

Rendiconto OLEA – I Anno

Unità Operativa 1

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA (EX DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA, VITERBO

Responsabile Prof. Rosario Muleo,

Ricercatori coinvolti:

Prof. Eddo Rugini, Responsabile del Work Package 7 Analisi sistematica architettura dell'albero;

Prof. Maurizio Ruzzi

Prof. Elia Poerio

Partecipazione dell'U.O ai WP 2, 3, 4, 6, 7 e 9.

Obiettivi della ricerca

Gli obiettivi dell'attività sono:

- la costruzione di repertori di geni coinvolti nello sviluppo del fiore e dell'ovario, del cambiamento di fase e della vigoria della pianta (foglia apice radicale);
- la comprensione dei meccanismi molecolari correlati con lo sviluppo del fiore e l'aborto dell'ovario e il cambiamento di fase;
- determinazione delle relazioni tra attività di enzimi endogeni e composizione in composti fenolici nel frutto;
- sviluppo di QTL e marcatori allelici per l'analisi della mappa genetica;
- sviluppo di nuovi marcatori SNPs per la genotipizzazione di cultivar di olivo;
- comportamento ecofisiologico indotto da portinnesti nanizzanti sull'architettura dell'albero, sulla vigoria, sulla sindrome di fuga dall'ombra;
- identificazione di portinnesti in grado di controllare le dimensioni degli alberi e l'induzione di resistenza a stress ambientali;
- sviluppo di genotipi con diverso grado di ploidia.

Attività svolte

WorkPackage 2 - Genomica Strutturale

Sviluppo di piante aploidi.

Per l'ottenimento di piante aploidi sono state condotte le attività di seguito descritte.

1. Impollinazione controllata, con polline di Canino irraggiato con UV, di piante del genotipo *Leccino dwarf*. Il polline, raccolto in campo, è stato irraggiato con raggi UV (2 Joule/sec) per 10, 20, 30 e 40 minuti (1200, 2400, 3600, 4800 Joule) per inattivare il nucleo dei granuli pollinici. È stato osservato lo sviluppo di frutticini di dimensioni ridotte.

2. Impollinazione controllata, con polline di Canino irraggiato con raggi, di piante del genotipo *Leccino dwarf*. Il polline, raccolto in campo, è stato irraggiato con raggi X in due dosi diverse: 150 e 200 Gy, per inattivare il nucleo dei granuli pollinici. Anche in questo caso sono stati osservati lo sviluppo di frutti di dimensioni ridotte.

3. Fiori impollinati delle piante di *Leccino dwarf* con polline di Canino sono stati trattati con soluzione acquosa di Blu di Toluidina 10 ppm, a 14, 24 e 48 ore dall'impollinazione, per bloccare l'allungamento del tubo pollinico e indurre embrioni aploidi. Queste prove sono da

considerare preliminari date le insufficienti informazioni disponibili in letteratura per la concentrazione e intervalli di tempi.

I tre esperimenti condotti hanno prodotto complessivamente 270 semenzali, di questi solamente 10 sono sopravvissuti. Analisi molecolari condotte con marcatori allelici SSR non hanno evidenziato la presenza di aploidi. Tuttavia, i semenzali sopravvissuti presentano caratteristiche fenotipiche uniche, indicando la possibilità di accadimenti di mutazione che sono in corso di studio.

Libreria genomica

Campionature di foglie giovani della cv Leccino effettuate in primavera in due diversi tempi ed inviati alla Lucign Corporation, 2120 West Greenview Drive, Middleton, Wisconsin, USA, per la costruzione di una libreria BAC. La campionatura è stata effettuata con l'UR2-IGVCNR Perugia. La libreria BAC prevista ha una copertura da 7 a 10X. Data una dimensione genomica di 1,5 Gbp per genoma aploide ed una dimensione media dei cloni di 100 Kbp è previsto la produzione da 100000 a 150000 cloni. Infine, sono state preparate 6 piante di Leccino ed inviate all'Institute of Experimental Botany, of the Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Czech Republic, diretto dal Prof. Jaroslav Dolezel, per la costruzione di librerie BAC.

WorkPackage 3 - Genomica Funzionale

3.4. Analisi dell'espressione genica su larga scala

Da diversi organi della pianta e varietà sono stati preparati campioni di ds-cDNA da utilizzare per il sequenziamento massivo 454 e illumina: da tessuti del fiore a diversi stadi dello sviluppo, fino alla piena antesi ed allegagione, di due cultivar, una con alta frequenza e l'altra con bassa frequenza di aborto ovarico; da tessuti della foglia e della radice della cultivar Leccino e di un suo mutante con fenotipo *dwarf*, al fine di identificare trascritti target per la vigoria. Inoltre dal pool di questi ultimi tessuti sono stati preparare delle libreria ds-cDNA per l'identificazione di smaller RNA che potrebbero essere coinvolti nel controllo della vigoria.

Analisi di espressione di alcuni trascritti sequenziali, coinvolti nei principali processi dello sviluppo del fiore e dello sviluppo del pistillo, sono state condotte con tecniche di RT-qPCR, così come sono stati indagati trascritti relativi allo sviluppo del mesocarpo in allegagione post-allegagione.

Tali analisi hanno consentito di individuare geni differentemente espressi nei diversi tessuti/stadi di sviluppo, candidati per un ruolo chiave nei processi di interesse.

Le analisi di espressione hanno consentito di validare i modelli di espressione differenziale identificati con analisi computazionali dei dati 454.

Inoltre, sono stati preparati, da una serie di campioni biologici campionati in tempi diversi, pool di trascritti per analizzare con sistemi microarray al fine di individuare pool di geni interessati nello sviluppo del fiore, dell'aborto del pistillo, dello sviluppo della foglia e della radici, nonché coinvolti nel cambiamento di fase. I pool di trascritti sono in procinto di essere processati in collaborazione con l'UO-ENEA.

WorkPackage 4 - Caratterizzazione delle risorse genetiche e breeding

4.1. Caratterizzazione delle risorse genetiche

Nuovi marcatori SSR per il genotyping

Sono in corso analisi di 58 marcatori microsatellitari con motivi poli-nucleotidici, derivanti da sequenze EST di fiore, polimorfiche tra le varietà Leccino e Dolce Agogia, e confrontate con una precedente libreria SSH, della stessa cv Leccino, per distinguere le differenze alleliche intra e intervarietale. Di questi marcatori è iniziato l'impiego con la tecnologia HRM per il genotyping delle varietà.

Nuovi marcatori SNP per genotyping e analisi della popolazione segregante LEDA

Sono stati individuati nuovi marcatori molecolari SNP nelle sequenze di regioni geniche di olivo che codificano per proteine ed enzimi con funzioni rilevanti per lo sviluppo della pianta e del frutto e coinvolti nella regolazione della sintesi di prodotti secondari. A questo scopo è stata utilizzata l'analisi HRM (High Resolution Melting), che può rivelare la presenza di mutazioni puntiformi in frammenti di dimensioni fino a 300 bp. Sono stati considerati sia geni in cui la presenza di SNPs era stata ipotizzata sulla base dell'analisi delle sequenze disponibili, sia geni per i quali non si avevano informazioni dettagliate. In particolare sono stati esaminati il fitocromo A, lupeol sintasi, cicloartenol sintasi, glicosil transferasi. L'insieme di SNP sviluppati è stato valutato su 23 cultivar di *Olea europaea L.* considerando frammenti di 300bp sulla base dei quali sono stati individuati complessivamente 38 nuovi SNPs in 3854 bp analizzate complessivamente, che comprendono 22 transversioni e 16 transizioni, e 2 indel di 2 e 3 bp. Infine sono stati selezionati 8 siti polimorfici da caratterizzare con HRM distribuiti tra i 4 geni (2 per fitocromo A, 1 per lupeol sintasi, 1 per glicosil trasferasi, 4 per cicloartenol sintasi uno dei quali ha due SNP consecutivi). Per questi SNPs la cultivar dolce agogia risulta essere sempre omozigote, mentre leccino è sempre eterozigote ad eccezione dello SNP della lupeol sintasi per il quale è omozigote. Il lavoro sta proseguendo sempre con lo stesso approccio su altri cinque geni. Invece gli SNPs del cloroplasto caratterizzati nell'attività 1 del WP4 non consentono alcuna distinzione tra leccino e dolce agogia. Nella popolazione segregante di LEDA sono stati impiegati marcatori SNP presenti in geni putativamente associati all'autoincompatibilità, SLG, SRK e SCR, precedentemente isolati dall'UR2-IGVCNR Perugia. I risultati dell'analisi condotta con tecnologia HRM evidenziano un'assenza di co-segregazione, pertanto i tre loci segregano in maniera indipendente.

Marcatori plastidiali

In collaborazione con l'UR2-IGVCNR Perugia sono stati impiegati 20 nuovi marcatori plastidiali, SNP, nell'analisi di 185 varietà di olivo e nell'analisi di confronto con diverse popolazioni di olivo selvatico e con sottospecie affini all'olivo coltivato. Lo scopo è quello di risalire all'origine delle varietà attualmente in coltivazione, stabilendo le loro relazioni con l'olivo selvatico e con le altre forme spontanee. Lo studio dovrebbe contribuire alla comprensione delle modalità di addomesticamento dell'olivo e della sua diffusione lungo le sponde del Mediterraneo. Al momento lo studio ha consentito di identificare 10 diversi clorotipi diffusi tra le varietà coltivate e altri 32 nelle forme affini e di stabilire l'origine filogenetica delle principali varietà italiane.

I campioni delle varietà coltivate derivano in gran parte dalla World Olive Germplasm Bank di Cordova (Spagna) e dalla collezione di DNA di genotipi di olivo dell'UR2-IGVCNR Perugia.

Nuovi campioni sono stati raccolti dal Campo Collezione di Varietà di Olivo della Provincia di Enna ed è in corso la verifica della loro corrispondenza con le varietà precedentemente caratterizzate nell'ambito del Progetto OLVIVA, che rappresentano il pool di riferimento per le regioni italiane, mediante l'impiego di un subset di marcatori SSR già usati in precedenza. Nell'ambito del progetto OLEA, oltre alle varietà italiane, si stanno analizzando le varietà più importanti del bacino del Mediterraneo con nuovi marcatori SSR e SNP, anche per risolvere i problemi rimasti insoluti con i marcatori SSR di-nucleotidici usati precedentemente relativamente all'identità di certi genotipi.

4.2 Breeding - Selezione assistita

Marcatori QTL

In collaborazione con l'UR2-IGVCNR Perugia sono stati avviati rilievi sull'architettura dell'albero, le dimensioni e il grado di sviluppo delle piante in campo della progenie LEDA. I rilievi effettuati hanno riguardato diversi parametri di accrescimento, quali la dimensioni del tronco e della chioma, l'angolo di inserzione delle branche e dei rami per il portamento, il

numero complessivo delle branche e dei rami per la determinazione della densità della chioma, il numero di mignole, l'altezza e la lunghezza complessiva dei rami a fiore per determinazione dello stato dello sviluppo dalla fase giovanile a quella adulta. Sono in corso i rilievi sulla prima fruttificazione.

La mappa genetica che ne deriverà potrà contribuire all'allineamento delle sequenze genomiche.

Programma di incroci per breeding

Un programma di miglioramento genetico per incrocio intervarietale e un programma di selezione massale da progenie ottenute da impollinazione libera, è stato avviato in questo WP e nel WP.7 con gli obiettivi di costituire nuove varietà e selezionare nuovi portinnesti clonali. Gli obiettivi di questo programma sono succintamente i seguenti: a) la riduzione della vigoria e il controllo dello sviluppo della chioma, b) l'incremento della resistenza siccità ed alla salinità, c) la produzione costante e elevata efficienza di produzione, d) drupa con contenuto elevato in olio e con caratteristiche qualitative alte, e) induzione di resistenza alla mosca. L'attività è svolta con la UR2-IGVCNR Perugia.

Selezioni di individua da libera impollinazione

Nell'ambito di una prospezione sul territorio sono stati individuati piante che vivono in particolari condizioni ambientali quali suoli salini e ambienti freddi. Da queste piante sono state raccolte le drupe, generate da libera impollinazione, e gli embrioni sono stati messi in coltura in vitro per accelerare lo sviluppo dei semenzali. Esperimenti preliminari di selezione a condizioni di salinità hanno permesso di individuare 5 semenzali in grado di esistere ad irrigazioni saline, pertanto questi soggetti serviranno a definire gli aspetti fisiologici e molecolari di putativi meccanismi di adattamento in olivo. Saranno, inoltre, oggetto di studio per un loro impiego come portainnesti.

WorkPackage 6 - Analisi sistematica organi riproduttivi: fiori e frutti

1. Fiore - Preparazione di campioni biologici

Sono stati raccolti campioni di diversi organi fiorali dalle cultivar Leccino e Dolce Agogia, Ascolana tenera, Canino, Rosciola e Nucleare del Belice durante le fasi di sviluppo del fiore e della fecondazione, destinati sia all'estrazione di RNA per sequenziamento massivo e all'analisi di espressione che alle osservazioni citologiche e ad esperimenti di ibridazione in situ.

Analisi dell'induzione fiorale

L'attività è stata svolta in collaborazione con le UO-ENEA Trisaia, CNR IGVPG e UNIPD. Sono stati raccolti campioni, durante tutto il corso dell'anno, di gemme, foglie, internodi e mignole. Per lo studio della risposta della pianta a fattori endogeni e orologio biologico sono stati effettuati campionamenti durante l'arco della giornata in prossimità di equinozi e solstizi. In soggetti all'interno di due popolazioni LE x DA e LE X BT che hanno manifestato nel corso stagionale una chiara e costante attitudine giovanile nei rami bassi della chioma, mentre in quelli alti è stata rilevata per la prima volta l'induzione fiorale e l'allegagione del frutto, sono stati effettuate delle campionature per lo studio del cambiamento di fase (giovanile/adulto) e induzione fiorale. Quest'ultima attività è stata svolta in collaborazione con l'UR2-IGVCNR Perugia.

Analisi morfologica dell'infiorescenza e dell'allegagione del fiore in frutto.

L'infiorescenza (panicola) dell'olivo è ramificata e reca molti fiori. Nelle cvs Leccino, Moraiolo, Canino, Uovo di Piccione, è stata indagata la stabilità della struttura della panicola e il/i fiore/i che ha la maggiore probabilità di allegare in frutto. Panicole della cv Leccino sono state manipolate, rimuovendone parti oppure rimuovendo quella omologa dello stesso nodo, opposta ad essa. Il fruit set è stato differente da cultivar a cultivar e il fiore con la frequenza

maggiore che è allegato in Uovo di Piccione è quello della ramificazione 2, in Leccino della ramificazione 2 e 5T, in Canino e Moraiolo quello del fiore terminale della panucula.

Analisi dell'espressione di geni target coinvolti nello sviluppo del fiore e dell'aborto ovarico

Il profilo dei trascritti di 55 geni coinvolti nello sviluppo del fiore e nell'aborto ovarico sono stati analizzati in Leccino e in Dolce Agogia. L'indagine è stata condotta con la tecnica Real Time-PCR, valutando l'espressione in stadi diversi dello sviluppo del fiore, fino alla allegazione. I geni *OeSVP* e *OeSPL*, coinvolti nell'induzione del fiore, sembrerebbero avere un ruolo anche nella regolazione dello sviluppo degli elementi fiorali e, comunque, sono maggiormente espressi nei fiori laterali e nel pistillo di Dolce Agogia. Nessuna differenza di espressione, tra le due cultivar, è stata osservata per i geni *OeMADs*, di cui è acclarato il loro controllo dello sviluppo dei componenti fiorali. Tra i geni *OeMYBs*, *OeMYBF1*, *MYBPA2* e *MYBC2* presentano differenze di espressione sia tra gli stadi dello sviluppo del fiore sia tra le cultivar. I geni *OeRAXs*, che controllano la ramificazione dei meristemi presentano anch'essi dei pathways di espressione di notevole interesse. Interessante è il pathway *OeMyB56* che codifica per un fattore di trascrizione regolante l'espressione dei geni che sintetizzano gli enzimi legati alla sintesi e all'idrolisi degli zuccheri, dell'amido, degli zuccheri alcolici e della cellulosa. L'insieme di questi geni è diversamente espressa tra le due cultivar nei diversi stadi di sviluppo degli organi fiorali. I geni *OeMC1*, *OeBAX1*, *OeUbiquitin1* e *OeCYS* sono maggiormente espressi in Dolce Agogia ove si verifica una maggiore cascola fiorale e a aborto ovarico. Il gene che codifica una proteina che preserva dalla morte cellulare *OeDAD1*, presenta anch'esso un pathway di espressione molto interessante. I geni *OeERECTA*, *OeERECTAlike*, così come quelli del ciclo cellulare (geni delle cicline) e i geni che codificano per i fattori di trascrizione bHLH, presentano dei profili di espressione diversificati tra le cultivar e gli stadi di sviluppo.

Infine i geni che sono in relazione con gli ormoni, i brassinosteroidi e le poliammine sono diversamente espressi tra le cultivar. L'insieme dei geni è un valido strumento che permette di sviluppare marcatori molecolari legati allo sviluppo del fiore e del frutto e di individuare, nonché alla quantità e qualità della produzione. La conoscenza, inoltre delle sequenze, danno delle indicazioni sulla possibilità di individuare dei marcatori SNPs validi per identificare ecotipi di interesse.

6.1.3. Sviluppo di nuovi marcatori SNP

Sono stati caratterizzati geni putativamente coinvolti nella regolazione dello sviluppo fiorale e del frutto appena allegato, identificando diversi polimorfismi di sequenza (SNP e indel). tra le cultivar parentali della progenie di mappa, impiegati per verificare il loro grado di co-segregazione.

6.2. Frutto

Regolazione dello sviluppo del mesocarpo.

Per comprendere la regolazione del mesocarpo della drupa è stato avviato un'analisi di espressione di geni coinvolti nel controllo della proliferazione e distensione cellulare. Gli studi sono stati condotti in due varietà considerati modello per la dimensione finale del frutto: la cv Canino, fenotipo "*frutto piccolo - fp*", e la cv Ascolana Tenera, fenotipo "*frutto grande - fg*"; inoltre, campionature analoghe sono state effettuate nel corso temporale dello sviluppo del fiore e del frutto della cv Rosciola (*fp*) e Nocellara del Belice (*fg*). I tempi delle campionature sono state: 2 tempi in pre-antesi, in antesi, in allegazione e post-allegazione. Nel fenotipo *fp* i geni della famiglia PLAC8 sono maggiormente espressi; in particolare i geni *CNR1/FW2.2* e *CNR2*, che regolano negativamente la proliferazione cellulare. I geni *ERECTA* e *ERECTA-like* e il gene *AINTEGUMENTA*, regolanti la proliferazione cellulare tramite la mediazione del segnale auxinico, nei due organi, sono risultati maggiormente espressi nella

drupa di Ascolana Tenera. Nella stessa varietà anche *BEE1*, che media il segnale dei Brassinosteroidi e regola la distensione cellulare, è maggiormente espresso. I trascritti dei geni coinvolti nella sintesi delle poliammine (AIH, SPM, ADC, SPD) sono risultati maggiore in Ascolana tenera durante lo sviluppo del Pistillo. I geni del ciclo cellulare, CDKA, CDKB, CYCD e CYCB, sono fortemente regolati sia durante lo sviluppo del Pistillo sia in quello del frutticino, ed una maggiore quantità di trascritti, di molti di essi, è stata osservata in Ascolana Tenera.

Il network di regolazione dei geni codificanti enzimi coinvolti nella sintesi dei polifenoli

Dalla cultivar a frutto bianco Leucocarpa sono state campionate foglie, gemme, frutti per analisi molecolari sui meccanismi di regolazione dell'accumulo dei polifenoli e per la caratterizzazione di metaboliti.

WorkPackage 7 - Analisi dell'architettura dell'albero

Sono stati effettuati i rilievi sugli alberi della progenie LEDA, di 3 anni di età, relativamente a diversi parametri di accrescimento (dimensioni del tronco e della chioma), portamento (angolo di inserzione delle branche e dei rami), densità della chioma (numero complessivo di branche e di rami), grado di evoluzione verso la fase matura (numero di mignole, altezza e lunghezza complessiva dei rami a fiore). Sono in corso i rilievi sulla prima fruttificazione.

E' stata avviata la raccolta di campioni da semenzali a diverso grado di evoluzione giovanile-maturo finalizzata ad attività di RNA-seq per l'identificazione dei fattori che controllano e/o regolano la giovanilità in olivo, sia di alcuni soggetti della progenia LEDA sia in alcuni soggetti della progenia Leccino x Bianca di Tirana.

Delle seguenti cv: Leccino, a portamento espanso, Dolce Agogia, a portamento assurgente, e Pendolino, a portamento pendolo, sono state propagate 200 piante da ciascuna di esse. Al momento le piante sono di dimensione di circa 10 cm di lunghezza e sono state rinvasate in un terriccio idoneo per iniziare lo studio delle cenosi simulate, al fine di identificare la loro plasticità di adattamento alla sindrome di fuga dall'ombra.

Il confronto agronomico di piante innestate, con il nesto canino (cultivar molto vigorosa) e portinnesti "Leccino 4n" e "Leccino 2n mutato", nonché canino autoinnestato, ha evidenziato il contenimento dello sviluppo della chioma, imputabile al minor diametro del tronco, dell'altezza dell'asse principale e del volume della chioma. Il controllo della chioma si aggira intorno a circa il 30% rispetto alle piante controllo.

Gli incroci effettuati hanno interessato diverse cultivar, perseguendo le finalità di seguito riportate.

Incroci intervarietali per l'ottenimento di portinnesti affini con molte cultivar, attraverso l'utilizzo di varie combinazioni: Leccino dwarf x Dolce Agogia, con l'intento di selezione individui che possano essere impiegati come cultivar a ridotta vigoria e essere impiegati come portinnesti per altre cultivar. In considerazione della qualità dell'olio di Dolce Agogia si è inteso anche trasferire questo carattere nei putativi individui da impiegare come cultivar. Da questo incrocio sono stati ottenuti diversi semi di cui sono in allevamento forzato 42 individui.

Incrocio intravarietale tra soggetti recanti mutazioni con fenotipo utile ai tratti agronomici, al fine da impiegare come portinnesti nel controllo della vigoria: Leccino dwarf x Leccino LM3 Leccino LM3. Con questo incrocio si è inteso associare il carattere "nanismo" recante dal Leccino dwarf, al carattere alta vigoria presente nel Leccino LM3, che se impiegato come portinnesto induce nella cultivar molto vigorosa, canino, una riduzione del 30% della vigoria, analoga a quella del Leccino dwarf. Attualmente 44 semenzali sono in allevamento forzato per selezionare individui con fenotipi interessanti.

Incrocio intravarietale tra Leccino wt e leccino mutato LM3, recante il carattere frutto piccolo e allorché impiegato come portinnesto è in grado di ridurre la vigoria. Attualmente sono in

allevamento forzato 167 individui, da impiegare in un'analisi QTL per i caratteri dimensione del frutto e sviluppo della chioma.

Incrocio tra intravarietale tra il Leccino wt e il Leccino dwarf mutato, al fine di introdurre il carattere ridotta vigoria. Attualmente ci sono solamente 9 semenzali.

Gli incroci Intervarietali previsti che erano stato previsti non sono risultati fertili.

Studio del cambiamento di fase, transizione dallo stato giovanile ad adulto.

Sono state effettuate delle campionature di gemme e foglie da piante di due popolazioni LE x DA e LE X BT, con fenotipo di transizione giovanile/adulto, caratterizzate dalla fioritura nella parte apicale della chioma (parte adulta della pianta) e da caratteri prettamente giovanili nella parte basale (parte della pianta giovane). Le campionature sono state effettuate nel periodo compreso tra la metà di settembre ed i primi di novembre, periodo in cui dovrebbe avvenire la maturazione dei processi di induzione florale.

Work Package 9 – Metabolismo e fisiologia

1. Attività enzimatiche endogene coinvolte nel metabolismo della frazione fenolica del frutto (polifenolossidasi, perossidasi), glucosidasi e metilesterasi.

In drupe della cv Frantoio e Leccino, prelevate nel periodo luglio-ottobre 2011 da piante sottoposte a differenti regimi irrigui (UO di PISA) è stata valutata la relazione tra composizione in composti fenolici e attività degli enzimi polifenolossidasi, β -glucosidasi e perossidasi.

Attività polifenolossidasi. Nelle drupe della cv Frantoio, si osserva un andamento differente dei livelli di attività polifenolossidasi in funzione del regime di irrigazione al quale sono state sottoposte le piante, lungo il loro sviluppo. E' presente una notevole variabilità nei livelli di attività polifenolossidasi in drupe raccolte da piante stressate rispetto a quelle di piante sottoposte a irrigazione. In termini assoluti è significativo che in periodi più vicini alla maturazione fisiologica della drupa, e quindi in prossimità della raccolta, l'attività polifenolossidasi nelle drupe di piante non irrigate è sempre inferiore a quello rilevato in piante sottoposte a irrigazione. Nelle drupe della cultivar Leccino (stressate e non), l'attività polifenolossidasi riscontrati ai diversi stadi di maturazione, sono nettamente inferiori a quelli ritrovati nei corrispondenti campioni della cv Frantoio.

Attività perossidasi. L'attività perossidasi, nelle drupe della cv Frantoio, è differente in funzione del grado dello sviluppo, e del regime d'irrigazione al quale sono state sottoposte le piante. I livelli di attività perossidasi tendono a diminuire in agosto, a prescindere dal regime d'irrigazione, e ad aumentare di nuovo nel periodo successivo (25/08-16/09), per poi mantenersi stabili in settembre-ottobre. Nell'ultimo campionamento (ottobre), l'attività perossidasi nelle drupe di piante irrigate sono superiori di circa il 50% rispetto a quella rilevati in drupe di piante non irrigate. Analogamente, in funzione del grado di maturazione delle drupe, è presente nella cv Leccino (sia irrigata che non). Anche per questa cv che, complessivamente in tutte le fasi di raccolta delle drupe, presenta livelli più bassi dell'attività perossidasi rispetto alla cv Frantoio, l'irrigazione determina livelli più elevati (30-50%) di attività perossidasi.

Attività beta-glucosidasi. Quest'attività idrolasica è coinvolta nella degradazione dell'oleuropeina, il secoiridoide più abbondante nelle fasi iniziali di sviluppo della drupa. L'attività enzimatica determinata a luglio nelle drupe di Frantoio e Leccino è maggiore a quella rilevata nei successivi stadi di maturazione, indipendentemente dal regime d'irrigazione. Nel periodo agosto-ottobre, l'attività si riduce fino a quasi annullarsi, con l'approssimarsi della piena maturazione della drupa. In termini assoluti nelle due cv, i livelli di attività e le loro variazioni in funzione dello sviluppo sono perfettamente paragonabili, sia in piante stressate che non. Gli elevati livelli di attività evidenziati nei campionamenti di

luglio si giustificano con il ruolo che le beta-glucosidasi hanno nel processo di differenziazione dell'endocarpo.

Sintesi dei polifenoli nella drupa di Leucocarpa.

L'analisi dei secoroidi, i polifenoli prevalentemente sintetizzati nella drupa di oliva non sono risultati qualitativamente e quantitativamente diversi da quelli di Leccino. Sono in corso analisi dei flavonoidi al fine di determinarne la loro composizione e quantità. Quest'attività è stata svolta con l'UR14-UNIPG.

Risultati ottenuti

- Collezione di DNA di 140 cultivar italiane.
- Identificazione di circa 100 marcatori SNP su geni candidati per la regolazione dello sviluppo della pianta, induzione e sviluppo del florale, sintesi dell'olio, il trasporto degli zuccheri e l'auto-incompatibilità.
- Caratterizzazione di cultivar con 20 marcatori plastidiali.
- Geni putativi regolanti lo sviluppo, o target dello stesso, che sono espressi diversamente tra i diversi organi della pianta e tra varietà, candidati ad assolvere un ruolo "pivot" nei processi chiave della crescita e produzione.
- Moltiplicazione e allevamento di circa 320 semenzali da incrocio intervarietale per finalità di mappatura e miglioramento genetico.
- Raccolta dati di caratteri fenotipici sugli individui della progenie LEDA per mappatura QTL.
- Raccolta dati sui genotipi sottoposti a selezione.
- Ottenimento di 10 mutanti somaclonali.
- Messa a punto di un protocollo che controlla l'attività enzimatica della drupa.

Ostacoli incontrati e azioni correttive

Le tecniche impiegate per l'ottenimento degli aploidi non hanno portato al successo sperato, pertanto nell'anno in corso sarà impiegata la tecnologia della coltura *in vitro*, al fine di indurre da polline, deiscende da antere, callo aploide. Successivamente, il callo ottenuto sarà sottoposto a esperimenti induttivi per la rigenerazione e l'embriogenesi somatica.

La preparazione delle cenosi simulate da impiegare nello studio della regolazione dello sviluppo della chioma, purtroppo, ha subito un ritardo dovuto alla lenta propagazione delle piante di Leccino, Dolce Agogia e Pendolino. La propagazione delle piante è avvenuta per talea autoradicata. Al momento sono in fase di trasferimento in vaso 200 piantine autoradicate per ciascuna delle cultivar, della dimensione media di circa 10 cm.

Pubblicazioni / Eventi divulgativi / Eventi formativi

Riviste internazionali ISI

Mariotti R., Cultrera N.G.M., Rubini A., Belaj A., Domínguez-García M.C., Muleo R., Cirilli M., Colli F., Baldoni L. Chlorotyping the olive cultivars. PNAS (under submission)
Colao M.C., Galla G., Caceres M.E, Barcaccia G., Collani S., Alagna F., Baldoni L., Rugini E. and Muleo R., 2012. Identification and transcriptional profiling of genes differentially expressed during flower development in *Olea europaea* L. Under submission to Tree Genetics and Genomics

Presentazioni a congressi nazionali e internazionali

Muleo R., Baldoni L., 2011. The OLEA Project: an Italian initiative toward the development of genomic resources for olive. IV Int. Conf. OLIVEBIOTEQ, 31 Ott – 4 Nov, Chania, Creta, Grecia.

Collani S., Alagna F., Colao C., Galla G., Ramina A., Baldoni L., Perrotta G., Muleo R., Barcaccia G., 2011. Self-incompatibility in olive: a new hypothesis on the S-locus genes controlling pollen-pistil interaction. Int. Workshop ‘Floral Biology and S-Incompatibility in Fruit Species’, San Michele all’Adige (Trento) e Bologna, 22-25 Giugno.

Barcaccia G., Botton A., Galla G., Baldoni L., Muleo R., Perrotta G., Ramina A., 2011. Comparative genomics for identifying flower organ identity genes in peach and olive. Int. Workshop ‘Floral Biology and S-Incompatibility in Fruit Species’, San Michele all’Adige (Trento) e Bologna, 22-25 Giugno.

Partecipazione ad incontri ed eventi di divulgazione del progetto OLEA

Giornata di Studio del Progetto OLEA. Accademia dei Georgofili, Università della Tuscia, 13 Aprile 2012.

Giornata di Studio, Riproduzione sessuata delle piante a fiore e produttività agricola. La genomica dell’olivo legata alla riproduzione. Accademia dei Georgofili 30 marzo 2012.

Presentazione del Progetto OLEA. Spello, Villa Fidelia, 10 Dicembre 2011.

Muleo R., Baldoni L., 2011. The OLEA Project: an Italian initiative toward the development of genomic resources for olive. IV Int. Conf. OLIVEBIOTEQ, 31 Ott – 4 Nov, Chania, Creta, Grecia.

Presentazione del Progetto OLEA. MIPAF, Roma, 24 Ottobre 2011.

Incontro OLEA - Genomica e Miglioramento Genetico dell’Olivo. Università di Padova, 9 - 10 Giugno 2011.

Muleo R., Il progetto OLEA e dell’olivicoltura italiana. Incontro “Slow Food e l’extravergine. Visone e proposte per l’olivicoltura”, Vinitaly, Verona, 10 Aprile 2011.

| Timbro Istituzione | Firma Responsabile Scientifico U.O. |
|---------------------------|--|
| | |