

# Rendiconto OLEA – I Anno

U.O. 2-CNR-IGV – ISTITUTO DI GENETICA VEGETALE, U.O.S. di Perugia

Dott. Luciana Baldoni

Responsabile del Work Package 4: Caratterizzazione delle risorse genetiche e breeding:  
Partecipazione ai WP 2, 3, 6 e 7.

## Obiettivi della ricerca

L'attività ha come obiettivi principali:

- la caratterizzazione funzionale delle varietà italiane di maggiore interesse produttivo, reale o potenziale;
- il genotyping delle risorse genetiche presenti nelle principali collezioni di germoplasma;
- lo sviluppo di strumenti per la tracciabilità molecolare degli oli di oliva prodotti in Italia;
- la costruzione di mappe genetiche per l'ancoraggio della sequenza del genoma;
- l'identificazione di QTL da impiegare per la selezione assistita;
- la selezione di portinnesti per il contenimento delle dimensioni degli alberi e l'induzione di resistenza a stress ambientali e al Verticillium.

## Attività svolte

### WorkPackage 4 - Caratterizzazione delle risorse genetiche e breeding

#### 4.1. Caratterizzazione delle risorse genetiche

##### Genotyping con nuovi marcatori SSR

Si è proceduto all'identificazione di nuovi marcatori microsatellitari basati su motivi polinucleotidici e derivanti da sequenze EST di fiore e di frutto polimorfiche tra le varietà Leccino-Dolce Agogia, Coratina-Tendellone, Leccino-Frantoio e Ortice-Ruveia, per un totale di 174 polimorfismi. Nuovi 30 potenziali marcatori sono stati testati su DNA di circa 30 varietà di riferimento per valutarne il polimorfismo e la possibilità di impiego per il genotyping delle varietà.

##### Genotyping con nuovi marcatori SNP

Si è proceduto all'identificazione di nuovi marcatori SNP su diversi geni candidati.

La ricerca di polimorfismi all'interno del gene per Acyl Carrier Protein ha messo in evidenza la presenza di 2 diversi loci (*ACP1* e *ACP2*). L'analisi di ciascun locus sullo stesso set di varietà indicata sopra ha messo in evidenza i seguenti valori:

*ACP1*. Su un frammento di 1000 bp sono stati trovati 29 SNP e 4 indel, con una frequenza di 1 polimorfismo ogni 30,3 bp. Nelle 96 cultivar sono stati trovati 6 aplotipi e 10 genotipi.

*ACP2*. Su un frammento di 1390 bp è stata osservata una variabilità molto maggiore rispetto agli altri due geni: 68 SNP, 8 indel e 4 SSR, per un totale di 80 polimorfismi (frequenza: 1 ogni 17,3 bp). 13 aplotipi, 31 genotipi.

*LUP*. Su un frammento di 555 bp sono stati trovati 10 SNP (frequenza: 1 ogni 55,5 bp), per un totale di 7 aplotipi e 12 genotipi.

L'analisi di tutti i polimorfismi di questi 4 geni ha consentito di discriminare il 90% delle 94 cultivar.

*SUT1*. Un frammento di 915 bp del gene per Sucrose Transporter 1 (*SUT1*) è stato sequenziato su un pool di 94 varietà. L'analisi ha consentito di trovare 24 SNP, 1 motivo ripetuto e 1 indel (inserzione/delezione), per un totale di 15 aplotipi e 22 genotipi. La frequenza dei polimorfismi è risultata di 1 ogni 32,5 bp.

*SLG, SRK e SCR*. Sono stati identificati polimorfismi sulle sequenze genomiche dei geni candidati per i determinanti maschili (*SCR*) e femminili (*SRK* e *SLG*) dell'auto-incompatibilità sporofitica allo scopo di verificare il grado di co-segregazione e quindi la co-presenza sullo stesso locus. L'analisi nella popolazione segregante ha messo in evidenza che i 3 loci segregano in maniera indipendente.

#### SNP derivanti dal sequenziamento dei trascrittomi e del genoma.

Le sequenze derivanti dall'RNA-seq e dal sequenziamento del genoma di cultivar altamente eterozigoti contengono una elevatissima percentuale di polimorfismi nucleotidici.

E' stato previsto che questi polimorfismi vengano prima validati per poi essere impiegati nell'ambito del progetto OLEA per il genotyping varietale.

#### Marcatori plastidiali

La recente identificazione di 40 nuovi marcatori plastidiali (20 SSR e 20 SNP) ha consentito il loro impiego per l'analisi di 185 varietà di olivo ed il 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 potrà rappresentare un importante contributo 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 del CNR-IGV di 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.

#### Tracciabilità molecolare degli oli

I polimorfismi plastidiali non risultano sufficienti a distinguere le cultivar ma soltanto a raggrupparle in 8 popolazioni varietali. Essi potranno quindi essere utilizzati esclusivamente come screening iniziale, mentre per finalità di tracciabilità molecolare e genotyping delle varietà dovranno essere impiegati marcatori SNP. A tal fine, quelli identificati fino ad oggi riescono a discriminare in maniera certa il 95% delle cultivar analizzate.

#### *4.2. Breeding - Selezione assistita*

##### Sviluppo di marcatori QTL

Allo scopo di identificare marcatori QTL associati ai principali caratteri in selezione nell'ambito dei programmi di miglioramento genetico delle varietà e dei portinnesti di olivo il progetto OLEA prevede la costruzione di mappe genetiche su popolazioni da incrocio intervarietale F1. Nella fattispecie viene impiegata una progenie derivante dall'incrocio delle cvs. Leccino x Dolce Agogia costituita da 180 genotipi. I semenzali originali sono stati messi in campo nel 2008 e nel 2011 alcuni di essi hanno superato la fase giovanile ed hanno cominciato a fiorire. Tutti i genotipi sono stati moltiplicati (per talea o per innesto su

portinnesti clonali della cv. Frantoio) e messi in campo, mentre 2 cloni di ciascuno sono conservati in vaso sotto tunnel.

E' stata osservata segregazione dei caratteri portamento dell'albero, precocità di entrata in fruttificazione e capacità di radicazione.

Da tutti i genotipi è stato estratto il DNA ed è stato eseguito un test di paternità per verificare la presenza di eventuali prodotti di autofecondazione o di fecondazione con polline estraneo.

E' stata avviata l'analisi molecolare della popolazione.

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

Sulle piante in campo sono stati eseguiti rilievi sull'architettura dell'albero, le dimensioni e il grado di evoluzione. Su alcuni esemplari della progenie Leccino x Dolce Agogia sono state avviate prove di resistenza al freddo e al Verticillium (WP 8).

#### *Programma di incroci per breeding*

Parallelamente è stato avviato un vasto programma di miglioramento genetico per incrocio intervarietale ed un altro di selezione massale da progenie ottenute da impollinazione libera.

Il programma di breeding persegue obiettivi diversi per la selezione di nuove varietà e per quella di nuovi portinnesti clonali.

#### Obiettivi della selezione di nuove cultivar:

- Precocità di fruttificazione;
- Produzione elevata e costante;
- Elevato contenuto in olio;
- Elevate caratteristiche qualitative dell'olio.

#### Obiettivi della selezione di nuovi portinnesti:

- Elevata capacità di radicazione per talea;
- Induzione di riduzione delle dimensioni della chioma;
- Induzione di resistenza alla siccità;
- Induzione di resistenza al Verticillium;
- Induzione di resistenza al sale.

I semenzali totali ottenuti sono i seguenti:

Incrocio:  $288 + 63 + 180 = 531$

Libera impollinazione:  $285 + 544 = 829$

Totale semenzali in allevamento: 1.360

Per la selezione dei portinnesti sono stati individuati alcuni genotipi che manifestano caratteristiche di interesse per i caratteri indicati sopra.

E' stata avviata la moltiplicazione del materiale da testare, che verrà successivamente innestato con alcune varietà per valutarne il comportamento in diverse combinazioni di innesto e in diverse condizioni culturali.

L'attività viene svolta in collaborazione con UR1-UNITUS.

## **WorkPackage 2 - Genomica Strutturale**

### *2.2. Identificazione di marcatori e mappatura genetica*

Per la costruzione di una mappa genetica ad alta densità viene impiegata una progenie da incrocio tra le cultivar Leccino e Dolce Agogia (LEDA) costituita da 180 individui, usando la strategia di pseudo-testcross a due vie.

Per escludere dalla popolazione gli individui derivanti da autofecondazione o da impollinatori estranei è stato eseguito un test di paternità preliminare impiegando 4 marcatori SSR appositamente scelti tra quelli maggiormente discriminanti tra le due varietà parentali.

*Marcatori SSR.* E' in corso la genotipizzazione della progenie impiegando i 108 marcatori SSR precedentemente identificati in olivo. Un panel di nuovi SSR poli-nucleotidici è stato ottenuto dalle collezioni di sequenze EST disponibili. Sono stati identificati 174 motivi ripetuti e polimorfici tra le varietà da cui le sequenze sono state ottenute e sono stati testati su DNA delle varietà Leccino, Dolce Agogia e Frantoio. Quelli risultati polimorfici tra le due varietà parentali verranno impiegati per la mappatura genetica.

*Marcatori SNP.* SNP identificati su geni candidati in processi di interesse (auto-incompatibilità, sintesi dei polifenoli e degli acidi grassi) sono stati testati sulla progenie LEDA per verificarne il grado di co-segregazione.

Per il genotyping massivo di SNP è in corso la verifica del metodo più efficiente ed economico da impiegare, sulla scorta dei più recenti sviluppi delle tecnologie di sequenziamento. Verranno impiegati SNP su sequenze codificanti derivate dai trascrittomi del fiore e del frutto con tecnologia 454 (Roche).

### **WorkPackage 3 - Genomica Funzionale**

#### *3.4. Analisi dell'espressione genica su larga scala*

Campioni di ds-cDNA da utilizzare per il sequenziamento massivo 454 sono stati preparati da diversi tessuti e varietà. In particolare, sono stati utilizzati frutti sottoposti all'attacco di mosca (*Bactrocera oleae*) a diversi stadi (frutti sani, ovideposizione, gallerie larvali e dopo sfarfallamento) in due varietà caratterizzate da un diverso grado di suscettibilità, tessuti fiorali di varietà auto-incompatibili e compatibili in diversi stadi di sviluppo del fiore.

Sono state condotte analisi di espressione mediante tecniche di RT-qPCR su trascritti sequenziati coinvolti nei principali processi metabolici del frutto (biosintesi di polifenoli, terpeni, secoiridoidi, fenilpropanoidi, steroli ed accumulo di olio) e su trascritti di fiore putativamente coinvolti nei meccanismi di auto-incompatibilità e di interazione tra polline e pistillo.

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

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

### **WorkPackage 6 - Analisi sistematica organi riproduttivi: fiori e frutti**

#### *6.1. Fiore - Preparazione di campioni biologici*

Sono stati raccolti campioni di diversi organi fiorali da cultivar auto-fertili e auto-sterili durante diverse fasi dell'interazione polline-pistillo 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.

##### *6.1.3. Sviluppo di nuovi marcatori SNP*

Sono stati caratterizzati i geni putativamente coinvolti nel meccanismo di auto-incompatibilità e sono stati identificati 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*

E' stata avviata la raccolta di campioni durante tutta la fase di sviluppo e maturazione dei frutti delle cv. Moraiolo e Leccino, rispettivamente a bassa ed alta cascola fisiologica, sia per estrazione di RNA che per l'analisi di ormoni e altri composti correlati alla forza di attacco dei frutti al peduncolo e al ramo. Viene rilevato anche il numero e il peso dei frutti cascolati naturalmente.

Il profilo di espressione di circa 30 trascritti coinvolti nel metabolismo dei principali composti secondari del frutto (polifenoli, secoiridoidi, lignani, fenilpropanoidi e steroli), ed importanti

per la determinazione della qualità dell'olio, è stato valutato con analisi RTqPCR in frutti di diverse varietà e in diverse fasi di sviluppo dei frutti.

Sono stati analizzati i composti volatili e i fitormoni rispettivamente in frutti sani e in frutti attaccati dalla mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*) nella cv. Leccino. Sugli stessi campioni sono stati identificati diversi trascritti modulati dallo sviluppo di etilene in seguito all'attacco di *B. oleae*.

### **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.

### **Risultati ottenuti**

- Collezione di DNA di 240 cultivar italiane.
- Identificazione di circa 200 marcatori SNP su geni candidati per la sintesi dell'olio, il trasporto degli zuccheri e l'auto-incompatibilità.
- Caratterizzazione di 90 cultivar con l'impiego di 130 marcatori SNP e indel.
- Caratterizzazione di 185 cultivar con 40 marcatori plastidiali.
- Genotipizzazione di oltre 200 campioni di olivi selvatici e sottospecie affini con marcatori plastidiali.
- Sviluppo di marcatori da impiegare per la tracciabilità molecolare degli oli, in grado di discriminare il 95% delle cultivar.
- Identificazione di geni differenzialmente espressi nei diversi tessuti/stadi di sviluppo, candidati per un ruolo chiave nei processi di interesse.
- Moltiplicazione e allevamento di circa 720 semenzali da incrocio intervarietale per finalità di mappatura e miglioramento genetico.
- Raccolta dati di almeno 20 caratteri fenotipici sugli individui della progenie LEDA per mappatura QTL.
- Raccolta dati sui genotipi sottoposti a selezione.

### **Ostacoli incontrati e azioni correttive**

Le attività di genotipizzazione e di mappatura genetica con un elevato numero di marcatori SNP non è stata ancora avviata per due ragioni: in primo luogo questi marker dovranno derivare dal sequenziamento dell'intero genoma, attualmente in corso e non ancora completato, quindi i dati non sono ancora disponibili, in secondo luogo le tecnologie di genotipizzazione high-throughput di questo tipo si stanno evolvendo con grande velocità e, a parità di costi, è diventato possibile ottenere un numero di marcatori di almeno 10 volte superiore all'anno scorso. Si stanno avviando iniziative, insieme con il Prof. Morgante, responsabile del WP sul sequenziamento, per l'applicazione di approcci di Genotyping by Sequencing (GBS) o di SNP genotyping mediante piattaforme high-throughput, che consentiranno di genotipizzare varietà e progenie da incrocio con diverse decine di migliaia di marcatori SNP. In questa prospettiva sarà possibile, in un arco di tempo ragionevolmente

compreso in alcuni mesi, applicare approcci di association mapping, per l'identificazione di marcatori associati a caratteri agronomici di grande rilevanza e costruire mappe genetiche ad altissima copertura che potranno contribuire all'allineamento delle sequenze del genoma.

### **Pubblicazioni / Eventi divulgativi / Eventi formativi**

#### *Riviste internazionali ISI*

- Alagna F., Mariotti R., Panara F., Urbani S., Veneziani G., Esposito S., Taticchi A., Rosati A., Rao R., Perrotta G., Servili M., Baldoni L. Phenolic compounds as secondary metabolites of olives: transcriptional and biochemical profiling along fruit development. *BMC Plant Biology* (submitted)
- 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)
- Cultrera N.G.M., Mariotti R., Baldoni L., Guerrero Ruiz C., Lucentini L., Ceccarelli M., Sarri V. Revealing different levels of variation within olive gene sequence. *PlosOne* (under submission)
- Mariotti R., Torkzaban B., Hosseini -Mazinani M., Cultrera N.G.M., Ataei S., Pandolfi S., Baldoni L. Genetic diversity and relationships of olives between Middle East and Mediterranean areas. *Mol. Breed* (under submission)
- Rossi S., Calabretta A., Tedeschi T., Sforza S., Arcioni S., Baldoni L., Corradini R., Marchelli R., 2012. Selective recognition of DNA from olive leaves and olive oil by PNA and modified-PNA microarrays. *Artif. DNA PNA & XNA* (accepted for publication)
- Rotondi A., Cultrera N.G.M., Mariotti R., Baldoni L., 2011. Genotyping and evaluation of local olive varieties of a climatically disfavoured region through molecular, morphological and oil quality parameters. *Scientia Hort.* 130:562-569.

#### *Presentazioni a congressi nazionali e internazionali*

- Alagna F., Mariotti R., Panara F., Calderini O., Esposito E., Servili M., Baldoni L., 2011. Identification of transcripts putatively involved in the synthesis of main secondary metabolites in olive fruits. IV Int. Conf. OLIVEBIOTEQ, 31 Ott – 4 Nov, Chania, Creta, Grecia.
- Cultrera N.G.M., Baldoni L., Mariotti R., 2011. Development of new molecular markers for olive oil DNA tracking. 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.

Bianco L., Baldoni L., Alagna F., Finnie C., Svensson B., Mazzuca S., Perrotta G., 2011. Proteomics of the ripening fruit in *Olea europaea*. 6th ItPA Ann. Nat. Conf. 21-24 Giugno, Torino.

*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.

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.

Baldoni L. Progetto OLEA. Variabilità dell'olivo: presupposti per il rilancio dell'olivicultura italiana. SOL, Verona, 9 Aprile 2011.

<b>Timbro Istituzione</b>	<b>Firma Responsabile Scientifico U.O.</b>