

Progetto Genomica e Miglioramento Genetico dell'Olivo OLEA

(Work Package 9)

Relazione sull'attività scientifica del I anno

Responsabile scientifico: Prof. Riccardo Gucci

Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose

Università di Pisa

*Responsabile scientifico: Prof. Riccardo Gucci
Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose
Università di Pisa*

Relazione sulle attività svolte nel I anno

Obiettivi

I tre obiettivi generali del WP9 sono di:

- a) evidenziare la variabilità in alcune importanti cultivar e negli olivi selvatici dei metaboliti del frutto, con particolare attenzione ai composti di interesse salutistico;
- b) analizzare le relazioni tra enzimi endogeni e composizione in composti fenolici del frutto e dell'olio vergine di oliva;
- c) analizzare le relazioni tra enzimi endogeni del frutto e produzione di composti volatili ad impatto sensoriale nell'olio extravergine di oliva.

Tali obiettivi nascono dal fatto che si ritiene che l'analisi genomica del frutto non possa prescindere dalla conoscenza dettagliata dei profili metabolici corrispondenti alle diverse fasi di sviluppo e maturazione della drupa.

In particolare, l'unità del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose dell'Università di Pisa (DCDSL-UNIFI) ha il compito di valutare gli effetti dell'ambiente di coltivazione e di differenti regimi idrici sul contenuto in metaboliti secondari delle olive e dell'olio di oliva e di fornire i campioni di foglie e frutti di alberi allevati in diverse condizioni di deficit idrico alle unità delle Università della Toscana e di Perugia del WP9.

Materiale vegetale

Sono stati prelevati campioni di foglie e frutti da alberi delle varietà Leccino e Frantoio in un oliveto intensivo, irrigato, in piena produzione presso i campi sperimentali del DCDSL-UNIFI situati a Venturina (LI). L'oliveto, piantato nell'aprile 2003, consiste di 12 parcelle suddivise in tre blocchi, ciascuna costituita da tre file di quattro piante ed isolata dalle parcelle contigue da file di bordo.

L'appezzamento è fornito di un impianto di sub-irrigazione avente una portata oraria massima di 1560 L, predisposto per la fertirrigazione, collegato ad un pozzo aziendale. La sub-irrigazione è stata gestita in modo da somministrare uguali quantità di acqua a tutte le parcelle durante la fase di allevamento e fino alla stagione di crescita 2005 inclusa. Nel 2010 e 2011 sono stati fatti rispettivamente 4 e 12 interventi di fertirrigazione, prima della differenziazione dei livelli irrigui, nel periodo fra aprile e giugno utilizzando concime Poly-feed N:P:K (20:20:20). In totale, nel corso del 2010 e 2011 sono stati somministrati 30 e 90 g di N, P e K₂O ad albero, rispettivamente.

La piena fioritura è avvenuta il 18 maggio 2010 e il 24 maggio 2011. La raccolta dei frutti è stata effettuata il 27 ottobre 2010 e il 17 ottobre 2011 (153 e 147 giorni dopo la piena fioritura, rispettivamente nel 2010 e 2011) tranne che per gli alberi utilizzati per i campionamenti successivi.

La gestione dell'oliveto è stata condotta secondo criteri di sostenibilità ambientale e di contenimento dei costi di produzione. Il suolo è inerbito e periodicamente sfalcato (due e tre sfalci nel 2010 e 2011, rispettivamente). Durante le operazioni di sfalcio primaverile venivano triturati anche i residui di potatura. La gestione della chioma nell'oliveto ha seguito i criteri della potatura minima con l'allevamento degli alberi a vaso a chioma libera. In entrambi gli anni gli interventi di potatura sono stati eseguiti nel periodo marzo-aprile. Per il controllo di malattie sono stati effettuati 3 e 6 trattamenti con pasta SIAPA nel 2010 e 2011, rispettivamente. Contro la mosca olearia (*Bactrocera oleae* Rossi) sono stati effettuati 2 (12 luglio e 11 agosto) e 3 (14 luglio, 11 agosto e 31 agosto) trattamenti a base di Dimetoato nel 2010 e 2011, rispettivamente.

L'irrigazione è stata inizialmente impostata in modo da ottenere tre differenti livelli irrigui nel 2010 (Caruso et al., 2011):

- piena irrigazione con restituzione del 100% del fabbisogno giornaliero;
- irrigazione con restituzione del 50% del fabbisogno giornaliero;
- irrigazione di soccorso.

e due livelli irrigui nel 2011:

- piena irrigazione con restituzione del 100% del fabbisogno giornaliero;
- irrigazione di soccorso.

I fabbisogni irrigui sono stati calcolati settimanalmente utilizzando i valori di evapotraspirazione potenziale, rilevati mediante la stazione meteorologica presente nell'oliveto. I volumi irrigui somministrati nei due anni di sperimentazione sono riportati in tabella 1. Il calcolo dei volumi irrigui ha tenuto conto degli apporti derivanti dalle piogge utili, calcolate moltiplicando le precipitazioni per un fattore di correzione pari a 0.75 ed escludendo quelle inferiori a 4 mm. Nel periodo compreso tra il 1 luglio e il 25 ottobre 2010 le precipitazioni totali sono state pari a 242 mm di cui 53, 3, 92 e 94 mm nei mesi di luglio, agosto, settembre e ottobre, rispettivamente. Nel periodo compreso tra il 1 luglio e il 17 ottobre 2011 le precipitazioni totali sono state pari a 20 mm di cui 12, 6, 0 e 2 mm nei mesi di luglio, agosto, settembre e ottobre, rispettivamente. Il livello di deficit idrico conseguito veniva determinato settimanalmente mediante misura del potenziale idrico fogliare al termine del periodo notturno per ciascun albero in prova (Figg. 3 e 4). Le foglie, completamente espanse, sono state prelevate nella parte mediana di rami a frutto di un anno e il potenziale misurato con camera a pressione. I valori di potenziale idrico sono stati poi integrati su base stagionale per calcolare il livello di deficit idrico per ciascun albero, secondo metodologie standard (Gucci et al., 2007). Le abbondanti precipitazioni dell'estate 2010 hanno ripristinato periodicamente un livello idrico nel suolo in grado di mantenere gli alberi in un buono stato idrico anche in assenza di irrigazione. Al contrario, nel 2011, la forte siccità estiva ha causato una marcata differenziazione nello stato idrico degli alberi ed ha reso necessarie alcune irrigazioni di soccorso per la tesi in asciutto nei mesi di agosto e settembre.

Tabella 1 Volumi di acqua somministrati per ciascuna tesi durante il periodo di differenziazione dell'irrigazione a Venturina (LI) nel 2009, 2010 e 2011.

Irrigazione	Anno	Periodo irriguo	Volumi irrigui [m ³ ha ⁻¹]
Piena	2010	29 Giu – 10 Ott	922
Deficit			115
Soccorso			114
Piena	2011	1 Lug – 26 Sett	734
Soccorso			33

Campionamenti

Il materiale vegetale per lo studio metabolico e molecolare è stato prelevato da olivi delle cultivar Frantoio e Leccino diversamente irrigati durante il periodo di sviluppo del frutto secondo quanto riportato nella (Tabella 1). Un prelievo preliminare di circa 30 foglie per albero era stato effettuato in precedenza per verificare l'effettiva rispondenza varietale degli alberi prescelti da parte dell'unità IGV-PG (D.ssa Baldoni), che ha utilizzato marcatori molecolari.

Nel 2010 sono stati utilizzati 6 alberi (3 irrigati pienamente e 3 irrigati in deficit) per ciascuna cultivar (Frantoio e Leccino), per un totale di 12 alberi. I cinque campionamenti sono stati effettuati nel periodo compreso tra il 12 ottobre e il 24 novembre 2010. In particolare, nelle prime due date (12/10/2010 e 19/10/2010) sono stati prelevati 30 frutti da ciascun albero (nel primo campionamento solo da alberi pienamente irrigati), mentre nei rimanenti tre campionamenti (26/10/2010, 10/11/2010 e 24/11/2010) oltre al campione di 30 frutti è stato prelevato un campione di foglie (40 foglie da ciascun albero). Per ciascun campione di frutti veniva determinato il peso fresco e l'indice di maturazione, secondo metodologie standard (Gucci et al., 2007), e il contenuto di olio nel mesocarpo mediante risonanza magnetica nucleare (Caruso et al., 2011). Immediatamente dopo il prelievo, i campioni venivano posti all'interno di fogli di alluminio e immersi in azoto liquido (per circa 2 ore) fino al momento dello stoccaggio a -80 °C.

Nel 2011 sono stati utilizzati 8 alberi (4 irrigati pienamente e 4 irrigati in deficit) per 2 cultivar (Frantoio e Leccino), per un totale di 16 alberi. I campionamenti sono iniziati il 20 maggio e terminati il 15 novembre 2011 (in totale 14 campionamenti). Come nell'anno precedente immediatamente dopo il prelievo, i campioni venivano posti all'interno di fogli di alluminio e immersi in azoto liquido (dalle 2 alle 4 ore) fino al momento dello stoccaggio a -80 °C. Nelle prime due date di campionamento (20 e 27/5/2011) sono state prelevate rispettivamente 40 infiorescenze chiuse e aperte; in tutte le altre date i campioni erano composti da 4-10 g di frutti e 20-40 foglie. Il numero di frutti per campione non era costante tra le diverse date in quanto veniva adeguato, ove necessario, in relazione allo stadio di accrescimento del frutto. Il 6 e 13 luglio 2011, per 15 frutti di 6 piante (3 irrigati pienamente e 3 irrigati in deficit) della cultivar Frantoio, è stato separato il mesocarpo dall'endocarpo con l'utilizzo di un bisturi (Fig. 1) per valutare la concentrazione dei composti fenolici e l'espressione genica nei due tessuti in funzione dello stato idrico. Nell'ultima

data di campionamento (15 novembre 2011) il materiale è stato raccolto da 6 alberi (3 irrigati pienamente e 3 irrigati in deficit) della cultivar Frantoio.

Nelle tre tabelle che seguono sono riportati i campioni prelevati e distribuiti alle diverse unità operative del WP9:

Tabella 2. Materiale campionato e conservato a -80°C presso l'Università di Pisa (Prof. Gucci).

Anno	Data campionamento	Cultivar	Materiale
2010	12 Ottobre	Frantoio e Leccino	Frutti
2010	19 Ottobre	Frantoio e Leccino	Frutti
2010	26 Ottobre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2010	10 Novembre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2010	24 Novembre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	20 Maggio	Frantoio e Leccino	Infiorescenze chiuse
2011	27 Maggio	Frantoio e Leccino	Infiorescenze aperte
2011	17 Giugno	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	28 Giugno	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	6 Luglio	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	13 Luglio	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	26 Luglio	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	9 Agosto	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	25 Agosto	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	16 Settembre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	26 Settembre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	7 Ottobre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	17 Ottobre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	15 Novembre	Frantoio	Frutti e foglie

Tabella 3. Materiale consegnato all'Università della Tuscia (Prof. Muleo).

Anno	Data campionamento	Cultivar	Materiale
2011	20 Maggio	Frantoio e Leccino	Infiorescenze chiuse
2011	27 Maggio	Frantoio e Leccino	Infiorescenze aperte
2011	17 Giugno	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	28 Giugno	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	6 Luglio	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	13 Luglio	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	26 Luglio	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	9 Agosto	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	25 Agosto	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	16 Settembre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	26 Settembre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	7 Ottobre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie
2011	17 Ottobre	Frantoio e Leccino	Frutti e foglie

Tabella 4. Materiale consegnato all'Università di Perugia (Prof. Servili).

Anno	Data campionamento	Cultivar	Materiale
2011	28 Giugno	Frantoio	Frutti e foglie
2011	6 Luglio	Frantoio	Frutti interi, mesocarpo e endocarpo
2011	13 Luglio	Frantoio	Frutti interi, mesocarpo e endocarpo
2011	26 Luglio	Frantoio	Frutti
2011	9 Agosto	Frantoio	Frutti
2011	25 Agosto	Frantoio	Frutti
2011	16 Settembre	Frantoio	Frutti
2011	26 Settembre	Frantoio	Frutti
2011	7 Ottobre	Frantoio	Frutti
2011	17 Ottobre	Frantoio	Frutti
2011	15 Novembre	Frantoio	Frutti

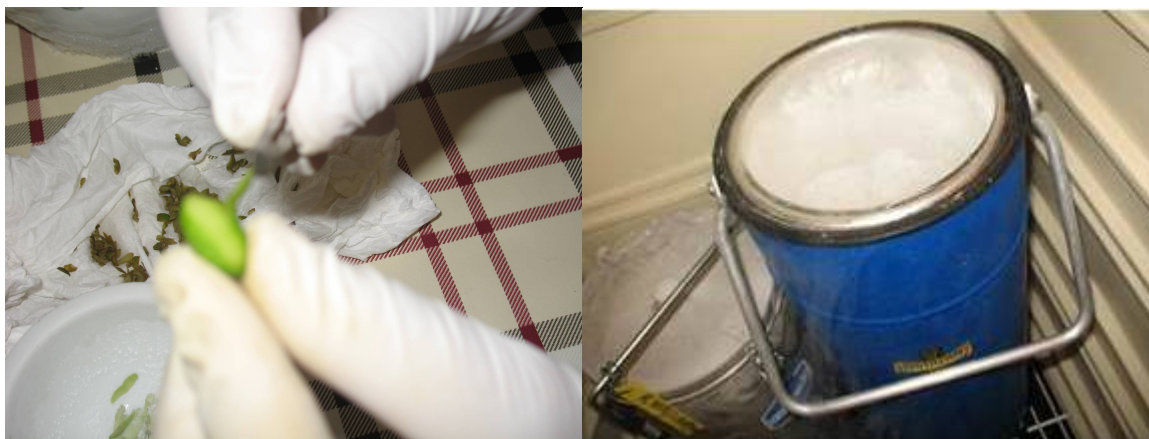


Figura 1. Sinistra: separazione del mesocarpo dall'endocarpo con bisturi; destra: materiale temporaneamente stoccato in azoto liquido.

Infine, il 25/10/2010, il 24/11/2010 e il 17/10/2011 sono stati prelevati dei campioni di olive (circa 3.5 kg per pianta) utilizzati per la trasformazione in olio e la determinazione dei parametri analitici. In particolare, il 25/10/2010 i campioni sono stati raccolti da 12 alberi della cultivar Frantoio differenziati per la gestione dell'irrigazione (piena irrigazione, irrigazione in deficit, irrigazione di soccorso), il 24/11/2010 sono stati utilizzati due alberi (uno pienamente irrigato e l'altro irrigato in deficit) sia per la cultivar Frantoio che per la cultivar Leccino, per un totale di 4 campioni e il 17/10/2011 sono stati 6 alberi di frantoio (3 per la tesi pienamente irrigata e 3 per la tesi con irrigazione di soccorso). I campioni di frutti sono stati consegnati entro 24 ore al Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti, Sezione di Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti dell'Università degli Studi di Perugia dove si è proceduto alla trasformazione in olio e alle successive analisi. In particolare, l'olio è stato ottenuto da olive lavorate entro 36 ore dalla raccolta. E' stato utilizzato un sistema di estrazione da laboratorio dotato di un frangitore a martelli, gramola e separatore centrifugo. La pasta è stata gramolata a 25 °C per 20 min, quindi l'olio separato per centrifugazione, immediatamente filtrato e conservato al buio °C.

Studio preliminare sull'espressione genica

Per quanto riguarda lo studio dell'espressione genica si utilizzerà la RT-PCR real-time, una recente tecnica innovativa ad alto potere risolutivo. Una delle condizioni fondamentali per utilizzare correttamente tale tecnica è sicuramente l'alta qualità dell'RNA di partenza e, quindi, un'adeguata preparazione del campione di analisi. Infatti, le indagini sull'espressione genica nelle piante si sono spesso rilevate problematiche a causa della difficoltà nell'estrarre RNA di alta qualità da tessuti contenenti alti livelli di composti fenolici, lipidici, carboidrati ed altri composti di varia natura. I composti fenolici, ad esempio, sono facilmente ossidabili e formano chinoni che legano gli acidi nucleici e rendono così l'RNA inutilizzabile per la trascrizione inversa e la successiva sintesi del cDNA. Per risolvere questo problema sono state messe a confronto diverse tecniche per l'estrazione dell'RNA totale. Tra queste l'utilizzo di kit (Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit, Bio-rad) o l'uso di protocolli per l'estrazione rapida dell'RNA si sono rivelati inadeguati ai nostri scopi. È stato perciò messo a punto un protocollo di estrazione, più lento, ma che permette di legare i composti fenolici presenti nei tessuti con il PVPP presente nel buffer d'estrazione e poi eliminarli tramite precipitazione con etanolo dell'RNA. Le proteine e i carboidrati sono stati poi eliminati con un'estrazione con fenolo/cloroformio e precipitazione con LiCl. Il controllo su gel di agarosio e allo spettrofotometro dell'RNA così estratto hanno evidenziato che tale metodo consente di ottenere una buona concentrazione di RNA e di buona qualità.

Un totale di 1 µg di tale RNA è stato utilizzato come template per la sintesi del cDNA tramite l'iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). La reazione è stata fatta avvenire secondo le specifiche della casa produttrice, utilizzando come primers gli Oligo dT forniti dalla stessa azienda.

Negli studi di espressione, la normalizzazione dei dati è essenziale per il controllo degli errori introdotti durante la preparazione del campione. I risultati della real-time RT-PCR sono altamente influenzati dalla scelta dei geni di riferimento, detti housekeeping. Validi geni di riferimento devono non solo essere espressi in tutti i campioni ma i livelli di espressione devono rimanere costanti al variare delle condizioni sperimentali. Il cDNA sintetizzato è stato quindi utilizzato per la validazione, ancora in corso, di un set di geni housekeeping di riferimento quali Ubiquitina, GAPDH, 18S rRNA e EF1- α .

Nel 2011 è stato estratto l'RNA di 20 campioni della cultivar Frantoio ed, in particolare; otto campioni per le prime otto date di campionamento precedenti l'inizio della differenziazione dell'irrigazione, e i restanti 12 campioni nelle successive 6 date (2 campioni per data e uno per tesi irrigua).

Per l'estrazione dell'RNA il materiale biologico raccolto in campo (frutto) è stato inizialmente polverizzato tramite azione meccanica (in questa fase il prodotto deve sempre essere congelato), si è proceduto all'estrazione in Fenol Cloroformio a partire da un grammo di tessuto in polvere. Per ogni campione di RNA estratto si è proseguito con una precipitazione in Cloruro di Litio e una purificazione con Kit (RNeasy MinElute Cleanup Handbook Kit, Qiagen). Tramite spettrofotometro e elettroforesi si è osservato che l'RNA risulta essere di buona qualità (non degradato e pulito) e quantità (una media di 300 ng/µl). Ogni campione è stato quindi aliquotato per ottenere una concentrazione finale di 5 µg di RNA/20µl di acqua. L'estrazione dell'RNA da buoni risultati in qualsiasi fase fenologica del frutto.

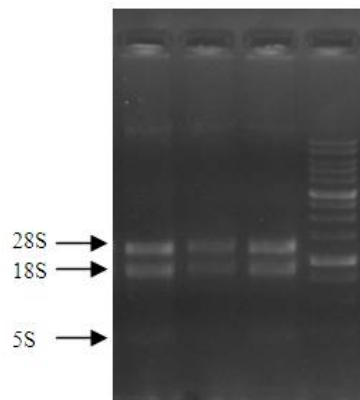


Figura 2. Corsa elettroforetica di RNA estratto da tre campioni di olive (primi tre pozzetti) e marker (ultimo pozzetto).

Risultati

I due anni durante i quali si è svolto lo studio (2010 e 2011) sono stati caratterizzati da andamenti climatici differenti, in particolare per quanto riguarda il regime pluviometrico. Ciò ha influito notevolmente sulla differenziazione dello stato idrico degli alberi e, conseguentemente, sul grado di deficit idrico conseguito. La Figura 1 mostra gli andamenti del potenziale idrico fogliare degli olivi sottoposti a diversi regimi irrigui nel 2010 e 2011. È evidente che, a differenza di quanto si è verificato nel 2011, la differenziazione dello stato idrico nel 2010 è avvenuta solo per un breve periodo di tempo (circa 20 giorni) ed ha riguardato principalmente la tesi pienamente irrigata rispetto alle altre due.

Il peso medio del frutto alla raccolta degli alberi pienamente irrigati è stato significativamente superiore a quello di olivi in asciutto nel 2011, mentre non sono state riscontrate differenze nel 2010 (Fig. 5). La maturazione dei frutti è stata influenzata in maniera evidente dall'irrigazione nel 2011, mostrando un aumento della colorazione all'aumentare del livello di stress idrico (Fig. 5). Il contenuto in olio nel mesocarpo è stato simile, seppur con valori leggermente superiori nel livello in deficit nel 2010, mentre differenze significative sono state misurate nel 2011 con valori per gli alberi pienamente irrigati pari al 114 % di quelli misurati in alberi in asciutto (Fig. 5).

Riunioni di coordinamento

Sono state effettuate due riunioni di coordinamento, la prima l'11 gennaio 2011 a Roma presso il Ministero con tutte le unità di ricerca, la seconda il 3 febbraio 2011 a Perugia a cui hanno partecipato le unità le cui attività ricadono nel WP9, la D.ssa Baldoni dell'IGV-PG e il coordinatore nazionale del progetto Dr. Muleo. E' stato, inoltre, effettuata una riunione di tutte le unità operative per l'esposizione dei risultati parziali il 10 giugno a Padova. La presentazione dei risultati del I anno è stata effettuata a Roma presso la sede del MIPAF il 18 novembre ed in forma divulgativa il 10 dicembre 2011 a Spello (PG).

Collaborazioni

Hanno collaborato la D.ssa Clizia Gennai, titolare di una borsa di studio semestrale del progetto OLEA, il Dr. Giovanni Caruso, assegnista di ricerca del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose, i tecnici Michele Bernardini e Maurizio Gentili.

Bibliografia

- Caruso G, Rapoport HF, Gucci R. 2011. Yield components of young olive trees during the onset of fruit production under different irrigation regimes. *Irrigation Science* (DOI: 10.1007/s00271-011-0286-0).
- Gucci R; Lodolini E M, Rapoport HF 2007. Productivity of olive trees with different water status and crop load. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 82(4): 648-656.

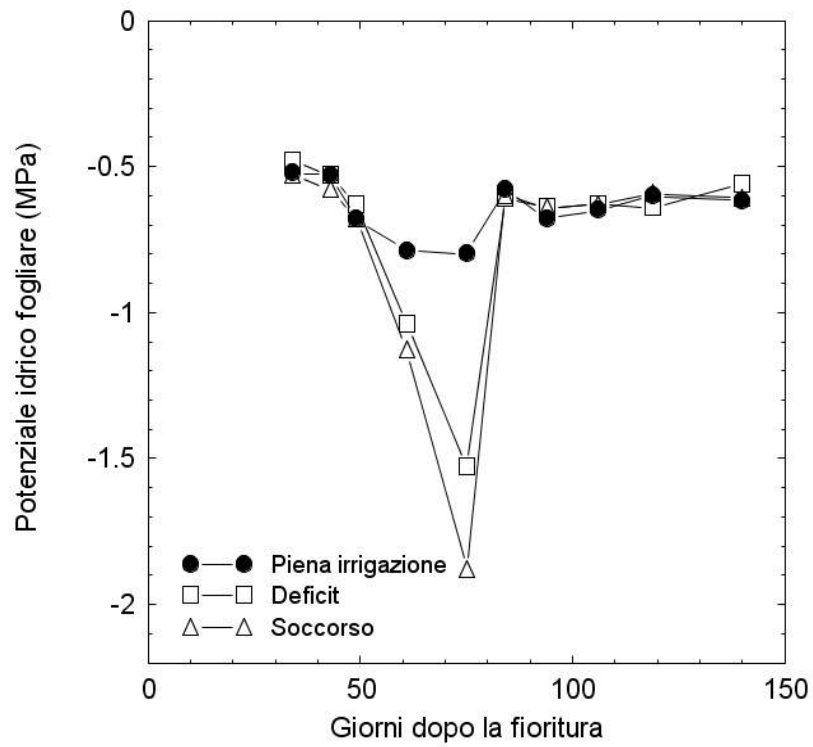


Figura 3. Potenziale idrico fogliare misurato all'alba in olivi (cv. Frantoio) sottoposti a differenti regimi irrigui a Venturina (LI) nel 2010.

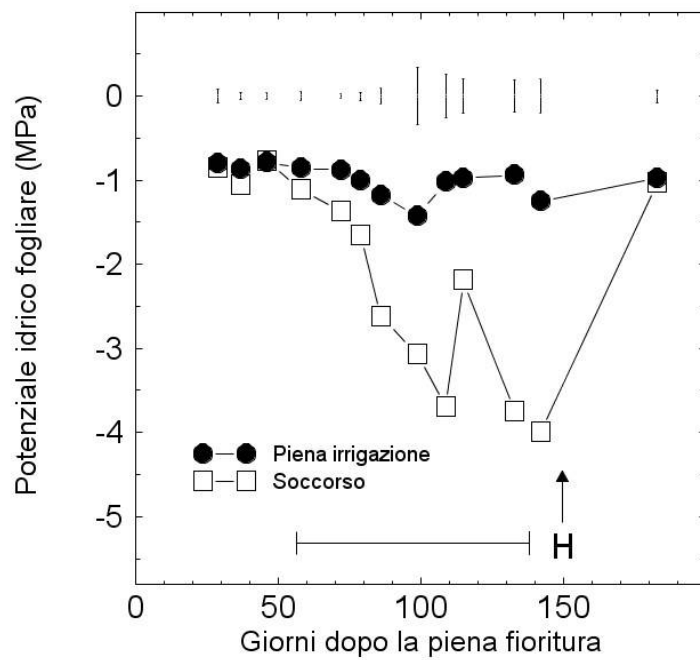


Figura 4. Potenziale idrico fogliare misurato all'alba in olivi (cv. Frantoio) sottoposti a differenti regimi irrigui a Venturina (LI) nel 2011.

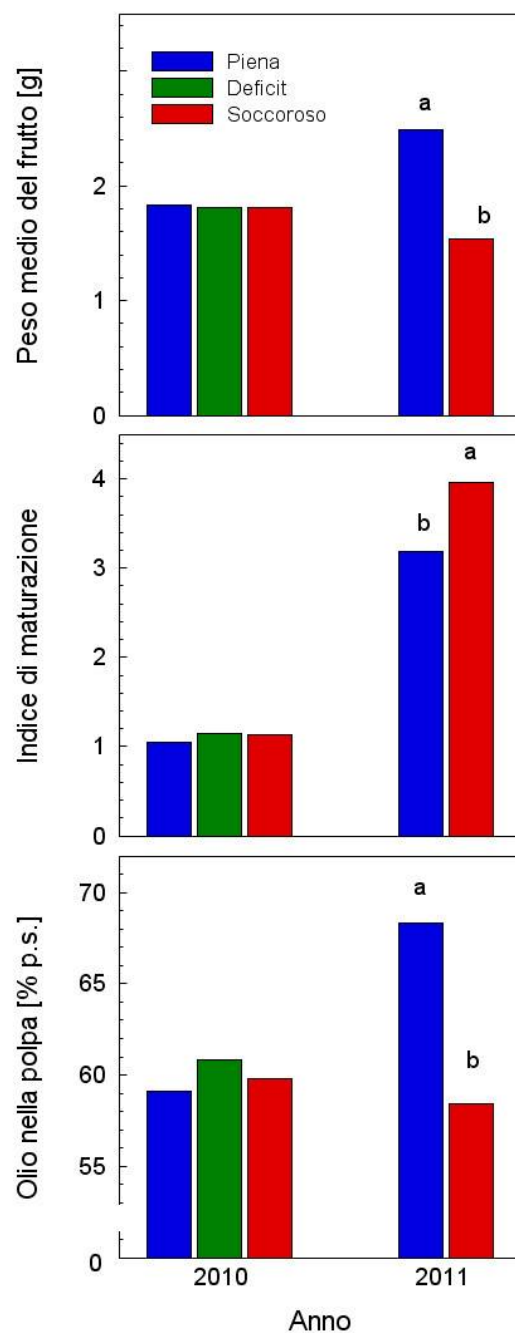


Figura 5. Peso medio del frutto, indice di maturazione e contenuto in olio nel mesocarpo in olivi (cv. Frantoio) sottoposti a tre differenti regimi irrigui (pieno, deficit e soccorso) a Venturina (LI) nel 2010 e 2011. I valori sono medie di 4 repliche per tesi.