i valori medi e gli errori standard e successivamente utilizzati per calcolare la regressione lineare e il coefficiente di determinazione, al fine di valutare la relazione tra il peso del seme e quello del frutto e delle sue componenti.

I risultati ottenuti indicano che il peso finale dei frutti delle diverse cultivar di olivo è relazionato positivamente al peso dei semi e che tutte le componenti dei frutti (epicarpo + mesocarpo ed endocarpo) aumentano all'incrementare del peso dei semi sia nelle prove inter-varietali che in quelle intra-varietali. Le relazioni tra il peso dei semi e quello del frutto e delle sue componenti sono risultate influenzate dall'andamento stagionale ed in particolare dalle disponibilità idriche. I semi sembrano avere una capacità di attrazione degli assimilati maggiore dei frutti. La quantità di frutto prodotta dalle piante per unità di peso di seme sembra più elevata nelle varietà a frutto grosso e ciò suggerisce che in queste si creano condizioni che favoriscono una maggiore attrazione di sostanze nutritive nelle drupe. Tuttavia, questo risultato deve essere oggetto di ulteriori indagini prendendo in considerazione anche la produzione per pianta, per verificare che quanto osservato non sia dovuto ad un minore carico produttivo degli alberi delle cultivar a frutto grande.

### Identificazione della iridoide sintasi di olivo, gene chiave della biosintesi dell'oleuropeina

F. Alagna<sup>1</sup>, A. Osbourn<sup>2</sup> e L. Baldoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNR - Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), Perugia

<sup>2</sup>Department of Metabolic Biology, John Innes Centre, Norwich (Regno Unito)

Negli ultimi anni, l'interesse per i benefici terapeutici dell'olio di oliva e delle olive da tavola è notevolmente aumentata, a causa della presenza di composti bioattivi benefici per la salute umana. Tra le sostanze più attive dal punto di vista farmacologico vi sono i secoiridoidi (principalmente l'oleuropeina). L'oleuropeina, disponibile in commercio anche come integratore alimentare, ha numerose proprietà farmacologiche, esercitando attività antiossidante, antinfiammatoria, anti-età, anti-cancro, antimicrobica ed antivirale. Nonostante la grande importanza di questi composti, i determinanti genetici responsabili della loro biosintesi nei frutti di olivo sono ancora sconosciuti. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di identificare i geni che codificano per gli enzimi chiave coinvolti nella biosintesi dei secoiridoidi e di caratterizzare gli enzimi che essi codificano dal punto di vista biochimico.

I geni candidati coinvolti nella biosintesi dell'oleuropeina sono stati identificati mediante analisi di dati di trascrittomici e genomica. L'iridoide sintasi di olivo (OeISY), che catalizza la ciclizzazione dell'8-oxogeraniolo per generare il caratteristico anello dei secoiridoidi, è stato identificato per omologia con il percorso degli indol alcaloidi di *Catharanthus roseus*. Il gene è stato espresso in *E. coli* e la proteina purificata è stata utilizzata per saggi biochimici. I saggi *in vitro* hanno confermato la sua putativa funzione e il nepetalactolo, insieme alle sue forme di aldeidiche, è stato ottenuto come prodotto. Questi dati, insieme all'analisi del profilo di espressione di *OeISY*, che è in accordo con il contenuto di oleuropeina nei tessuti di olivo, suggeriscono che *OeISY* sia l'enzima che sintetizza la porzione terpenica dell'oleuropeina.

Altri tre geni che hanno mostrato elevata similarità con *OeISY* sono stati clonati e i prodotti caratterizzati dal punto di vista biochimico. Il loro ruolo fisiologico rimane ancora sconosciuto, ma i nostri risultati fanno luce sulla loro putativa funzione.

La scoperta di geni coinvolti nella biosintesi secoiridoidi contribuirà ad aumentare il valore alimentare di olive e olio e a migliorare l'estrazione dei loro componenti bioattivi. Inoltre, offrirà l'opportunità per le industrie farmaceutiche ed erboristiche di utilizzare approcci di ingegneria metabolica per la produzione su larga scala dei componenti bioattivi in sistemi microbici o in piante ospiti.

## Identificazione, purificazione e quantificazione di composti nutraceutici e funzionali da foglie monovarietalì locali di *Olea europaea* L.

C. Benincasa, A. Parise, M. Pellegrino, E. Perri, E. Romano e E. Urso

CRA - Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, Rende (CS)

Gli studi sull'influenza dell'olio extravergine di oliva sulla salute dell'uomo e, in particolare, i risultati degli studi sulla correlazione tra la sua assunzione e la riduzione della ossidazione dei lipidi ematici, sulla minor incidenza di rischio cardiovascolare ed oncologico, e sull'attività antiossidante ed antinfiammatoria dei fenoli presenti negli oli d'oliva, hanno permesso di attribuire parte di tali effetti al contenuto in composti fenolici, stimolando l'interesse dei ricercatori anche nei confronti della presenza e concentrazione di tali sostanze nei prodotti secondari dell'industria olearia, quali foglie, acque di vegetazione e sanse, nella prospettiva di un loro recupero e valorizzazione. Le foglie, infatti, risultano ricchissime in composti fenolici, soprattutto in oleuropeina, con valori compresi tra l'1 e il 14%, seguite dai reflui oleari ottenuti da frantoio a due fasi (fino allo 0,9 %) e, per ultimo, dall'olio (fino allo 0,12 %). Oltre all'oleuropeina, proprietà antiossidanti sono possedute da altri fenoli come idrossitiroso, tirosolo, verbascoside, apigenina-7-glucoside e luteolina-7-glucoside, che sono tradizionali componenti delle foglie di olivo. Nell'ambito del Progetto OLIOPIU', il CRA ha sviluppato diversi protocolli d'estrazione di molecole a struttura fenolica dalle foglie di *Olea europaea* L. e ha provveduto a identificare, purificare e determinare quantitativamente, mediante spettrometria di massa tandem, i fenoli di dieci varietà calabresi (Dolce di Rossano, Carolea, Cassanese, Roggianella, Tonda di Strongoli, Pennulara, Grossa di Gerace, Ottobratica, Sinopolese e Ciciarello) in campioni di foglie provenienti da Aziende calabresi.

## La colorazione bianca dell'oliva è generata da una regolazione negativa, temporanea e/o permanente, di geni della via metabolica dei flavonoidi

M. Cirilli <sup>1</sup>, S. Urbani <sup>2</sup>, G. Perrotta <sup>3</sup>, M. Servili <sup>2</sup> e R. Muleo <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di scienze e tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Laboratorio di Ecofisiologia Molecolare delle Piante Arboree, Università della Tuscia

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Economico-Estimative degli Alimenti, Università di Perugia

<sup>3</sup>ENEA, TRISAIA Research Center, Rotondella (Matera)

Le cultivar hanno delle proprietà intrinseche che le differenziano tra loro per il carattere fenotipico *colorazione del frutto*, che interessa sia i tessuti dell'epicarpo sia quelli del mesocarpo. Una moltitudine di geni, codificano proteine di regolazione e enzimi strutturali che compongono la rete di interazione tra la drupa/pianta e i fattori ambientali, regolante tale carattere. La diversità genetica e epigenetica presente genera una ricca diversità comportamentale tra le varietà del germoplasma olivicolo italiano.

La sintesi e l'accumulo dei flavonoidi controllano la comparsa del colore nella drupa. Le mutazioni nei geni codificanti proteine di regolazione sono fattori chiave della via metabolica della biosintesi dei flavonoidi, e sono stati associati a fenotipi caratterizzati da una colorazione diversa. Nei frutti colorati, la comparsa in questi geni delle mutazioni genera una variazione nelle funzioni delle proteine target, che si ripercuote nella sintesi, nella distribuzione e/o nell'accumulo dei flavonoidi.

In questo studio, condotto in "Leucocarpa", "Leccino" e "Buscionetto" descriviamo il comportamento dell'espressione di un gene *MYB* la cui proteina regola l'espressione di geni codificanti gli enzimi implicati nella sintesi dei flavonoidi. In aggiunta ai risultati molecolari, i risultati biochimici confermano che la modifica di espressione è responsabile dell'assenza di antociani nei tessuti del frutto di "Leucocarpa", producendo a maturazione della drupa il fenotipo *drupa bianca*, diverso dal fenotipo, che si osserva in "Leccino", caratterizzato dal carattere *drupa nero-viola-cea*. La cultivar "Buscionetto" per le sue peculiari manifestazioni temporali del fenotipo *colorazione del frutto*, con colorazione *drupa bianca* che compare circa sette giorni prima della colorazione drupa colorata, riassume in sé quanto individuato nelle altre due cultivar recanti fenotipi estremi. Una stretta relazione esiste, sia temporalmente sia spazialmente, tra l'espressione dei geni *MYBs*, i relativi geni target codificanti gli enzimi e l'accumulo di metaboliti.

## Identificazione dei geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi dell'olio di oliva

N. Cultrera<sup>1</sup>, R. Mariotti<sup>1</sup>, F. Alagna<sup>1</sup>, V. Sarri<sup>2</sup>, M. Ceccarelli<sup>2</sup>, M. Bellucci<sup>1</sup> e L. Baldoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNR - Istituto di Bioscienze e Bio-risorse (IBBR), Perugia

<sup>2</sup> Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università di Perugia

Lo studio dei determinanti genetici che influenzano la biosintesi degli acidi grassi, compresi gli step di allungamento della catena acilica, è estremamente importante per chiarire i meccanismi che regolano o limitano l'accumulo dei trigliceridi nel mesocarpo dei frutti di olivo.

Abbiamo identificato e caratterizzato quattro principali famiglie di geni coinvolti nell'allungamento e desaturazione degli acidi grassi: Acil Carrier Protein (*ACP*),  $\beta$ -chetoacil-ACP sintasi I (*KAS I*) e II (*KAS II*) e stearoil-ACP-desaturasi (*SAD*). *ACP* è il cofattore principale per la sintesi plasmidiale degli acidi grassi, *KAS I* catalizza la conversione del substrato C4:0-ACP per la produzione di C16:0-ACP, *KAS II* catalizza l'allungamento finale da C16:0-ACP a C18:0-ACP, mentre *SAD* desatura la stearoil-ACP per produrre oleoil-ACP nei plastidi.

Sono stati identificati tre geni *OeACP* e numerosi alotipi sono stati distinti nelle principali cultivar di olivo. La loro espressione è stata caratterizzata in diversi tessuti e uno dei geni è stato sovraespresso in piante di tabacco, al fine di alterare i livelli di *ACP* e di analizzarne le possibili conseguenze sulla biosintesi dei lipidi. L'analisi fenotipica delle piante trasformate che esprimono elevate quantità di *ACP* in diversi tessuti è attualmente in corso.

L'analisi delle sequenze genomiche preliminari di olivo e delle librerie EST (Expressed Sequence Tags) di frutto, ha permesso di individuare tre copie del gene *OeKASI*, le cui sequenze sono state caratterizzate evidenziando numerosi polimorfismi. L'analisi di espressione nel mesocarpo di frutti ha permesso di individuare i migliori candidati coinvolti nella sintesi degli acidi grassi dell'olio. Lo stesso approccio è stato utilizzato per identificare due varianti *OeSAD* e quattro copie del gene *OeKASII*. L'identificazione delle varianti alotipiche e l'analisi della loro espressione nei tessuti che accumulano olio è attualmente in corso.

## Fenologia e crescita delle olive, cv Rasara

C. Giulivo, B. Ruperti e V. Cardillo

Università di Padova

Nell'olivicultura dei Colli Euganei la cultivar locale "Rasara", geneticamente simile alle cultivar "Frantoio" e "Casaliva", è la più diffusa con il 38 % degli alberi, contribuendo in modo particolare all'alta tipicità e alla qualità dell'olio extravergine prodotto nel territorio, che ha conquistato notevoli riconoscimenti in vari concorsi e l'apprezzamento da parte dei consumatori più evoluti ed esigenti.

Nel variegato mosaico orografico, pedologico e climatico nel quale si trovano gli impianti il comportamento vegetativo e produttivo degli olivi appare alquanto diversificato.

Al fine di studiare come la cv "Rasara" si comporta nelle diverse condizioni colturali, nel biennio 2009-2010 sono state effettuate osservazioni sulla fenologia, sulla crescita delle drupe e sulla cascola dei frutti in tre oliveti in produzione caratterizzati da esposizione, altimetria e terreni differenti. I rilievi sono stati effettuati sulle drupe di 10 rami di medio vigore selezionati su 5 alberi per sito con cadenza di 7-10 giorni da subito dopo l'allegagione fino alla raccolta. Le due annate sono risultate alquanto diverse soprattutto per la piovosità della stagione vegetativa, risultata molto scarsa nel 2009. Le fasi fenologiche sono apparse abbastanza indipendenti dal sito ad eccezione dell'invaiaura. La crescita delle drupe è stata ridotta dalla piovosità estiva; la durata della fase di stasi è risultata particolarmente prolungata nei siti dove la piovosità è stata molto scarsa e la capacità di ritenzione idrica del suolo era più limitata. In questi siti la cascola dei frutti è risultata molto forte prima dell'indurimento dell'endocarpo.

## Indagine preliminare sulla variabilità intra-cultivar di varietà di olivo pugliesi

S. Zelasco<sup>1</sup>, C. Montemurro<sup>2</sup>, A. Salimonti<sup>1</sup>, M. Miazzi<sup>2</sup>, V. Di Rienzo<sup>2</sup>, E. Perri<sup>1</sup>, F. L. Conforti<sup>3</sup>, G. F.P. Fanizzi<sup>4</sup>, L. Del Coco<sup>4</sup> e G. Lo Feudo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), Rende (Cosenza)

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università di Bari Aldo Moro

<sup>3</sup>Consiglio Nazionale delle Ricerche-Istituto di Scienze Neurologiche, Mangone (Cosenza)

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università del Salento Lecce

L'olivo è una delle piante arboree che tra le prime ha subito la domesticazione. Le origini dell'olivo non sono ancora del tutto chiare così come non è ancora del tutto chiaro l'assetto genetico dell'intero germoplasma olivicolo mondiale. Attualmente i marcatori molecolari più utilizzati per la caratterizzazione genetica in olivo sono i marcatori microsatellite. I microsatelliti generalmente utilizzati in olivo sono per lo più caratterizzati da motivi ripetuti dinucleotidici e ciò complica notevolmente l'assegnazione allelica. Numerosi autori hanno riscontrato varianti alleliche entro la stessa varietà, indicando che la variabilità intra-cultivar è frequente in olivo, tant'è che spesso le cultivar vengono considerate delle cultivar-popolazione. In questo lavoro sono state campionate 160 accessioni riconducibili a quattro varietà pugliesi (Coratina, Peranzana, Cima di Bitonto e Cima di Mola) localizzate in aree geografiche differenti tra le province di Bari e Foggia. L'analisi molecolare è stata condotta da due laboratori utilizzando 8 marcatori microsatellite. I risultati dell'indagine preliminare mostrano che le accessioni analizzate sono riconducibili alle quattro varietà di riferimento e che mostrano un profilo molecolare unico che non evidenzia variabilità intra-cultivar.

## Caratterizzazione morfologica e molecolare della variabilità intracultivar in accessioni di olivo

F. Scollo<sup>1</sup>, G. Distefano<sup>1</sup>, G. Las Casas<sup>1</sup>, A. Continella<sup>1</sup>, S. La Malfa<sup>1</sup>, P. Hernández<sup>2</sup>, G. Dorado<sup>3</sup> e A. Gentile<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), Università di Catania

<sup>2</sup>Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle piante più rappresentative dell'ambiente mediterraneo. In Sicilia, è presente con una molteplicità di accessioni e un'ampia variabilità intraspecifica, determinata non solo dalla biologia riproduttiva dell'olivo ma anche dalla pluralità degli ambienti di coltivazione, nonché dalla posizione geografica strategica da sempre crocevia del Mediterraneo.

Il lavoro, svolto presso la sez. Arboricoltura del Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA) dell'Università degli Studi di Catania e l'Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC di Cordoba, ha avuto lo scopo di realizzare una caratterizzazione morfologica e molecolare di 24 accessioni appartenenti alle tre principali cultivar della Sicilia Sud-Orientale ('Tonda Iblea', 'Biancolilla', 'Moresca'). Le accessioni sono state confrontate con le più importanti cultivar presenti nel panorama olivicolo regionale ed internazionale rappresentato da circa 60 accessioni. Marcatori cloroplastici e nucleari sono stati analizzati mediante analisi High Resolution Melting (HRM) allo scopo di validare le potenzialità della tecnica per identificare cloni e la presenza di variabilità intracultivar.

Le analisi di carattere morfologico e molecolare hanno permesso di discriminare le principali cultivar analizzate, nonché quelle accessioni considerate cloni delle cultivar maggiormente diffuse nella Sicilia orientale, aprendo interessanti prospettive per quanto riguarda possibili applicazioni dei risultati per programmi di selezione clonale. Nel complesso lo studio realizzato tramite HRM costituisce la prima indagine condotta sulla composizione policlonale di alcune tra le più importanti cultivar siciliane, consentendo di fornire informazioni utili per la definizione della struttura genetica della specie in Sicilia e per l'identificazione varietale.

## Caratterizzazione molecolare di varietà algierine di olivo

M. Miazzi<sup>1</sup>, V. Di Rienzo<sup>1</sup>, V. Fanelli<sup>1</sup>, S. Boucheffa<sup>2</sup>, A. Tamendjari<sup>2</sup>, G. Mangini<sup>1</sup>, C. De Giovanni<sup>1</sup>, A. Blanco<sup>1</sup> e C. Montemurro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari

<sup>2</sup> Facoltà di Scienze Naturali e della Vita, Laboratorio di Biochimica Applicata, Università di Bejaia, Algeria

Il paesaggio Mediterraneo ha, tra i suoi tratti tipici, la diffusa presenza dell'olivo (*Olea europaea* L.). Tutti i Paesi del bacino possiedono un ampio panorama di varietà coltivate e selvatiche adattate a diversi microclimi, le quali rappresentano un enorme riserva di biodiversità e una preziosa risorsa economica. La caratterizzazione di tale patrimonio genetico è strategico nella lotta all'erosione della biodiversità in tale specie, ed è indispensabile per una corretta ed efficace gestione e valorizzazione della stessa. L'Algeria è uno dei maggiori produttori di olio e olive, e, in particolare, la regione di Kabylie, che copre il 54% della superficie algerina coltivata ad olivo, rappresenta una importante riserva di germoplasma, ancora in gran parte poco studiata e valorizzata. La variabilità genetica di 42 accessioni di olivo, coltivate e selvatiche, provenienti da quest'area, è stata esplorata, attraverso l'analisi di 15 marcatori microsatelliti (SSR). I marcatori molecolari usati hanno prodotto profili di amplificazione chiari ed univoci, ed hanno mostrato un buon potere discriminante, fornendo un cospicuo numero di alleli (12,3 alleli per locus in media), ed evidenziando un potere di discriminazione compreso tra 0,67 (EMO90) e 0,94 (DCA07). In generale, nel germoplasma olivicolo analizzato è stato osservato un alto livello di polimorfismo, confermando l'esistenza di una notevole variabilità tra le accessioni di questa specie. L'elevata variabilità genetica riscontrata è stata usata per attribuire a ciascuna varietà un profilo unico identificativo. La combinazione dei diversi profili allelici ha consentito di distinguere 38 delle 42 accessioni analizzate. I risultati dell'analisi sono stati rappresentati in un dendrogramma in cui si sono separati due gruppi principali che corrispondono, con alcune eccezioni, alle accessioni coltivate o a quelle selvatiche. Nel I gruppo, un'accessione della cv. Takesrith è risultata identica a tre cloni di diversa origine della cv. Chemlal, indicando, probabilmente, un caso di sinonimia. Al contrario, 4 accessioni della cv. Azeraji di diversa origine geografica, sono risultate molto diverse tra loro. Per queste accessioni, si procederà ad ampliare l'analisi con altri marcatori.

## Effetto di alcune soluzioni metodologiche sulla moltiplicazione *in vitro* di olivo

M. Micheli, T. Gardi e D. Farinelli

Dipartimento di Scienze Agrarie alimentari e ambientali, Università di Perugia

Come è noto, la domanda di materiale di propagazione di qualità nel settore olivicolo è aumentata nel corso dell'ultimo decennio in maniera rilevante, soprattutto grazie alla maggiore diffusione di questa coltura a livello internazionale. Per soddisfare le esigenze di mercato, la micropropagazione potrebbe rappresentare anche per l'olivo un efficace strumento operativo al servizio dei vivaisti, come avviene ormai abitualmente per altre specie legnose. Tuttavia alcuni limiti metodologici, quali la bassa produttività o l'incidenza dei costi di alcune componenti nutritive (fitoregolatori), ne sembrano ancora limitare le potenzialità applicative, condizionate fortemente anche dalla necessità di dover mettere a punto protocolli diversificati in grado di soddisfare le specifiche esigenze di una ampia base genetica. In tal senso, l'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'effetto di alcuni semplici accorgimenti procedurali sulla proliferazione *in vitro* di una delle cultivar di olivo maggiormente diffuse ('Moraiolo'). Sono stati studiati il posizionamento degli espanti rispetto alla superficie del terreno di coltura (Prova 1) e il ricorso a differenti tipologie di espanti iniziali (Prova 2). In particolare, nel primo esperimento porzioni uninodali *in vitro*-derivate di olivo sono state posizionate su OMM, arricchito di zeatina, sia nella classica posizione verticale con la base immersa nel substrato agarizzato, che leggermente affondate in orizzontale nel terreno nutritivo, assicurandone il completo contatto con l'asse dell'espanto. Al termine di tre subcolture successive, a parità di condizioni nutritive, l'impiego di espanti orientati in orizzontale, in combinazione con l'impiego di dosi più contenute di zeatina, ha consentito di conseguire un coefficiente di moltiplicazione significativamente maggiore e tendenzialmente più costante. Nel secondo esperimento si è fatto ricorso ad una tipologia di espanto (binodale) più vicina a quella impiegata dagli operatori dei laboratori commerciali, che generalmente ricorrono a tagli grossolani delle masse proliferate allo scopo di ridurre i tempi di manipolazione del materiale vegetale. Nelle medesime condizioni di coltura, è emerso come gli espanti binodali posti in orizzontale sul substrato nutritivo abbiano mediamente sviluppato germogli molto vigorosi e qualitativamente più idonei per la fase di radicazione. In sintesi, le indicazioni emerse dalla sperimentazione sembrano utili ad ampliare le conoscenze sulla coltura *in vitro* dell'olivo, al fine di rendere la micropropagazione di questa specie conveniente anche in termini economici rispetto a tecniche di moltiplicazione tradizionali.

## **Analisi trascrittomiche di geni connessi allo sviluppo del tubetto pollinico dell'olivo (*Olea europaea* L.)**

**D. Iaria<sup>1</sup>, A. Chiappetta<sup>2</sup> e I. Muzzalupo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia CRA-OLI, Rende (CS)

<sup>2</sup>DiBEST, Università della Calabria, Arcavacata di Rende (CS)

*Olea europaea* L. è una specie allogama generalmente considerata come auto-sterile. La biologia fioreale ha importanti implicazioni pratiche, dato che le caratteristiche dei fiori e la fioritura influenzano le caratteristiche delle drupe e la produttività della pianta.

Lo sviluppo del tubetto pollinico è un processo di crescita delle cellule polarizzate che trasporta i gameti maschili dallo stigma all'ovario per la fecondazione. Studi sullo sviluppo del tubetto pollinico in olivo sono presenti in letteratura, tuttavia le basi molecolari che sono alla base di questo processo non sono ancora completamente caratterizzate.

Utilizzando moderne tecniche di *next generation sequencing* (NGS) e la strategia di assemblaggio *de novo* del trascrittoma abbiamo studiato l'espressione genica del tubetto pollinico di piante di olivo, che sono cresciuti *in vitro* in presenza del proprio pistillo e in combinazione col pistillo di cultivar autosterili e auto-fertile.

I risultati hanno fornito un distinto profilo di espressione genica e molte delle sequenze differenzialmente espresse tra i campioni rientrano nelle famiglie di geni coinvolti nello sviluppo del tubo pollinico, come lipasi, carbossilesterasi, pectinesterasi, pectina metilesterasi, callosio sintasi. Sono stati inoltre identificati membri dell'actina, del fattore di depolimerizzazione actina e delle famiglie geniche della fibrina e delle proteine Ca<sup>2+</sup>, legate allo sviluppo e alla polarizzazione del tubetto pollinico, così come alcuni inibitori, quale l'inibitore della pectinesterasi.

L'approccio di trascrittomica, eseguita attraverso l'identificazione delle trascrizioni differenzialmente espresse, insieme all'annotazione funzionale estesa, conferma la complessità del meccanismo della germinazione del polline. I nostri dati, anche se preliminari, permettono di conoscere il livello di trascrizione delle famiglie di geni che sono coinvolti nei meccanismi di germinazione del tubetto pollinico in cultivar auto-fertile e auto-sterile e nell'impollinazione incrociata

## **Relazioni genetiche tra olivo selvatico della Calabria e della Sardegna mediante analisi SSR**

**I. Muzzalupo<sup>1</sup>, F. Pisani<sup>1</sup>, F. Greco<sup>1</sup>, I. Forgione<sup>1</sup>, V. Vizzarri<sup>1</sup> e A. Chiappetta<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura - Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, C.da Li Rocchi, Rende (CS)

<sup>2</sup>DiBEST, Università della Calabria, Arcavacata di Rende (CS)

Olivastro (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) è la forma selvatica dell'olivo (*O. europaea* var. *europaea*) ed è un componente comune della macchia mediterranea.

Olivastro, possiede un'elevata efficienza fotosintetica e tolleranza alla siccità. Viene comunemente usato come portainnesto e come impollinatore per diverse varietà coltivate di olivo, ma potrebbe anche essere usato nel recupero dei terreni erosi.

Nel presente studio è stata valutata la diversità genetica degli olivastri di diversa provenienza geografica: sessanta campioni raccolti in Sardegna e trentanove in Calabria. Inoltre, i profili molecolari dell'olivastro analizzati utilizzando undici marcatori microsatelliti nucleari (SSR), sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle varietà di olivo

Ognuna delle accessioni di olivastro rinvenute nei territori della Calabria e della Sardegna è stata georeferenziata ed successivamente è stata sottoposta a caratterizzazione mediante l'utilizzo di 11 marcatori SSR (*Simple Sequence Repeat*), precedentemente selezionati. Tali marcatori sono stati utilizzati per valutare la variabilità genetica di queste piante e le relazioni intercorrenti con varietà di olivo autoctone coltivate nelle stesse regioni e riportati nel *database* del progetto CERTOLIO ([www.certolio.org](http://www.certolio.org)).

Dai risultati ottenuti si è potuta osservare un'elevata diversità genetica nella popolazione di olivastri e i genotipi ottenuti si sono tutti differenziati tra loro. E' presente solo un possibile caso sinonimia. I modelli di variazione genetica utilizzati sono stati in grado di discriminare le forme di olivo selvatico presente nella zona continentale da quelle nella regione insulare. Dal confronto con le varietà d'olivo autoctone calabresi e sarde non sono emersi casi di sinonimia/omonimia e le forme coltivate si sono ben differenziate da quelle selvatiche.

## Fenotipizzazione di varietà di olivo in relazione alla composizione acidica

S. Zelasco<sup>1</sup>, A. Salimonti<sup>1</sup>, C. Montemurro<sup>2</sup>, V. Vizzarri<sup>1</sup>, M. Alessandrino<sup>1</sup>, G. Lo Feudo<sup>1</sup>, C. Basti<sup>1</sup>, e E. Perri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), Rende (Cosenza)*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università di Bari Aldo Moro*

Il germoplasma olivicolo è caratterizzato da ampia variabilità genetica. Di fatto, solo tra le varietà italiane, sono state descritte almeno 628 cultivar, comprendenti anche alcune varianti clonali, la cui esatta individuazione e descrizione vengono rese difficoltose dalla presenza di numerosi casi di sinonimia e omonimia. Alcuni autori ritengono che la caratterizzazione molecolare non sia esaustiva o completamente efficace e che pertanto, ai fini della discriminazione varietale, occorra associare la descrizione morfo bioagronomica. Essendo la maggior parte dei caratteri agronomici e di importanza economica in varia misura condizionati dall'ambiente e dalle tecniche di coltivazione, per poter valutarne la componente genotipica è necessario disporre di germoplasma allevato in condizioni pedoclimatiche e colturali uniformi. In questo studio sono state prese in considerazione 96 varietà di olivo presenti presso il campo collezione di Mirto Crosia (CS) del CRA- OLI per le quali è stata determinata la composizione acidica per i principali acidi grassi (Acido palmitico, Acido stearico, Acido Oleico, Acido linoleico, Acido  $\alpha$ -linolenico) per un periodo di 3 anni. È stato calcolato il grado di correlazione tra gli acidi grassi e valutato l'effetto genotipico sulla composizione acidica utilizzando un'analisi della varianza multivariata (MANOVA 50-50). I risultati mostrano un livello di correlazione negativo statisticamente significativo tra acido palmitico e l'acido oleico e tra l'acido oleico e l'acido linoleico, mentre l'effetto genotipico sulla composizione acidica è risultato altamente significativo. I risultati ottenuti rappresentano uno strumento molto utile per integrare gli studi di genetica molecolare, quali studi di associazione, nonché, unitamente ad altri descrittori, per l'identificazione genetica delle varietà.

## Analisi molecolare di collezioni di germoplasma olivicolo

S. Zelasco<sup>1</sup>, J. Preece<sup>2</sup>, L. Baldoni<sup>3</sup>, R. Mariotti<sup>3</sup>, M. Aradhya<sup>2</sup>, A.M. Koehmstedt<sup>2</sup>, E. Perri<sup>1</sup> e A. Salimonti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), Rende (Cosenza)*

<sup>2</sup> *National Clonal Germplasm Repository, USDA-ARS, Davis, California, USA*

<sup>3</sup> *Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Bioscienze e Biorisorse (CNR-IBBR), Perugia*

La collezione americana di germoplasma olivicolo, mantenuta presso United States Department of Agriculture's National Clonal Germplasm Repository (USDA-NCGR) di Davis (CA), comprende 144 accessioni. L'origine incerta di molte accessioni, la loro non corretta denominazione, oltre alla complessa storia dello stesso campo collezione hanno determinato estrema confusione nel germoplasma collezionato. Al fine di individuare l'identità genetica della maggior parte delle cultivar li presenti, è stato effettuato un confronto con il germoplasma del campo collezione nazionale del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura -Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria olearia(CRA-OLI) e del Consiglio Nazionale delle Ricerche-Istituto di Bioscienze e Biorisorse (CNR-IBBR). L'analisi molecolare è stata condotta con sette marcatori microsatellite (SSR). La maggior parte dei genotipi identificati sono risultati corrispondenti a cultivar note del bacino del Mediterraneo, ma sono stati rilevati numerosi casi di denominazioni sbagliate o diverse da quelle dichiarate. Questo lavoro ha contribuito a fare chiarezza sulla corrispondenza genetica delle accessioni presenti nella principale collezione di varietà di olivo di un paese con notevoli potenzialità per lo sviluppo dell'olivicoltura come gli USA, e rappresenta un ulteriore passo verso una migliore gestione del germoplasma olivicolo mondiale.

## **Analisi di metaboliti e indagini molecolari in foglie di piante di olivo (*Olea europaea* L.) sottoposte a stress salino**

**L. Rossi<sup>1,2</sup>, M. Borghi<sup>2</sup>, A. Francini<sup>1</sup>, D-Y. Xie<sup>2</sup> e L. Sebastiani<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *BioLabs, Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa*

<sup>2</sup> *Department of Plant & Microbial Biology, North Carolina State University, Raleigh, USA*

Nel mondo sono coltivate oltre 750 milioni di piante di olivo (*Olea europaea* L.) il 95% delle quali si trova all'interno del bacino del Mediterraneo. Questa produzione apporta, da sempre, positive ripercussioni sugli aspetti economici e dietetici della popolazione. Tuttavia la produzione di olive e di olio d'oliva sta subendo alterazioni a causa dei cambiamenti climatici proprio nelle aree della sua principale coltivazione. Per far fronte a questa problematica la possibile irrigazione con acque salse è attualmente in fase di valutazione come un metodo praticabile per superare periodi prolungati di siccità. I risultati di questi esperimenti hanno dimostrato che alcune cultivar di olivo riescono a tollerare lo stress salino mantenendo la produzione costante. Data l'importanza che i metaboliti con proprietà nutraceutiche hanno per la salute umana, l'obiettivo principale di questa ricerca è stato quello di indagare il valore nutraceutico aggiunto delle foglie di piante di olivo (cultivar Leccino e Frantoio) sottoposte ad irrigazione con acque saline. Talee autoradicate di olivo sono state coltivate in cella climatica in vasi contenenti sabbia e argilla (vol 1:1) e fertirrigate con Olive Medium (OM). Cinque talee per genotipo sono state assegnate in modo casuale al trattamento con 60 mM o 120 mM NaCl, addizionato alla fertirrigazione con OM a cadenza settimanale. Le piante coltivate in OM senza aggiunta di NaCl sono state usate come controllo. I risultati dimostrano che dopo 40 giorni di trattamento le foglie di Frantoio aumentato il contenuto di metaboliti con proprietà nutraceutiche, in particolare canferolo e quercetina alla concentrazione più alta di sale usata (circa 5 volte il valore di controllo per il contenuto in canferolo e il 28% per la quercetina). Nella cultivar Leccino il trattamento 120 mM induce la produzione di quercetina, non ritrovata nelle altre due condizioni sperimentali (controllo e 60 mM NaCl). Le indagini molecolari confermano l'attivazione della via biosintetica dei diidroflavonoidi in entrambe le cultivar. In conclusione, lo stress salino risulta esaltare il metabolismo secondario delle foglie di olivo migliorandone le proprietà nutraceutiche e di conseguenza la rilevanza economica del tè ottenuto da foglia di olivo.

## **Effetto dell'accrescimento del germoglio sul ritorno a fiore in olivo**

**A. Tarragoni, E.M. Lodolini, M. Mandozzi e D. Neri**  
*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

L'evoluzione dell'olivicoltura verso modelli ad alta densità d'impianto presuppone una gestione oculata degli input colturali per controllare la crescita vegetativa e il carico produttivo del ramo misto. Il tasso di crescita vegetativa del germoglio sembra avere un effetto sul ritorno a fiore nell'anno successivo. L'obiettivo di questo lavoro è stato di valutare il ritorno a fiore e l'attitudine riproduttiva in rami misti caratterizzati da una diversa velocità di crescita del germoglio nell'anno precedente. Lo studio è stato condotto tra il 2013 e il 2014 su olivi di tre anni di età della cultivar Maurino allevati ad alta densità (1.250 alberi/ha) in un oliveto biologico in provincia di Fermo (Marche). I rilievi hanno interessato posizione, numero di infiorescenze, allegagione e numero di frutti sulla porzione di un anno di età del ramo misto e l'accrescimento del germoglio con identificazione del momento di formazione dei nodi lungo l'asse nel 2013(n). Sono stati misurati il ritorno a fiore, il numero di infiorescenze, l'allegagione e il carico di frutti nel 2014 (n+1). I risultati hanno mostrato che nel 2013 il numero di infiorescenze prodotte è stato maggiore nei rami misti con un minor tasso di crescita del germoglio, mentre per il numero di frutti allegati e alla raccolta non sono state osservate differenze significative. Prendendo in esame il ritorno a fiore nel 2014, espresso come numero di infiorescenze prodotte per ramo, tra i due ritmi di crescita sono stati osservati valori statisticamente maggiori nelle piante a maggior ritmo di crescita. Il numero di bottoni fiorali per infiorescenza, al contrario, è risultato maggiore nei rami con basso tasso di crescita. Il carico di frutti allegati per ramo, sebbene mostrasse un valore maggiore nei rami con alta velocità di crescita del germoglio nel 2013, non è risultato statisticamente significativo rispetto ai rami con bassa velocità di crescita. In conclusione, è possibile affermare che nelle specifiche condizioni sperimentali presentate in questo studio, una maggiore velocità di crescita del germoglio del ramo misto influisce sul ritorno a fiore nell'anno successivo favorendo un maggior numero totale di infiorescenze per ramo ma con numero di bottoni fiorali per singola infiorescenza inferiore e senza influire sul carico finale di frutti per ramo.

## Tolleranza al freddo e capacità di recupero di venti varietà di olivo delle Marche

**E.M. Lodolini<sup>1</sup>, B. Alfei<sup>2</sup>, A. Santinelli<sup>2</sup>, T. Cioccolanti<sup>1</sup> e D. Neri<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>*Agenzia Servizi Settore Agroalimentare delle Marche, ASSAM, Osimo (AN)*

L'olivo è una specie sempre verde che può essere soggetta a danni da freddo con temperature invernali al di sotto dei -8/-10°C o repentini ritorni di freddo in primavera. Tali condizioni climatiche sono abbastanza frequenti nell'Italia centrale e i danni possono variare da defogliazioni fino al distacco della corteccia su branche o tronco, in caso di danni molto gravi. Il presente studio ha valutato il livello di danno da freddo e la capacità di recupero di 20 varietà di olivo autoctone delle Marche. Al momento della gelata (febbraio 2012), gli alberi avevano tre anni di età. Il livello di danno è stato valutato mediante un indice visivo da 0 (nessun danno) a 4 (danno molto intenso). Durante la successiva stagione di crescita è stata valutata la capacità di recupero delle singole varietà (riscoppio vegetativo nella porzione apicale, centrale e basale dell'albero) utilizzando un indice visivo da 0 a 3. I risultati hanno confermato una diversa tolleranza e capacità di recupero delle varietà studiate. In particolare, Oliva Grossa e Sargano di San Benedetto hanno mostrato una forte suscettibilità al freddo riportando un elevato livello di danno su branche primarie e tronco (indice visivo >3). Al contrario, Ascolana Dura e Orbetana hanno mostrato un'elevata tolleranza al freddo con danni molto lievi (media=0,5). Capolga, Coroncina, Mignola, Mignolone e Rosciola hanno mostrato una bassa sensibilità al freddo riportando danni solo sui rami di un anno di età, mentre le rimanenti varietà si sono dimostrate mediamente suscettibili con danni principalmente su branche secondarie e terziarie (valori inclusi tra 2 e 3). Il riscoppio vegetativo è stato molto ridotto in Orbetana, Mignolone, Rosciola, Sargano di Fermo, Ascolana Dura e Capolga (<1) e molto buono in Ascolana Tenera, Carboncella, Oliva Grossa, Piantone di Mogliano, Sargano di San Benedetto e Sarganella (>2). Il presente studio ha permesso la caratterizzazione del germoplasma olivicolo marchigiano in base alla tolleranza al freddo e alla capacità di recupero, fornendo interessanti indicazioni sulle varietà più idonee alle zone con rischio di gelate invernali.

