

## **RELAZIONE FINALE PIF PROGETTO INTEGRATO DI FILIERA COD.RL073.**

**SOGGETTO BENEFICIARIO: SOCIETA' AGRICOLA COLLI ETRUSCHI, BLERA (VT).**

**PROVVEDIMENTO DI CONCESSIONE N.28/124/09.**

**DAFNE – RESPONSABILE SCIENTIFICO PROF. LEONARDO VARVARO**

**Gruppo di lavoro: Prof.ssa Diana De Santis, Prof. Rosario Muleo, Prof. Francesco Rossini, Prof. Leonardo Varvaro, Dott. Valerio Cristofori, Dott.ssa Mariagrazia Antonelli.**

### **Indagini agronomiche e varietali**

Premessa

Il comprensorio olivicolo del viterbese ha conosciuto vicende in cui la diffusione della specie *Olea europaea* L. ha riguardato l'introduzione, più volte, di nuove cultivar, e l'espansione e diffusione di piante di genotipi autoctoni, da areali ristretti ad altri areali della Provincia. Tutto ciò ha determinato la presenza di un germoplasma olivicolo vario, la cui origine ed i mezzi di introduzione spesso non sono conosciuti. L'incremento degli scambi del materiale vegetale tra i paesi, che è avvenuto negli ultimi anni, impone, come importanza fondamentale, sia la corretta identificazione varietale sia la conoscenza della variabilità del germoplasma locale di ciascuna specie, che è, in molti casi, il perno portante della produzione di qualità. L'identificazione di cloni di *Elite* per caratteristiche morfologiche, fenologiche, produttive e di adattamento ai fattori ambientali abiotici e biotici è, pertanto, la base biologica ed agronomica su cui poggia la produzione di qualità. A tale riguardo basti pensare a ciò che è avvenuto nella vite, la cui ripresa produttiva e qualitativa ha visto nella ricerca di cloni di *Elite* una delle chiavi dello sviluppo della moderna viticoltura. Tutto questo assume, quindi, un peso rilevante soprattutto alla luce della recente introduzione nell'olivo nella filiera nazionale della certificazione genetica e sanitaria del materiale vivaistico.

La composizione varietale dell'olivo nel territorio della Provincia di Viterbo è molto ricca, analogamente a quanto accade a livello nazionale, anche se in alcune aree della stessa Provincia è prevalente una varietà, come quella di Canino che caratterizza il paesaggio e la produzione

agricola del territorio del comune omonimo e di quello dei comuni limitrofi. La ricchezza varietale è da attribuire sia alla longevità, che caratterizza questa specie, sia all'ampia variabilità ambientale e orografica dell'intero territorio provinciale. Le diverse varietà, tra cui la varietà Canino, si sono adattate ai diversi microambienti che caratterizzano il territorio provinciale, i quali hanno svolto il ruolo di pressori selettivi, pertanto risulta essere notevolmente informativo non solo la descrizione del germoplasma, ma anche la conoscenza, a livello bio-agronomico, della capacità plastica di ciascuna varietà ad adattarsi.

Anche se molti dei caratteri sono determinati a livello genetico, l'analisi del fenotipo delle piante permette non solo di riconoscere le singole varietà ma, anche quello, di identificare cloni con comportamento diverso da quello presente nella popolazione dei soggetti di una varietà. Gli studi di valutazione del frutto, del nocciolo, della foglia e dell'infiorescenza, unitamente a caratteri agronomici e fenologici, sono pertanto da guida nell'identificazione clonale, anche se la capacità discriminante di questi caratteri è tuttavia ridotta a causa della loro interazione con l'ambiente.

Il riconoscimento e la valutazione di diversi caratteri è affidata alla definizione di descrittori che riuniscono insieme tratti differenziali dell'albero tramite la scheda pomologica, che nel caso dell'olivo è detta: scheda elaiografica. Esistono però una notevole quantità di schede elaiografiche, diverse tra loro, che potrebbero introdurre elementi di confusione, pertanto, la scheda elaiografica impiegata nell'attività svolta in questo contesto è stata quella adottata da ISMEA per l'iscrizione delle varietà al Registro Nazionale Volontario delle piante di interesse agrario, tra cui l'olivo.

La scheda elaiografica considera i descrittori standard introdotti dall'UPOV (Union Internationale pour la Protection de l'Obtention Vegetale – <http://www.upov.int>), dal Consiglio Mondiale delle Varietà di Olivo (COI - [Http://www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)), e dalla Banca dati dell'Olivo (<http://www.oleadb.eu/>), e permette così di adoperare un linguaggio comune rendendo possibile la comparazione delle cultivar di olivo, tra una banca dati ed un'altra.

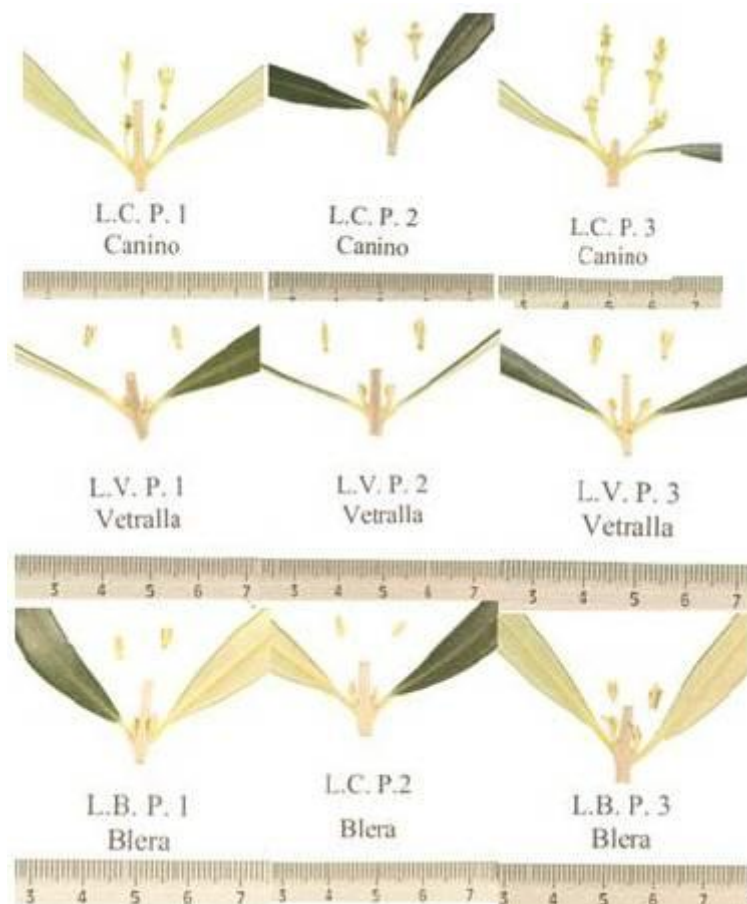
Le attività di rilievo e la determinazione dei caratteri condotte sulle piante segnalate ed identificate sono state svolte negli anni solari 2012, 2013 e primi mesi dell'anno 2014.

Lo sviluppo delle drupe nell'anno 2012 ha espresso delle diversità riconducibili sia alle località considerate nella prospezione territoriale, fatta al fine di verificare le diversità segnalate, sia alle piante stesse indicate dai soggetti segnalanti. Per semplificare l'analisi e per evidenziare le diversità tra gli ambienti, delle diverse località e tra i putativi ecotipi (cloni), è stata considerata una pianta del campo posto nel sito del comune di Blera, considerato nella stessa prospezione, come la pianta riferimento della varietà Canino. Questa pianta denominata "Canino *Ecotipo B1*" ha

i caratteri morfologici e fenologici della cultivar omonima, così come gli olivicoltori del territorio in esame, del resto, la identificano. Pertanto, la valutazione e la determinazione dei descrittori della scheda elaiografica sia per i caratteri sia per la fenologia sono riferiti a questa pianta, che da ora in poi nel testo seguente sarà riferita come la pianta referente *ECaB1*.

I descrittori considerati, sia quelli morfologici sia quelli fenologici, hanno risentito però dell'andamento climatico stagionale che è stato differente tra gli anni 2012, 2013 e inizio 2014. Le condizioni climatiche dell'anno 2012 hanno avuto un decorso regolare che hanno permesso alle piante di estrinsecare un adattamento plastico evidenziando la putativa diversità tra le piante anche nell'ambito dello stesso sito. E' da evidenziare subito che il sito dell'Azienda Agricola Cerrosughero, posta in località Musignano, del comune di Canino, pur essendo ad una latitudine (N42°26'36.5"; E 11°42'29.1") più settentrionale sia dell'azienda del sito di Blera (N 42° 15' 37,04"; E 12° 02' 27,45") sia di quella del sito di Vetralla (N 42°21'17.7"; E 12° 03' 50.2), ha una fenologia della fioritura e dell'allegagione anticipata che, in alcune annate, a secondo del decorso climatico, può avere un anticipo anche di 25-30 giorni. Nel 2012 lo sviluppo dei racemi fiorali è avvenuto, nel sito di Blera e di Vetralla, tra la terza e la quarta settimana di maggio, mentre nel sito di Canino è stata anticipata di circa 20 giorni. Nel 2013, in considerazione del protrarsi di basse temperature giornaliere fino alla prima decade di giugno, nel sito di Vetralla la fioritura è avvenuta intorno al 10 di giugno e nel sito di Blera intorno al 14 di giugno, mentre nel sito di Canino è avvenuta nella seconda decade di maggio.

Nella figura 1 sono presenti le foto indicanti lo stato dello sviluppo della panicola fiorale in rami fioriferi, osservato il primo di Aprile (2014) nel sito di Canino ed è possibile individuare lo sviluppo dell'infiorescenze, mentre nelle piante degli altri due siti, al 2 di aprile del 2014, ancora la fenologia della infiorescenza non era comparsa.



**Figura 1.** La campionatura dei rami e delle infiorescenze è stata effettuata il 1 di aprile per le piante del sito di Canino e il 2 di Aprile per le piante del sito di Vetralla e di Blera. All'ascelle delle foglie del nodo delle piante di Canino (L.C.P.n) è evidente che le infiorescenze hanno iniziato lo sviluppo e nella pianta L.C.P.3, in particolare, esso ha un forte anticipo, con la formazione di tre palchi fiorali. Le infiorescenze nelle piante di Vetralla (L.V.P.n) sono appena accennate, mentre lo sviluppo è completamente inattivo in quelle di Blera (L.B.P.n)

La diversa fenologia, molto probabilmente, è da attribuire alla posizione ed esposizione degli areali del sito di "Canino" che, diversamente, da quelli di Blera e Vetralla, sono esposti al mare, con esposizione sud-ovest, che influenza l'habitat locale e la sua vegetazione (Figura 2),



**Figura 2.** Panoramica dell'ambiente del sito di Canino (foto superiore), al cui orizzonte si intravede il mare, e dell'uliveto (foto inferiore), in cui sono presenti le piante oggetto di osservazione. L'uliveto ha sesti d'impianto con distanza di circa 10 x 10 metri, sia tra le file sia sulla fila, In alcuni casi le piante vetuste sono state sostituite da giovane piante, della stessa varietà Canino. Le branche hanno un'apertura molto ampia, come effetto della potatura praticata nella zona.

L'esposizione del terreno del sito di Blera è verso nord-est (figura 3), mentre quella del terreno del sito di Vetralla (figura 4) ha una esposizione ad ovest, ma la frapposizione di rilievi tra questo ultimo sito ed il mare non permette, eventualmente, la presenza di un clima più mite. Nei due siti pertanto sia l'esposizione sia il clima è diverso da quello di Canino e l'habitat ne risulta condizionato.



**Figura 3.** Panoramica del sito di Blera e dell'uliveto. La colorazione azzurra del cielo e l'ombra delle piante sul terreno indicano l'esposizione nord-est dello stesso. Le piante dell'uliveto hanno sesti d'impianto con una distanza di 10 metri sia sulla fila sia tra le file, In alcuni casi non si intravede una regolarità costante dovuta all'età vetusta delle piante. Queste ultime si presentano con un'impalcature delle branche molto basse, ed un'apertura molto ampia delle stesse, infine in alcuni casi è evidente la scomparsa del fusto principale e la formazione di una ceppaia (pianta a sinistra nella foto).



**Figura 4.** Panoramica del sito dell'uliveto di Vetralla, la colorazione bianca del cielo indica una presenza forte di UR nell'ambiente. Le piante hanno sesti d'impianto di 10 x 10 metri, sulla fila e tra le file, Anche se le piante sono presenti con regolarità l'età vetusta delle stesse ha determinato la scomparsa del fusto principale e la formazione di una ceppaia. Le branche a differenza delle piante del sito di Blera hanno angolo di inserzione stretto che le rendono assurgente.

Nel primo trimestre è stata sviluppata la scheda elaiografica, simile a quella impiegata da ISMEA, come già riportato, per la registrazione delle varietà autoctone. Nella scheda elaiografica (vedi allegati) sono presenti i caratteri morfologici che permettono un'efficiente identificazione e caratterizzazione dei genotipi di olivo e dei putativi cloni. Di seguito sono sintetizzati i caratteri ed i parametri impiegati nella costituzione della scheda elaiografica.

**I descrittori morfologici** considerati sono:

Caratteri dell'albero, nei suoi parametri considerati sono la **vigoria**, il **portamento** e la **densità della chioma**.

Caratteri della foglia, nei parametri della **forma**, la **lunghezza**, la **larghezza** e la **curvatura longitudinale della lamina** fogliare.

Caratteri dell'infiorescenza, nei parametri misurati sono la **lunghezza** ed il **numero di fiori/infiorescenza**.

Caratteri del frutto, nei parametri considerati sono il **peso**, la **forma**, la **simmetria**, la **posizione del diametro**.

Caratteri dell'endocarpo (nocciolo), nei suoi parametri del **peso**, la **forma**, la **simmetria**, la **posizione del diametro trasversale massimo**, la **superficie**, il **numero dei solchi fibrovascolari**, la forma della **base**, la forma dell'**apice**, la **terminazione dell'apice**.

I caratteri dell'albero sono stati rilevati in campo dei tre siti analizzati. Tutte le misurazioni effettuate sulle foglie, infiorescenze, drupe ed endocarpo sono state eseguite presso il laboratorio di Ecofisiologia molecolare delle piante arboree, (DAFNE), dove con la collaborazione del Signor Massimo Vollaro sono state fatte parte delle foto degli organi e delle piante in campo.

*Analisi dei caratteri delle foglie.*

I rilievi sulle foglie sono stati effettuati nel periodo invernale, su campioni di almeno 30-40 foglie adulte prelevate dalla zona mediana di almeno 8-10 rami dell'anno di branchette fruttifere scelti nella parte mediana della chioma tra i più rappresentativi della pianta. Nessuna differenza significativa è risultata tra le piante di ciascun sito e tra le piante dei tre siti. Nella scheda elaiografica di ciascuna pianta sono riportate le foto delle foglie di ciascuna pianta.

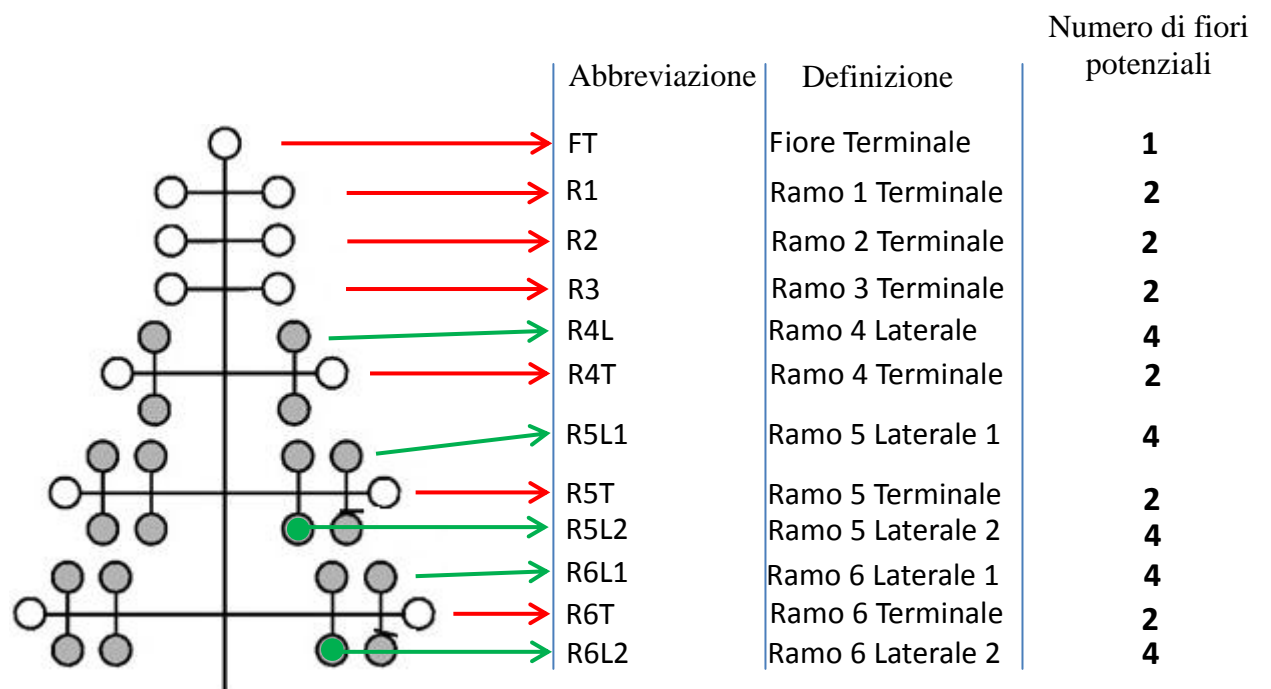
*Fenologia della fioritura, sviluppo dell' infiorescenza, allegazione (fruit set).*

Nei mesi di aprile e maggio, avviene il completamento dell'induzione della gemma fiorale e con le condizioni climatiche favorevoli si sviluppa la classica infiorescenza dell'olivo: la panicola (mignola). Come già detto in precedenza la fenologia della ripresa vegetativa e dello sviluppo fiorale, nel sito di Canino avviene in anticipo significativamente rispetto al decorso fenologico delle piante del sito di Blera e di Vetralla. Nell'ambito dei tre anni solari, 2012, 2013 e 2014, in cui sono state fatte le osservazioni è possibile sintetizzare quanto segue.

- a. Anticipo del decorso nel sito di Canino, nel quale la pianta 3 manifesta un ulteriore anticipo di 3 o 4 giorni, rispetto alle altre due piante dello stesso sito;
- b. non esistono sostanziali differenze temporali nel decorso fenologico dello ripresa vegetativa e sviluppo dell'infiorescenza tra le piante del sito di Vetralla e di Blera;

Analoghe attività sono state condotte per la determinazione dell'allegagione dei fiori e la valutazione del fruit set. I rami fioriferi e quelli fruttiferi sono stati campionati, 40 per ciascuna pianta, per ciascun orientamento della chioma, ad un'altezza media (1,60-1,80 metri da terra). Le infiorescenze comprese tra il quarto ed il sesto nodo, a partire dall'apice, sono state quelle campionate per la misurazione della panicola, per la conta del numero di palchi fiorali e dei fiori totali. La campionatura delle infiorescenze è avvenuta tra 16 di maggio e la prima decade di giugno a secondo dell'anno di campionatura. La campionatura dei rami fruttiferi, per determinare l'allegagione e il fruit set, è stata effettuata, a secondo dell'anno e del decorso fenologico, tra la metà di giugno la prima decade di luglio.

La valutazione dell'infiorescenza e la conta dei fiori è avvenuta secondo lo schema riassunto nella figura 5, la panicola è suddiviso in base alla sua ramificazione.



**Figura 5.** Schematizzazione della panicola dell'infiorescenza dell'olivo. L'infiorescenza si presenta come un'iterazione di un singolo fiore, nella parte terminale di ciascuna ramificazione, e di due fiori, secondo un ordine fillotassico, alla base del primo fiori. Pertanto i fiori sono suddivisi in terminali e laterali posti su ramificazioni di ordine n. Nell'ultima colonna della figura sono indicati i potenziali fiori per ciascun ordine di ramificazione e posizione del fiore.

I rilievi sulle infiorescenze (mignole/panicola) sono stati effettuati su almeno 30-40 campioni prelevati allo stadio di "boccioli bianchi" (completa mignolatura), dal tratto mediano di almeno 8-10 rami fruttiferi scelti tra quelli più rappresentativi nella parte mediana della chioma. La panicola media ha mostrato un'articolata ramificazione fino al ramo laterale R5L2, tuttavia la pianta 3 del sito di Vetralla ha mostrato una ramificazione piena solamente fino al quarto ramo e solamente in poche panicole è stata osservata la formazione del quinto ramo. Le piante 1 e 2 del sito di Canino,



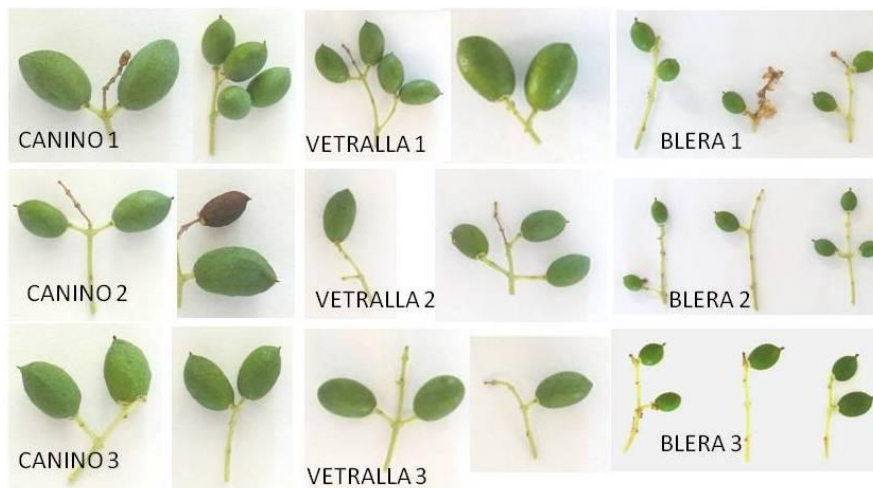
così come la pianta 3 del sito di Blera avevano molte panicole con una ramificazione del sesto ramo.

In tabella I, a mo' di esempio, sono riportati valori medi del *numero di fiori per infiorescenza*, la percentuale di allegazione delle mignole per i rami fioriferi campionati e il valore medio del *fruit set* relativi al 2013. I dati relativi al 2012, non si discostano da quelli del 2013, anche se alcune differenze esistono, ma nessuna regolarità è evidenziabile, poiché occorrerebbero rilievi in continuo per almeno 5 anni. L'analisi della varianza condotta per ciascun parametro è stata effettuata nell'ambito di ciascun sito, ed ha evidenziato una significatività statistica solo per il sito di Canino per il carattere *Numero medio di fiori per panicola*, Nessuna differenza significativa è risultata per il parametro *fruit set*.

**Tabella I.** Numero medio di fiori per ciascuna panicola ed eventi fenologici riguardanti l'allegazione ed il fruit set.

Sito	Pianta	Numero medio di fiori per infiorescenza	Percentuale di racemi allegati	Fruit Set
Blera	1	17,79±0,40	83,3	1,28±0,14
Blera	2	17,14±0,42	100	1,46±0,09
Blera	3	17,6±0,84	100	1,36±0,08
Vetralla	1	19,85±0,77	100	2,42±0,17
Vetralla	2	21,42±0,67	100	2,58±0,10
Vetralla	3	21,39±0,65	100	2,28±0,12
Canino	1	16,61±0,63	100	1,52±0,11
Canino	2	19,43±0,94	100	1,68±0,12
Canino	3	15,93±0,68	100	1,40±0,08

Nella figura 6 è mostrata una panoramica del carattere *fruit set* ossia dei fiori allegati e lo stato dello sviluppo del frutticino sulla panicola. Dalle foto è possibile dedurre anche la cascola dei fiori e l'atrofizzazione sia delle ramificazioni fiorali sia dei frutticini destinati a cadere. Le dimensioni dei frutticini sono comparabili solamente all'interno dello stesso sito di rilievo, poiché come già detto il decorso climatico ha impresso una diversa accelerazione dello sviluppo e della crescita della drupa tra le piante dei tre siti.



**Figura 6.** Panoramica del *fruit set* rilevato nei tre siti di indagine.

### *Frutto ed endocarpo*

I rilievi sono stati effettuati su campioni di 200 frutti prelevati, per la maggior parte dei caratteri rilevati, alla raccolta commerciale (in considerazione dell'organizzazione aziendale), dalla porzione intermedia di diversi rami fruttiferi, scelti tra quelli più rappresentativi nella porzione mediana della chioma. I rilievi sui noccioli (endocarpo con all'interno il seme) sono stati effettuati su campioni di 40 di essi, derivanti dalla rimozione della polpa dei frutti utilizzati per i rilievi carpologici. Come per i frutti, anche per alcune caratteristiche dei noccioli si fa riferimento a due posizioni, quella di massima asimmetria, che corrisponde alla parte in cui è visibile la sutura carpellare.

Indipendentemente dai siti e dalle piante i frutti hanno tutti un peso inferiore ai due grammi (tabella II). Esiste però una differenza tra i siti, infatti le drupe delle piante del sito di Vetralla hanno un peso inferiore alle drupe delle piante degli altri due siti (tabella II). Il peso maggiore delle drupe è stato registrato nelle piante del sito di Blera. Esiste anche una differenza tra le piante del sito di Vetralla, la quale è stata evidenziata maggiormente tra le piante del sito di Canino. Pur indicando la variabilità del peso tra la popolazione dei frutti di ciascuna pianta con la deviazione standard è possibile osservare come la pianta 1 del sito di Canino abbia il maggior peso rispetto alle altre due piante (tabella 2). Comunque una differenza marcata è stata osservata per il carattere *epoca di invaiatura* e per il carattere *forma del frutto*, come si evidenzia in tabella 2.

**Tabella II.** Valori quantitativi e qualitativi di caratteri del frutto e del seme che evidenziano la presenza di una differenza carpologica di questi caratteri tra le piante di uno stesso sito e tra i siti.

Pianta	Peso medio frutto (grammi)	Invasatura del frutto	Forma del frutto	Lunghezza seme (mm)	Larghezza seme (mm)
Canino 1	1,36±0,18	Precoce	Allungata	14,03±0,14	6,40±0,05
Canino 2	0,84±0,10	Precoce	Sferica	9,31±0,10	5,88±0,06
Canino 3	0,92±0,11	Tardiva	Ellittica	10,49±0,16	5,73±0,06
Blera 1	1,27±0,23	Media	Ellittica	11,48±0,14	6,15±0,04
Blera 2	1,31±0,24	Precoce	Ellittica	11,72±0,16	6,31±0,04
Blera 3	1,27±0,18	Precoce	Ellittica	11,15±0,11	6,23±0,05
Vetralla 1	0,67±0,10	Precoce	Sferica	7,53±0,10	5,12±0,04
Vetralla 2	0,90±0,16	Precoce	Sferica	9,51±0,11	5,96±0,06
Vetralla 3	0,86±0,18	precoce	Sferica	8,45±0,16	5,63±0,08

Il seme ha anch'esso una variabilità tra i siti, ed interessante appare la diversità delle dimensioni tra le piante dello stesso sito che confermano la differenza esistente tra le piante del sito di Canino e di Vetralla (tabella II). Le differenze delle dimensioni diametrali determinano anche un carattere diverso per la forma del seme, come è indicato per ciascuna pianta nella propria scheda elaiografica (vedi allegati).

### ***Propagazione agamica e valutazione del potenziale rizogeno delle piante***

Nel mese di febbraio del 2013, ossia nell'ottavo trimestre è stata svolta l'attività di propagazione delle piante dei siti e la valutazione della loro potenzialità di radicazione avventizia. Negli ultimi giorni dello stesso mese, il 25 e il 26, sono stati preparati due cassoni riscaldati con perlite al fine di alloggiare le talee per la radicazione dei rami campionati dalle piante di olivo (figura 7). I cassoni erano ubicati presso la serra di Coltivazione Arboree del DAFNE. Il giorno 27 è stato prelevato il materiale vegetale da ciascuna pianta dei tre siti; la mattina dello stesso giorno, nel sito di Canino, campionando rami di almeno un anno, della dimensione diametrale di almeno 5 mm, con portamento assurgente muniti di evidente gemme laterali (figura 7, 8 e 9). Il materiale vegetale di ciascuna pianta è stato inserito in un sacco di plastica che è stato contrassegnato con l'identificativo della pianta per evitare scambio di materiale tra le stesse. Nel pomeriggio dello stesso giorno, con le stesse modalità, sono stati campionati le piante dei siti di Blera e Vetralla.

La preparazione delle talee, di almeno 4/5 nodi, a cui erano lasciate solamente le due foglie apicali (figura 8) è stata fatta nella stessa giornata ed è proseguita sia il giorno successivo, il 28 di

febbraio, sia nel mattino del 1 di marzo. La parte basale delle talee, prima di essere messe a dimora nella perlite, è stata immersa in acqua per circa 2 minuti e poi sono stati immersi in talco contenente l'auxina IBA alla concentrazione di 1000 ppm.

Dai giorni di messi a dimora fino a tutto il periodo di permanenza nei cassoni di radicazione alle talee è stata nebulizzata manualmente l'acqua per evitare la disidratazione della perlite. La nebulizzazione è stata effettuata ogni 3/4 giorni, impegnando un'ora lavorativa.

La formazione delle radici avventizie, pur se di ridotte dimensioni, è stata evidente intorno al 15 di aprile. Il trasferimento in contenitori di plastica di 1/2 litro, contenente suolo agrario di medio impasto al 50%, perlite al 15% e terriccio al 35%, è stato effettuato il 21 di maggio. In settembre le piante sono state trasferite in un contenitore di plastica di 1 litro, che conteneva un terriccio della composizione indicata. Nella tabella III sono riportati i risultati ottenuti dall'attività di propagazione per talea. per la percentuale di radicazione.

**Tabella III.** Numero di talee, numero di talee radicate e percentuale di radicazione.

Luogo di origine	Pianta	Radicate	Non radicate	Totale	Percentuale di radicazione
Blera	1	10	116	126	7,9%
Blera	2	11	145	156	7,1%
Blera	3	Tutte morte			
Canino	1	29	101	130	22,3%
Canino	2	23	110	133	17,3%
Canino	3	21	117	138	15,2%
Vetralla	1	25	69	94	26,6%
Vetralla	2	29	95	124	23,4%
Vetralla	3	23	57	80	28,7%
Vetralla	4	41	74	115	35,6

La radicazione avventizia, tranne che per la pianta 3 del sito di Blera, è avvenuta in tutte le piante dei 3 siti. La percentuale di talee radicate nelle piante del sito di Blera, nel complesso, è stata ridotta, così come il numero di radici emesse (3-4) ed il loro sviluppo, in quanto sia per la pianta 1 sia per la pianta 2 il valore della percentuale di radicazione è stato inferiore al 10%. Una possibile spiegazione della ridotta radicazione avventizia delle piante del sito di Blera può essere dovuto al fatto che le talee dal materiale vegetale prelevato da ciascuna pianta siano state preparate per

ultime. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere dovuto ad una fenomeno di eccesso da acqua in uno dei due cassoni, come lascerebbe supporre la presenza di muffe nella parte basale di alcune talee. Pertanto, si è considerato importante che l'attività di radicazione sarebbe stata effettuata di nuovo nel febbraio del 2014.

Un discreto successo è stato ottenuto con le piante degli altri due siti, con una percentuale superiore al 18% per le piante di Canino e superiore al 25% per le piante del sito di Vetralla.



**Figura 7.** Ramo dell'anno campionato per la preparazione di marze per la radicazione per talea e per il prelievo di gemme per l'innesto.



**Figura 8.** Esempio di materiale vegetale prelevato dalle piante donatrici (sinistra) e preparazione delle talee per la radicazione (destra).

Nel mese di febbraio del 2014, ossia nell'ultimo trimestre è stata ripetuta l'attività di propagazione delle piante dei tre siti, unitamente alla valutazione della loro potenzialità di radicazione avventizia. E' stata effettuata la scelta di effettuare la radicazione avventizia delle talee e l'innesto delle gemme su portainnesto franco presso un vivaio, in considerazione dell'impossibilità di disporre dei cassoni impiegati nel 2013, per la rottura dell'impianto elettrico del riscaldamento

basale. Il prelievo del materiale vegetale dalle piante dei 3 siti ha riguardato rami di almeno un anno, della dimensione diametrale di almeno 5 mm, con portamento assurgente muniti di gemme laterali evidenti da impiegare per l'innesto (figura 9). Il materiale vegetale di ciascuna pianta è stata inserita in un sacco di plastica che è stato contrassegnato con l'identificativo della pianta per evitare scambio di materiale tra le stesse.



**Figura 9.** Esempio di ramo di un anno (foto a destra) impiegato per la costituzione di talee per l'autoradicazione. Nella foto a sinistra è mostrato un nodo con le due gemme laterali di sviluppo adeguato per essere innestate.

### **Considerazioni sui risultati ottenuti**

La valutazione dei caratteri dell'albero, quali: la vigoria e la densità della chioma sono caratteri influenzati in modo rilevante dalle condizioni ambientali e dalla tecnica colturale. La valutazione delle accessioni *in situ* potrebbe quindi indurre in errore di valutazione, poiché l'età della pianta, la fertilità del terreno, le condizioni climatiche e la tecnica colturale applicata, con particolare riferimento all'eventuale irrigazione, all'apporto di fertilizzanti, al turno ed intensità di potatura, agli esiti di attacchi parassitari, potrebbero condizionare fortemente l'accrescimento, la densità della chioma, eccetera. La propagazione agamica delle piante ed il loro insediamento in due ambienti diversi da quelli originali permetterà di effettuare una valutazione (valutazione *ex situ*) comparativa dei caratteri dell'albero, in quanto gli aspetti pedoclimatici e agronomici saranno uniformi.

L'accrescimento, le dimensioni ed il peso, dei frutti può essere influenzato in maniera importante dal carico produttivo delle piante, dall'andamento stagionale e dalla tecnica colturale adottata. Tuttavia, appare evidente la presenza di differenze nei caratteri del frutto (dimensione, forma, epoca di invaiatura) e del seme tra piante dello stesso sito, come è evidenziato dalle tabelle e dalla figure, e dai descrittori riportati nelle singole schede elaiografiche. produzione ordinario.

## Indagini fitopatologiche

### PREMESSA

L'attività svolta dal gruppo di Difesa delle Piante coordinato dal Prof. Leonardo Varvaro, ha riguardato le indagini sul grado di suscettibilità di alcuni cloni/ecotipi d'olivo, della varietà "Canino", al batterio fitopatogeno *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psav) agente causale della "rogna dell'olivo".

Lo studio è stato svolto nelle annate olearie del 2012 e 2013 con attività in campo (oliveti di Blera, Canino e Vetralla), in serra (Azienda Agraria D-S Nello Lupori, Università della Tuscia) ed in laboratorio (Laboratorio Sezione di Batteriologia, DAFNE Università della Tuscia).

In particolare, le attività sono state suddivise nelle seguenti fasi:

- Esplorazione e scelta dei siti e delle singole piante d'olivo oggetto di studio;
- Monitoraggio dello stato fitosanitario delle piante di olivo nelle aziende scelte nell'ambito del progetto;
- Prelievo di campioni vegetali per l'isolamento *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e saggi biochimici di identificazione e caratterizzazione del batterio.
- Prove di patogenicità dei ceppi di PSAV isolati da tubercoli, su piante d'olivo in vaso di 2 anni delle cv. "Frantoio" e "Canino".
- Verifica della suscettibilità a diversi ceppi del batterio *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* delle piante d'olivo nelle aziende scelte nell'ambito del progetto.
- Produzione di talee delle piante di olivo per la verifica della suscettibilità/tolleranza delle piante di olivo selezionate.
- Elaborazione dei dati.

### ATTIVITA' SVOLTE E RISULTATI

#### **Esplorazione della provincia di Viterbo, individuazione delle aziende olivicole d'interesse e scelta delle singole piante d'olivo oggetto di studio.**

In seguito all'esplorazione di oliveti della Provincia di Viterbo, sono state scelte tre aziende con olivi appartenenti alla cultivar "Canino", situate nei comuni di Vetralla, Blera e Canino. In ogni azienda sono state individuate tre piante che, per caratteristiche morfologiche e stato

fitosanitario, apparivano più interessanti. Di ogni pianta sono state rilevate le coordinate geografiche, di seguito riportate.

Sito di Blera: Pianta 1 (N 42° 15' 37,04"; E 12° 02' 27,45"); Pianta 2 (N 42° 15' 37,46"; E 12° 02' 27,71"); Pianta 3 (N 42° 15' 38,19"; E 12° 02' 27,07")

Sito di Canino: Pianta 1 (N42°26'36.5";E 11°42'29.1"); Pianta 2 (N 42° 26'38.1"; E 11° 42' 28.2"); Pianta 3 (N 42°26'39.0"; E 11°42'28.9")

Sito di Vetralla: Pianta 1 (N 42°21'17.7"; E 12° 03' 50.2"); Pianta 2 (N 42°21'17.4"; E 12°03'50.2"); Pianta 3 (N 42°21'17.4"; E 12°03'47.8").

### **Monitoraggio dello stato fitosanitario delle piante di olivo**

Il monitoraggio nei tre siti è stato effettuato da ottobre del 2011 ad ottobre del 2013. Durante ogni sopralluogo è stato valutato lo stato fitosanitario complessivo delle piante oggetto di studio. Per quanto riguarda il monitoraggio della presenza di sintomi (tubercoli) della "rogna" causata dal batterio Psav, è stata valutata sia la presenza di vecchi tubercoli sui rami principali che di tubercoli recenti sui rami di 1 e 2 anni. Sulla chioma di ogni pianta, sono stati individuati e contrassegnati 3 rami, sui quali veniva rilevata periodicamente la presenza di tubercoli di nuova formazione. I risultati rappresentano la sintesi di due anni di osservazioni.

#### Sito di Blera

Le piante del sito di Blera sono risultate poco colpite dalla "rogna dell'olivo".

Durante i rilievi non sono stati rinvenuti tubercoli sulle branche principali delle tre piante.

Sulle piante 1 e 3, è stata riscontrata la presenza di un numero esiguo di tubercoli di dimensioni ridotte ( $\leq 1$  cm di diametro).

Da sottolineare l'assenza di tubercoli nella pianta 2, nel corso dei sopralluoghi dei due anni di attività.

Inoltre, le piante del sito di Blera non sono risultate colpite da altre avversità biotiche.

#### Sito di Canino

Nel corso dei sopralluoghi effettuati nei due anni presso il sito di Canino, è stata riscontrata la presenza di tubercoli della "rogna" su tutte e tre le piante selezionate. In particolare, oltre a vecchi tubercoli di dimensioni di 4-5 cm sui rami principali, sono stati osservati tubercoli di dimensioni ridotte (da 1 cm fino a 2 cm) sui rametti.

Tuttavia la pianta 1, nel 2013 è risultata meno attaccata dal batterio Psav, infatti sono stati rilevati tubercoli in numero minore e di dimensioni più piccole (1 cm) rispetto alle piante 2 e 3.



Nel 2013 su tutte le piante del sito, è stato riscontrato un forte attacco da parte del fungo *Spilocaea oleagina* agente causale dell'occhio di pavone (cicloconio).

### Sito di Vetralla

Sulla sui rametti della pianta 1, è stato rilevato un numero esiguo di piccoli tubercoli di rogna e di dimensioni molto ridotte (1 cm). Non sono stati rilevati tubercoli sui rami principali.

Su questa pianta è stata osservata la presenza di fumaggine, cicloconio e cocciniglia (*Saissetia oleae*) solo nel 2012. Diverso è risultato invece lo stato fitosanitario delle piante 2 e 3 dove sono stati osservati tubercoli di grandi dimensioni (fino a 8 cm) (figura 10) nei rami principali e numerosi tubercoli più piccoli (2 cm) nei rametti; su queste piante non è stata riscontrata la presenza di cicloconio.



**Figura 10.** Tubercoli di "rogn" su rami della pianta 3 nel sito di Vetralla

### **Prelievo di campioni vegetali per l'isolamento *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e saggi biochimici di identificazione e caratterizzazione del batterio.**

Nel corso dei due anni, durante i sopralluoghi, da ogni sito, sono stati prelevati 3 rametti/pianta che presentavano tubercoli. I campioni vegetali sono stati posti in buste contrassegnate con il sito, il numero della pianta e sigillate.

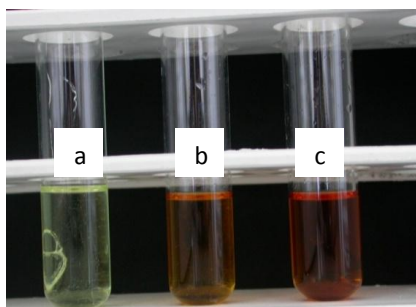


**Figura 11.** Rametto con tubercoli di rogna dell'olivo prelevati nel sito di Vetralla (2012).

Presso il laboratorio di Batteriologia Fitopatologica del DAFNE, è stato effettuato l'isolamento del batterio Psav dai tubercoli (figura 11) distaccando ogni singolo tubercolo tramite bisturi sterile e ponendolo per 1 min in alcool etilico al 96%. Subito dopo, in condizioni di sterilità, il tubercolo è stato lavato con acqua distillata sterile e la parte interna sminuzzata in 100 µl d'acqua distillata sterile. Il macerato ottenuto è stato piastrato su substrato agarizzato con il 5% di saccarosio e cicloesimide (ANS). Le piastre sono state poste ad incubare a 27±1 °C per 48- 72 ore.

Dopo l'osservazione della morfologia delle colonie allo stereo-microscopio, sono state individuate le colonie dalla tipica morfologia di Psav di cui è stata poi effettuata la purificazione per effettuare i saggi biochimici d'identificazione secondo le tecniche microbiologiche descritte da Schaad (1988) quali la solubilizzazione del KOH, la formazione di colonie di colore giallo su substrato YDC, ed all'analisi del profilo LOPAT secondo Lelliot e Stead (1987).

I batteri con profilo LOPAT tipico di Psav (- - - +) sono stati conservati in brodo nutritivo (15% di glicerolo) a -80 °C.



**Figura 12.** Saggio per la produzione di IAA; a) controllo negativo, b) controllo positivo, c) ceppo di Psav isolato da tubercoli prelevati a Vetralla (2012).

I ceppi di Psav, sono stati sottoposti al saggio per verificare la capacità di produrre acido indolacetico (IAA), un importante fattore di virulenza del batterio, a tal scopo è stato applicato il protocollo descritto da Varvaro e Surico (1987). Tutti i ceppi di Psav producevano IAA (figura 12), senza differenze significative.

Attualmente la collezione di Psav, creata in seguito agli isolamenti dal materiale vegetale prelevato nei tre siti durante i sopralluoghi dei due anni di attività di ricerca, è costituita da 200 ceppi di Psav ed è conservata presso il laboratorio di Batteriologia fitopatologica (DAFNE).

### **Prove di patogenicità dei ceppi di PSAV isolati da tubercoli su piante d'olivo delle cv. "Frantoio" e "Canino" di 2 anni allevate in vaso.**

Al fine di verificare l'eventuale differenza di grado di virulenza dei ceppi utilizzati e l'eventuale differenza di risposta al patogeno da parte delle piante (di 2 anni) appartenenti alle due cultivar

“Canino” e “Frantoio”, sono state effettuate delle infezioni artificiali sui rami, presso la serra del DAFNE nell’Azienda Agraria D-S dell’Università della Tuscia.

Dalla collezione di Psav sono stati selezionati 27 ceppi (9 ceppi di Psav per sito) ed inoculati sui rami (precedentemente segnati con cartellino) delle piante d’olivo delle due cultivar. Le infezioni artificiali sono state eseguite mediante tagli a linguetta; all’interno del taglio è stata posta un po’ di patina batterica di Psav (3 rami/ceppo). Dopo 60 gg. dall’infezione è stato rilevato il peso dei tubercoli e le popolazioni batteriche di Psav presenti nei tubercoli prelevati in corrispondenza dei punti d’infezione.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative né tra i differenti ceppi provenienti dai tre siti, né nella risposta al batterio da parte della piante appartenenti alle due cultivar “Canino” e “Frantoio”.

#### **Verifica della suscettibilità al batterio *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* delle piante d’olivo scelte nei siti di Blera, Canino e Vetralla.**

Per verificare la risposta delle piante selezionate nei tre siti al batterio Psav, sono state effettuate delle infezioni artificiali in campo.



Per ogni sito è stato scelto un ceppo tra quelli impiegati per le prove di patogenicità (paragrafo 4) proveniente dalle piante selezionate dello stesso oliveto; questa procedura si è resa necessaria per non diffondere negli oliveti ceppi di Psav potenzialmente più virulenti.

Su ogni pianta sono stati individuati e segnati 2 rami di 2 anni, sani senza tubercoli dovuti ad infezioni naturali; le inoculazioni sono state effettuate mediante l’inserimento di patina batterica all’interno di tagli a linguetta. Su ogni ramo sono stati eseguiti 5 tagli corrispondenti a 5 punti d’inoculazione.

La risposta delle piante alle infezioni artificiali è stata monitorata durante i sopralluoghi periodici negli oliveti.

Dopo 5 mesi dall’inoculazione artificiale, i rami sono stati prelevati e portati presso il laboratorio di Batteriologia fitopatologica del DAFNE, dove sono stati fotografati ed osservati per il rilievo del grado di sviluppo dei tubercoli che si sono formati in corrispondenza dei punti d’infezione. I singoli tubercoli sono stati suddivisi in base alla classe di appartenenza secondo lo schema riportato nella tabella IV.

**Tabella IV.** Tubercoli di rogna classificati secondo una scala con valori da 0 a 4.

CLASSE 0 Ferita guarita, assenza totale di tessuto di tubercolo	
CLASSE 1 Margini leggermente rigonfi intorno alla ferita	
CLASSE 2 Margini molto ingrossati intorno alla ferita	
CLASSE 3 Rigonfiamento su tutta la ferita	
CLASSE 4 Tubercolo	

La suddivisione dei tubercoli in classi ha permesso la determinazione dell' Indice di Malattia (I.M.) secondo la formula :

$$I.M. \% = \frac{\sum_{n=1}^k nk}{Z \times N} \times 100$$

k= numero totale del punteggio  
 n= numero di tubercoli della classe  
 Z= valore più alto della classe  
 N= numero totale dei tubercoli osservati

Successivamente i tubercoli sono stati pesati e, in condizioni di sterilità, sono stati macerati per la determinazione delle Unità Formati Colonia (UFC) per grammo di peso di tubercolo.

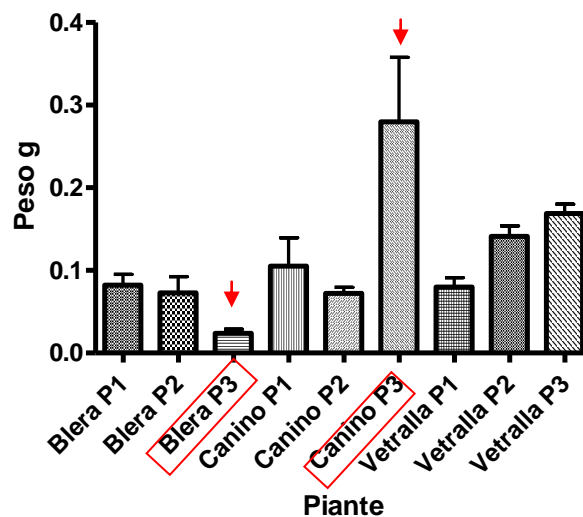
Gli Indici di Malattia rilevati per ogni pianta nei relativi siti, sono riportati in Tabella V.

**Tabella V.** Indici di Malattia relativi alle singole piante di olivo calcolati in seguito allo sviluppo di tubercoli dovuti ad infezioni artificiali.

Sito	Pianta	Indice di malattia %	Numero di infezioni
Blera	1	87	10
	2	77	10
	3	75	10
Canino	1	57	10
	2	80	10
	3	85	10
Vetralla	1	80	10
	2	100	10
	3	100	10

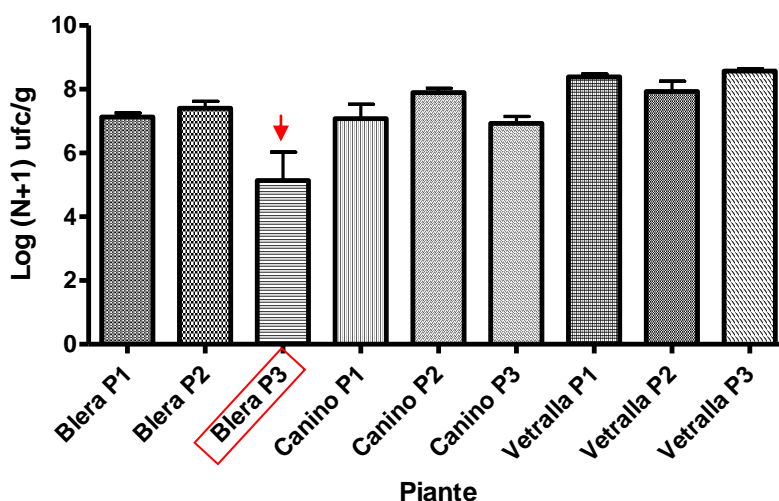
Le piante con un indice di malattia compreso tra 50 e 70% sono state classificate come “suscettibili/leggermente tolleranti” a Psav (in verde); le piante con un I.M. compreso tra 70 e 80% sono state considerate come “mediamente suscettibili” (in blu); le piante con un I.M. maggiore di 80 % sono state considerate “molto suscettibili” alla malattia (in rosso).

L’analisi dei pesi non ha evidenziato differenze significative tra i tubercoli prelevati dalle singole piante nei differenti siti, se non in due casi, sulla pianta 3 del sito di Blera si sono sviluppati tubercoli di peso significativamente inferiore (0.024 g) rispetto agli altri tubercoli delle stesso sito e dei siti di Canino e Vetralla. Nel sito di Canino, sulla pianta 3 si sono formati tubercoli con un peso medio di 0.28 g, significativamente maggiore rispetto ai pesi dei tubercoli delle altre piante di Canino e degli altri due siti (figura 13).



**Figura 13.** Peso (g) dei tubercoli sviluppatisi sulle piante selezionate di Blera, Canino e Vetralla in seguito ad infezioni artificiali con ceppi di *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

L’analisi delle popolazioni batteriche di Psav all’interno dei tubercoli, ha mostrato un dato molto interessante per quanto riguarda la pianta 3 di Blera dove è stato osservato un numero significativamente inferiore di cellule batteriche rispetto alle altre piante dello stesso sito e di Canino e Vetralla, come mostrato in figura 14.



**Figura 14.** Popolazioni di *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in tubercoli sviluppati in seguito ad infezioni artificiali.

### **Produzione di talee delle piante di olivo per la verifica della suscettibilità/tolleranza delle piante di olivo selezionate.**

Per verificare la risposta delle piante selezionate al batterio Psav, oltre alle prove di suscettibilità effettuate mediante inoculazioni artificiali in pieno campo, è ritenuta fondamentale la realizzazione di infezioni artificiali su piantine ottenute da talee prodotte a partire dalle piante selezionate nei siti di Blera, Canino e Vetralla. La prova in pieno campo, fornisce informazioni fondamentali sulla risposta delle singole piante al patogeno, ma i risultati sono condizionati anche dalle condizioni pedoclimatiche dell'oliveto. Le prove d'inoculazione con i medesimi ceppi utilizzati per le prove in campo saranno svolte in serra, in vaso mettendo le piantine, ottenute dalle talee, nelle medesime condizioni ambientali.

La produzione di talee di olivo è iniziata a fine gennaio 2013. Sono stati prelevati rami, senza sintomi di patologie quali cicloconio o rogna, da tutte le piante selezionate nei differenti siti e nell'arco di 24 h sono state prodotte un numero variabile di talee/pianta (da 80 a 150).

Le singole talee sono state immerse in una miscela di talco ed auxine e subito piantate in cassoni riscaldati. Nei mesi successivi, le talee sono state costantemente irrigate e controllate.

Nel mese di aprile, le talee radicate sono state trasferite in vasi contenenti terreno e perlite. Attualmente le talee sono allevate nella serra del DAFNE presso l'Azienda D-S dell'Università della Tuscia. Al momento sono disponibili le talee radicate di tutte le piante, tranne della pianta 3 del sito di Blera.

Le infezioni artificiali saranno effettuate non appena le piantine avranno raggiunto uno stadio vegetativo tale da poter effettuare i tagli a linguetta senza compromettere la vitalità delle

piantine. Al momento si ritiene che le piantine abbiano uno sviluppo ancora insufficiente per la realizzazione delle prove di suscettibilità.

Per l'ottenimento di materiale vegetale con cui effettuare le prove suscettibilità, nel mese di febbraio 2014, è stato effettuato un ulteriore prelievo di rami dalle piante dei tre siti. Questo materiale vegetale è stato portato presso un vivaio che provvederà a produrre talee radicate e a fare gli innesti delle gemme su portainnesto franco.

### **Elaborazione dei dati.**

I dati raccolti durante i rilievi in pieno campo e le attività di laboratorio sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) mediante l'utilizzo del programma di elaborazione dati e di analisi statistica GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### **Considerazioni sui risultati ottenuti**

La "rogna dell'olivo" è una batteriosi diffusa in tutti gli areali coltivati ad olivo. Forti attacchi possono compromettere la produzione di piantine in vivaio e portare ad un lento deperimento e quindi ad una diminuzione della produttività delle piante adulte in pieno campo. Sebbene raramente, anche le drupe possono essere colpite dalla batteriosi a livello della parte basale con conseguente arresto dello sviluppo, deformazioni, e riduzione delle qualità (sapore salato, acido, rancido).

Nel corso dei due anni di attività di ricerca, il batterio *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* è stato sempre isolato negli oliveti di Vetralla, Blera e Canino, siti scelti per la sperimentazione. I ceppi batterici isolati dai tubercoli prelevati dalle diverse piante non hanno comunque mostrato differenze per la produzione di acido indolacetico (IAA), uno dei fattori di virulenza del patogeno. Inoltre le prove di patogenicità effettuate con i ceppi di Psav su piante d'olivo delle cv. "Canino" e "Frantoio" di due anni, hanno fornito due importanti informazioni: i ceppi di Psav saggiati non differivano per quanto riguarda lo sviluppo di tubercoli e le due cultivar di olivo hanno mostrato una identica risposta al patogeno. Questi risultati indicano che le eventuali differenze nella risposta delle piante selezionate in campo dipendono prevalentemente dalle caratteristiche genetiche delle piante e dalle condizioni pedo-climatiche in cui le piante vivono.

Il monitoraggio effettuato nei siti di Blera, Canino e Vetralla, ha permesso di evidenziare alcune differenze nell'intensità della malattia nelle piante selezionate, dovute alle diverse condizioni ambientali degli oliveti (es. esposizione, temperature, frequenza di piogge e gelate), alla diversa

gestione agronomica degli oliveti (potature, concimazioni, trattamenti fitosanitari) e all'eventuale maggiore tolleranza di alcune piante al batterio fitopatogeno per fattori genetici.

In particolare, le piante del sito di Blera sono risultate scarsamente attaccate dalla "rogna", probabilmente grazie alle condizioni ambientali ed agli interventi agronomici, ed in particolare sulla pianta 2 è stata riscontrata la totale assenza di tubercoli. Le piante del sito di Canino, presentano tutte attacchi da parte del patogeno, avvenuti sia negli anni passati (tubercoli di grandi dimensioni su rami principali) che nei due anni di sperimentazione (tubercoli di 1-2 cm). Nel sito di Vetralla, le piante 2 e 3 presentano importanti attacchi da parte di Psav sia negli anni passati che nei due anni di monitoraggio. Una situazione differente è stata riscontrata sulla pianta 1 dove non ci sono tubercoli sui rami principali e scarsa è la presenza di tubercoli di piccole dimensioni.

Le inoculazioni artificiali effettuate nei siti hanno fornito importanti indicazioni sulle risposte delle singole piante al batterio fitopatogeno Psav.

Le piante 2 e 3 del sito di Blera, con un Indice di Malattia pari a 77% e 75% rispettivamente, sono state considerate "mediamente suscettibili" al batterio Psav. La pianta 3, inoltre, appare particolarmente interessante anche per il basso numero di cellule batteriche re-isolate dai tubercoli. Probabilmente, la pianta 3 attiva alcuni meccanismi di difesa che le permettono di ridurre la colonizzazione del tessuto vegetale da parte batterio Psav (basso peso dei tubercoli, basso numero di cellule batteriche). Le piante 2 e 3 del sito di Canino possono essere considerate "molto suscettibili" al batterio Psav, mentre la pianta 1, nonostante l'elevato numero di cellule batteriche ed il peso dei tubercoli, è risultata "suscettibile/leggermente tollerante" al patogeno (I.M. 57%). Nel sito di Vetralla la piante 2 e 3 sono risultate "molto suscettibili" a Psav (I.M. 100%), mentre la pianta 1, "mediamente suscettibile" (I.M. 80%), in linea anche con i monitoraggi effettuati in pieno campo.

Le prove d'inoculazione artificiale programmate sulle piantine ottenute da talee delle piante dei tre siti, forniranno importanti indicazioni soprattutto sulla risposta della pianta 1 del sito di Vetralla, sulla pianta 1 del sito di Canino, che hanno manifestato le risposte più interessanti al patogeno *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, sia per quanto riguarda le infezioni naturali che artificiali. Per avere indicazioni sulla risposta al patogeno della pianta 3 di Blera, sarà invece necessario attendere la radicazione delle talee prodotte nel 2014. Le prove d'infezione artificiale effettuate in ambiente controllato, permetteranno di ottenere risultati sulla componente genetico-fisiologica della risposta delle singole piante al patogeno, escludendo così la componente ambientale.



# Indagini sulla qualità degli oli

## Premessa

La presente relazione riporta l'attività svolta dal gruppo di Tecnologie Alimentari coordinato dalla prof.ssa Diana De Santis presso il dipartimento DIBAF, nell'ambito delle campagne olearie 2012 e 2013.

### *Sintesi dell'attività svolta*

Al fine di verificare la qualità degli oli oggetto del presente studio, il primo periodo è stato dedicato alla messa a punto delle procedure di analisi da adottare. Sono stati così condotti test di tipo gas-cromatografico per valutare la scelta della tecnica di estrazione più idonea alla valutazione della qualità dell'olio, testando tre fibre SPME (PDMS, PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS) per l'estrazione dei composti volatili presenti nello spazio di testa ed eseguendo analisi su miscele standard per valutare la miglior risposta.

Parallelamente alla messa a punto dei test di tipo chimico-analitico, sono stati organizzati e programmati i test sensoriali sugli oli extravergine di oliva.

Secondo la normativa ISO 8586-1/2 sono stati reclutati e selezionati un gruppo di 12 assaggiatori con i quali avviare la fase di addestramento prevista dal progetto per la costituzione di un panel di tecnici esperti assaggiatori olio, inoltre è stata intrapresa un'attività di addestramento di 10 nuovi tecnici esperti assaggiatori olio di oliva.

L'addestramento e la selezione sono state eseguite nel rispetto della normativa COI/T Doc.No 14/Rev.4, che regola tali attività. Il corso di addestramento ha previsto 40 ore di didattica ed esercitazione diretta su campioni di olio e su standard di riferimento.

Alla fine del periodo di formazione gli aspiranti assaggiatori hanno affrontato una prova selettiva di riconoscimento dei quattro principali difetti ed eseguito test di ordinamento (allineamento) per le intensità.

L'intero gruppo addestrato è stato utilizzato per i test su oli del commercio e su soluzioni con difetti standard inviati dal COI, opportunamente diluiti, per i test di riconoscimento, di allineamento e per la verifica delle soglie, utili al monitoraggio del livello di apprendimento ed all'armonizzazione dei giudici del panel in vista delle sedute di assaggio sui campioni.

### **Materiali e metodi**

Gli oli sono stati estratti con un sistema da banco, cercando di uniformare la procedura adottata

per tutti i campioni. Le olive sono state triturate con un mixer a lame di acciaio (Sterilmixer-PBI) al fine di ottenere una pasta, rimescolata successivamente a lenta velocità di rotazione per circa 15' e sottoposta ad estrazione centrifuga (15000 rpm).

Gli oli estratti sono stati conservati in bottiglia scura a temperatura di circa 15°C fino al momento delle analisi.

Lo screening analitico prevedeva la determinazione di: acidità, numero di perossidi, polifenoli totali, gascromatografia dello spazio di testa con SPME e analisi sensoriale.

Per tutte le determinazioni chimiche sono state adottate le metodiche ufficiali di analisi per gli oli (Reg.CEE n.2568/91. Gazz.Uff. CEE n. 248/91), i test sensoriali sono stati condotti secondo la normativa COI/T.20/Doc.No15/Rev.6e COI/T./Doc.No.22 ed infine per i test gas-cromatografici è stata adottata la procedura sotto riportata.

L'estrazione-concentrazione dei componenti presenti nello spazio di testa degli oli è stata condotta su 1,5g di olio raccolto in una micro-beuta da 25mL, chiusa con tappo a vite e guarnizione in silicone perforabile, alla temperatura di 25°C, in agitazione magnetica costante alla velocità di 140 giri/minuto per circa 20', preceduto da 5' di equilibrio nelle medesime condizioni.

Per l'estrazione è stata scelta una fibra di DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzene/Carboxen/Polidimetisilossano) da 50/30µm della Supelco Sigma-Aldrich Co.

In seguito all'estrazione i composti sono stati iniettati per desorbimento termico direttamente nel GC.

Il gascromatografo utilizzato per l'analisi è stato il Trace GC Ultra della Thermo Fisher Scientific USA munito di colonnaZB-Wax da 60 m, 0,25 mm I.D. e 0,25µm di film thickness della Phenomenex USA, di rivelatore FID termostato a 250°C ed Elio (He) iperpuro come carrier, al flusso di 1,3 ml/min.

Le condizioni operative adottate per l'analisi sono state le seguenti:

35°C per 10', incremento di 3,5°C/min fino a 80°C, incremento di 2,5°C/min fino a 108°C, mantenuti per 4', incremento a 2,5°C/min fino a 160°C, incremento di 6°C/min fino a 250°C .

## **Significato di alcune analisi chimiche**

### ***Acidità***

Questo parametro è utilizzato per la classificazione merceologica dell'olio e quantifica il fenomeno di idrolisi dei trigliceridi misurando la presenza di acidi grassi liberi.

L'acidità degli oli si crea nel momento in cui avviene la rottura dei tessuti della drupa, fenomeno grazie al quale i trigliceridi e gli enzimi (lipasi) vengono in contatto. La reazione tra enzimi e

trigliceridi da origine agli acidi grassi liberi, tra questi il più abbondante è l'acido oleico.

In caso di olive sane l'acidità si crea durante l'operazione unitaria di frangitura, in caso di olive in uno stato sanitario non ottimale si forma anche prima che l'oliva sia sottoposta a trasformazione. Per questo motivo lavorare olive con l'epitelio lacerato (anche in seguito ad attacco di insetti) può dare origine ad oli con valori elevati di acidità.

Durante il periodo di conservabilità, per oli filtrati, il valore dell'acidità non aumenta significativamente.

### ***Numero di perossidi***

Questo parametro è utilizzato per la classificazione merceologica dell'olio e quantifica il fenomeno di autossidazione radicalica a carico degli acidi grassi insaturi, liberi e combinati.

I perossidi si creano quando l'olio, contenuto nella drupa, viene a contatto con l'ossigeno dell'aria e prosegue durante il processo di estrazione, tale valore è maggiore quando l'estrazione dell'olio dalle olive avviene in condizioni di stress ossidativo. Inoltre, tale valore aumenta significativamente durante il periodo di conservazione con una velocità del fenomeno che è funzione delle condizioni ambientali: oli conservati alla luce, a temperature superiori a 18°C ed in presenza di ossigeno avranno un numero di perossidi maggiore rispetto ad oli conservati in bottiglie piene, al buio ed ad una temperatura compresa tra 14°C e 18°C.

### ***Sostanze antiossidanti: composti fenolici e tocoferoli***

Il contenuto di composti fenolici e tocoferoli rappresenta il patrimonio antiossidante degli oli. La presenza di composti antiossidanti permette di definire un livello di qualità del prodotto superiore a quello relativo alla classificazione merceologica.

Il contenuto di tali composti dipende da vari fattori:

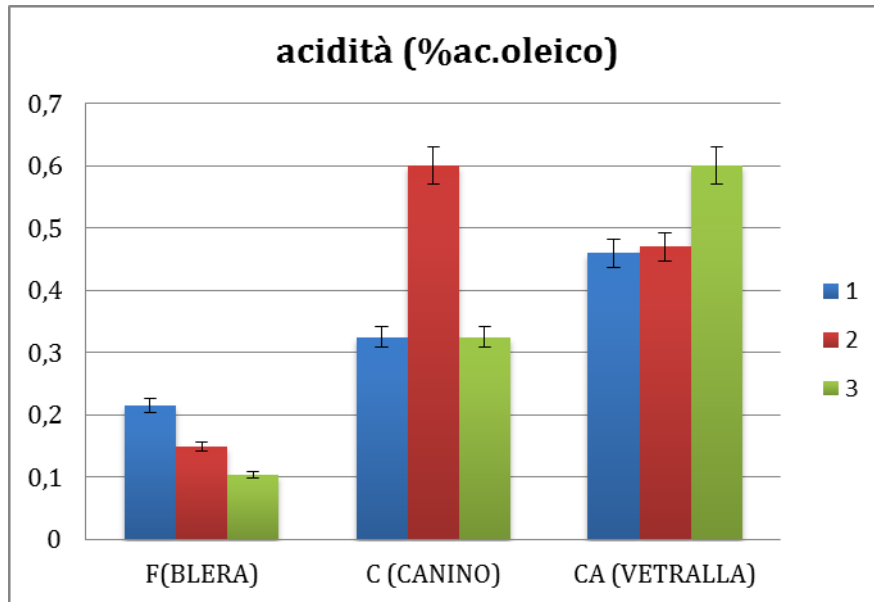
- dalla tipologia di olive: cultivar, stato sanitario, grado di maturazione tecnologica, condizioni ambientali di coltivazione;
- dalle condizioni operative del processo di estrazione: tempo, temperatura ed esposizione all'ossigeno.

Olive raccolte con un elevato contenuto fenolico possono dare origine ad oli ricchi di composti antiossidanti se lavorate in condizioni di ridotto stress ossidativo e senza l'aggiunta di acqua nel processo. Inoltre, il valore dei composti antiossidanti diminuisce durante il periodo di conservabilità di un olio a causa di fenomeni enzimatici, chimici ed idrolitici che avvengono con maggiore velocità per gli oli conservati alla luce, a temperature superiori a 18°C ed in presenza di

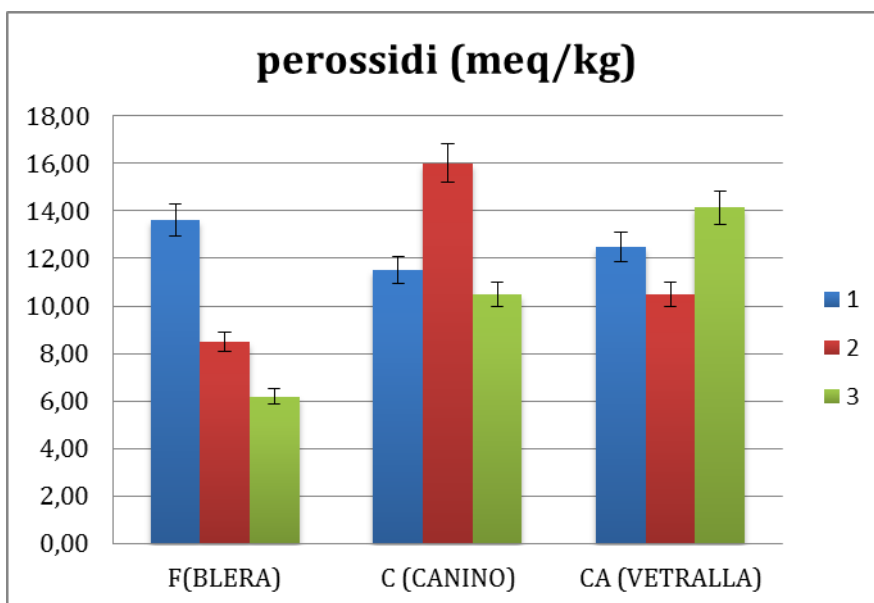
ossigeno.

## Risultati

In relazione al valore di acidità si osserva che i valori medi riportati nel grafico esibiscono una certa differenza tra i campioni delle tre tesi, gli oli di Blera(F) sembrano presentare valori decisamente inferiori degli oli delle altre provenienze.

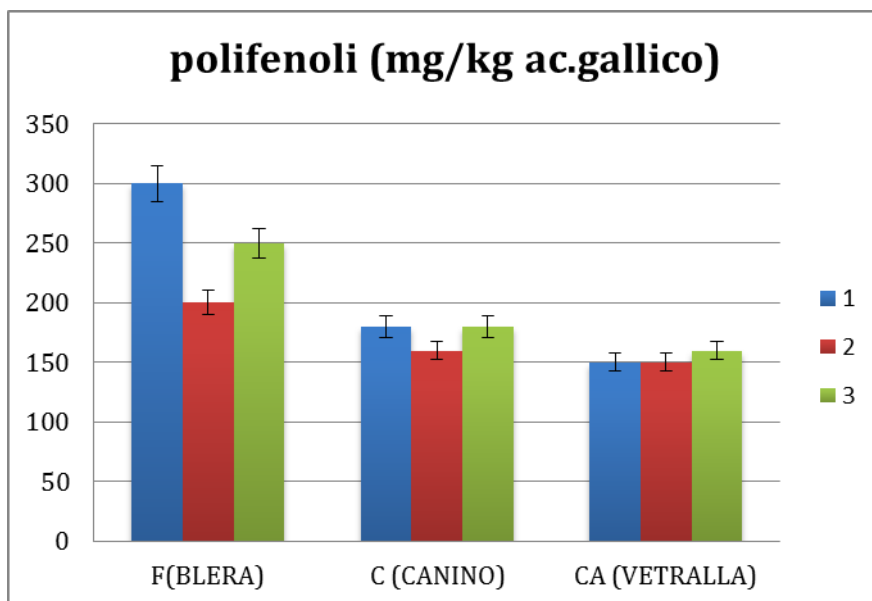


Il valore del numero di perossidi si mantiene sempre al disotto dei valori limite, pur presentando una certa eterogeneità. I valori mediamente più bassi si riscontrano nella tesi di Blera (F), pur con una certa disomogeneità.



La tesi di Blera, presentando il valore più elevato in sostanze fenoliche, lascia supporre, in virtù di

quanto riscontrato con i precedenti test, che le olive possano avere un corredo polifenolico più consistente e probabilmente più adeguatamente preservato da migliori condizioni ambientali che potrebbero aver imposto un inferiore stress ossidativo rispetto agli altri campioni.



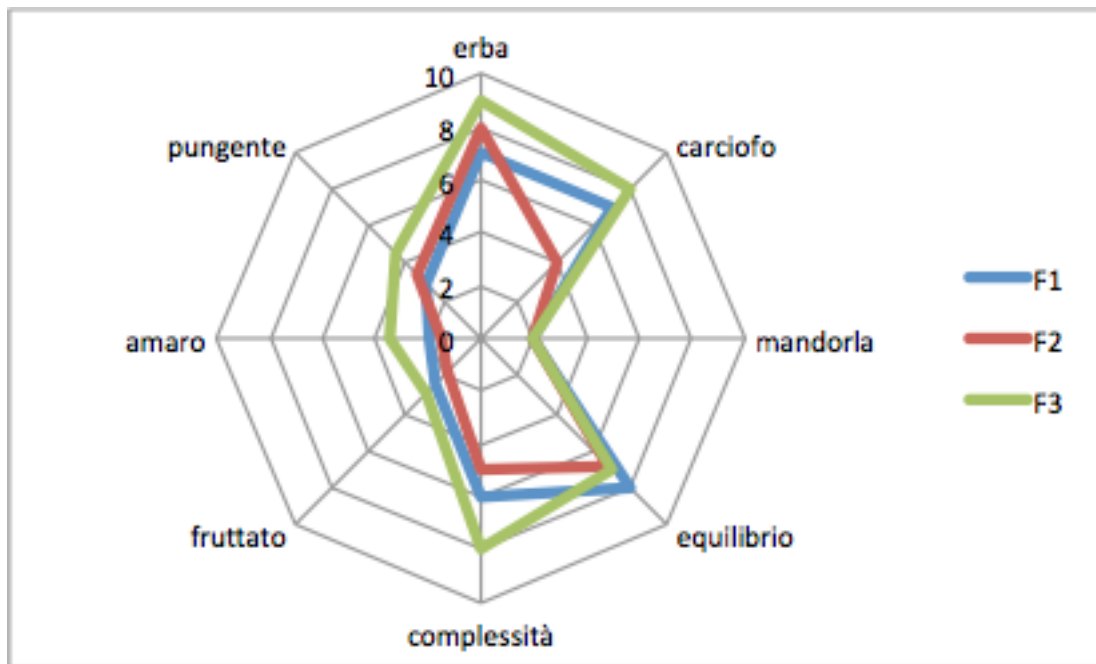
### ***Analisi sensoriale***

La valutazione sensoriale degli oli estratti ha ben evidenziato le differenze dei profili caratterizzanti tra le tesi sperimentali.

#### **Attributi positivi**

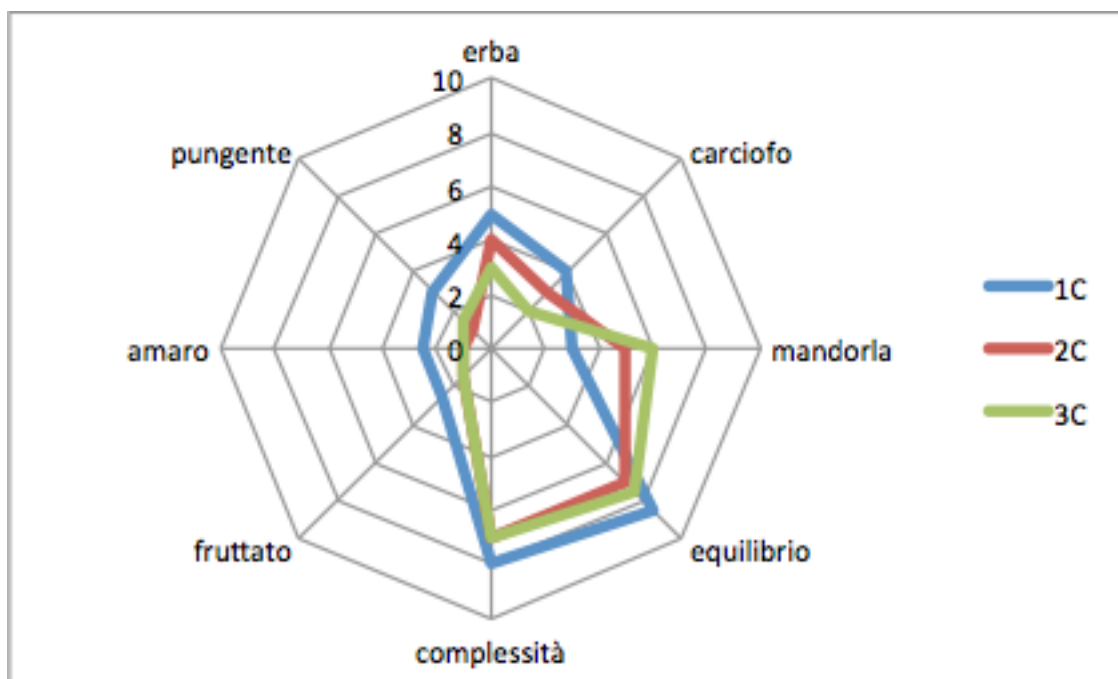
Gli oli ottenuti dalle olive provenienti da Blera (F), presentano uno spiccato sentore erbaceo, rafforzato da un intenso aroma vegetale di carciofo, lieve è la nota aromatica di mandorla per tutti i campioni.

Poco uniformi i campioni si presentano relativamente all'intensità degli attributi principali come per il pungente che varia da 3 a 4,5 +/- 0,25, l'amaro da 3,5 a 0,9 +/- 0,15 e poco meno per il fruttato da 1,78 a 3,0 +/- 0,20. La nota qualitativa del fruttato è decisamente "verde".



Spiccatamente diverso si presenta il profilo sensoriale dei campioni provenienti da Canino (C) per i quali il descrittore comune sembra essere la mandorla, anche se a concentrazioni sensibilmente diverse. L'intensità del fruttato è decisamente bassa e varia da 1,08 a 2,48 +/- 0,17, il pungente è molto eterogeneo, evolvendo da una nota appena accennata (0,94+/-0,2) a valori abbastanza intensi (3,03+/-0,3).

La nota amara riflette l'andamento precedentemente osservato per il pungente e va da 0,96 +/- 0,17 a 2,48+/-0,16. Il carattere del descrittore fruttato è *verde* per il campione C1 e *matturo* per C2 e C3.

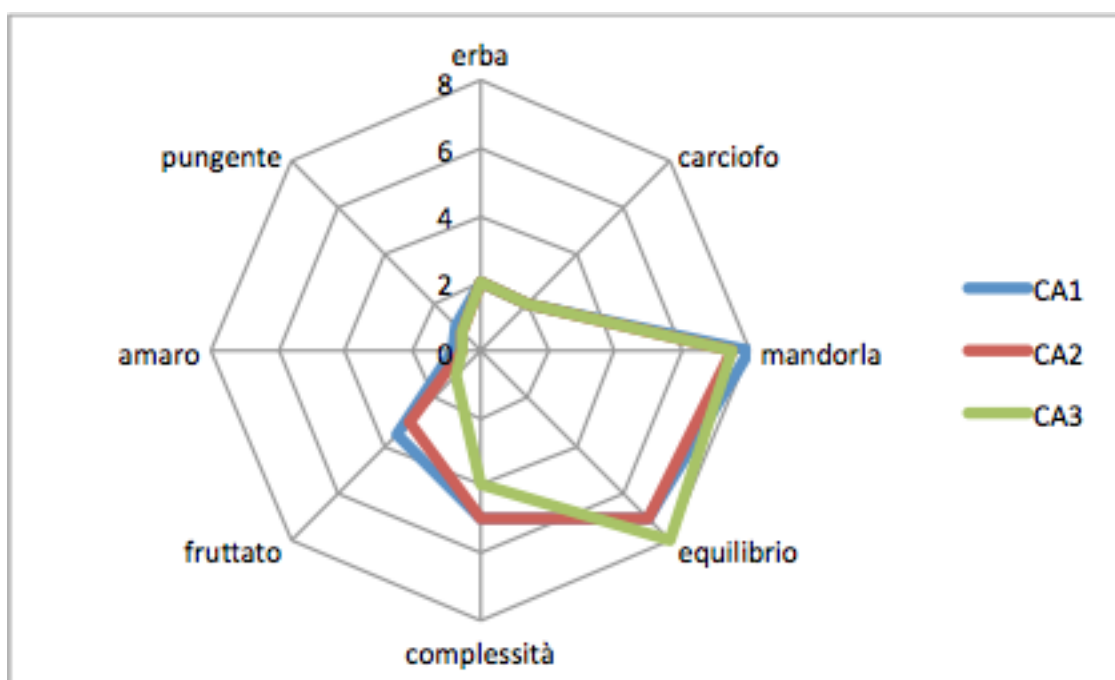


L'olio ottenuto dagli oliveti siti in Vetralla (CA) è dotato di grande equilibrio con una nota fruttata

di oliva decisamente matura in tutti i campioni.

Il descrittore sensoriale più intenso sembra essere la mandorla con un leggerissimo e appena accennato sentore vegetale di erba e carciofo.

Il fruttato varia in intensità da 1,08 +/- 0,16 a 3,49 +/- 0,24, la nota pungente è estremamente lieve, da 0,81 +/- 0,16 a 1,01 +/- 0,18, e l'amaro è appena percettibile presentando valori da 0,55 +/- 0,1 a 0,77 +/- 0,16.

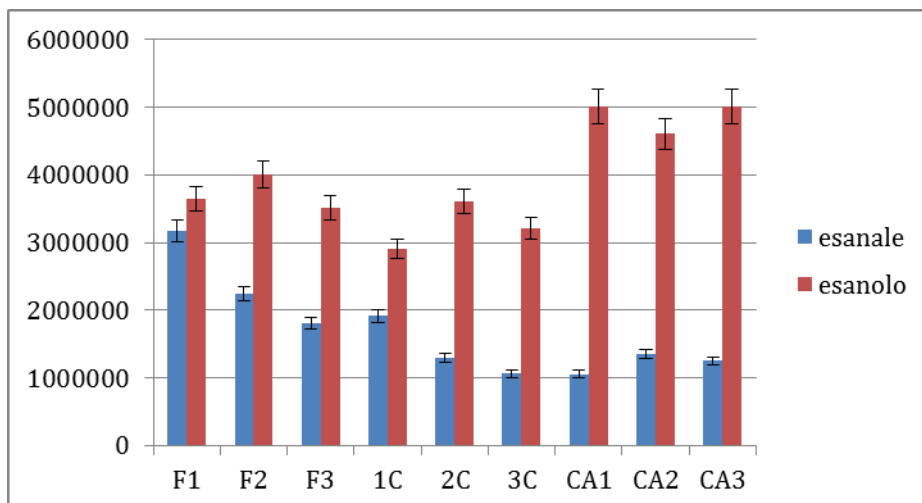


### ***Profilo gascromatografico dei composti volatili dello spazio di testa.***

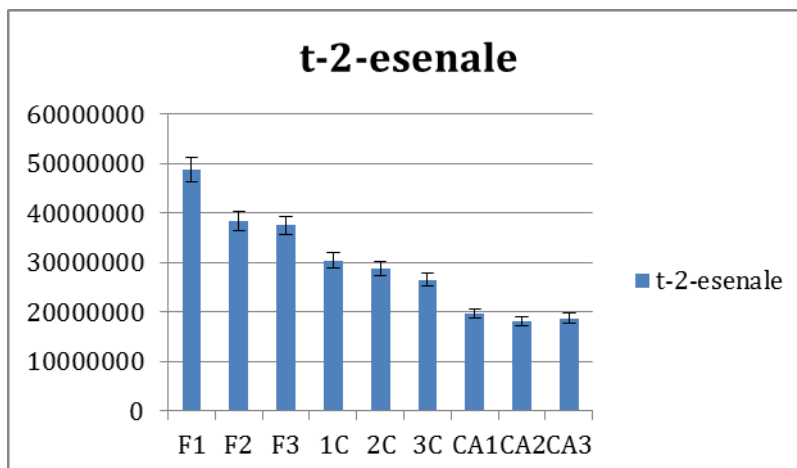
Gli oli analizzati hanno esibito una composizione chimica dello spazio di testa, rilevata gascromatograficamente, abbastanza diversificata, ben correlata ai profili sensoriali ottenuti dal panel.

I componenti tipici dell'aroma degli oli extravergini, derivati dalle trasformazioni a carico degli acidi linoleico e linolenico (*via della LOX*), sono quantitativamente i più rappresentati in tutte le tesi.

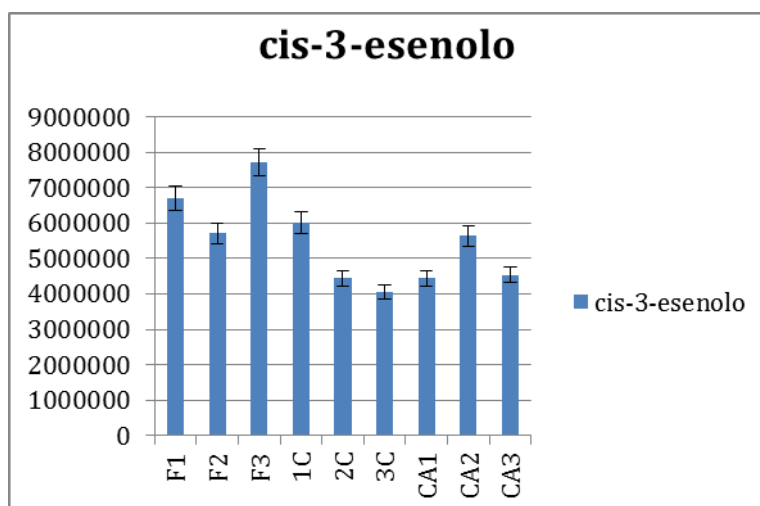
I composti derivati dall'acido linoleico attraverso la via biosintetica della lipossigenasi sono principalmente l'esanale e l'esano, quest'ultimo dalla letteratura sembra ben correlato alla tipologia qualitativa del "fruttato". Negli oli testati infatti, il valore di tale composto dello spazio di testa è maggiore nei campioni caratterizzati da una nota prevalente di fruttato maturo (CA).



Altri composti caratteristici sono quelli provenienti dalla via biosintetica *LOX* dell'acido linolenico che in misura diversa risultano per lo più correlati sempre alla tipologia aromatica del fruttato, negli oli esenti da difetti.

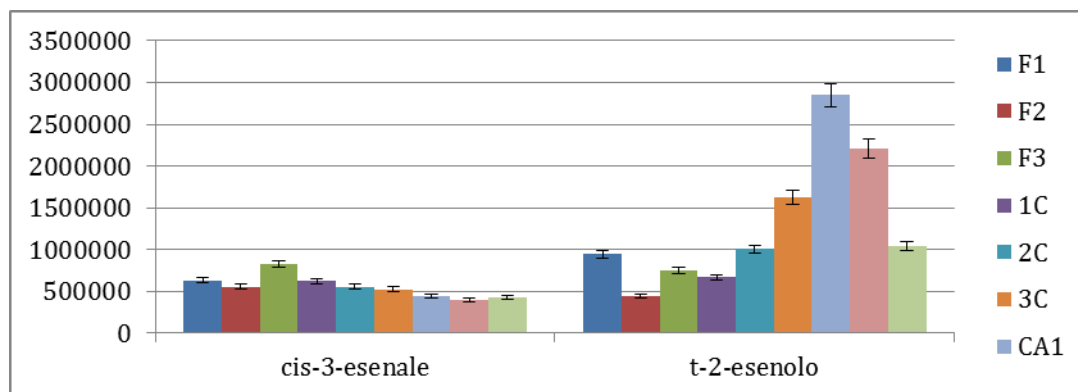


Gli esiti delle nostre determinazioni mettono in evidenza una buona correlazione con i valori di *t-2-esenale*, per la nota verde e *t-2-esenolo*, per la nota matura.





Meno significativa la relazione con gli altri composti chimici della stessa via biosintetica (*cis-esenolo* e *cis-3-esenale*).



## Conclusioni

In conclusione a quanto riportato, è possibile affermare che, gli oli ottenuti rispettivamente nelle zone Blera (F), Canino (C) e Vetralla (CA) non si presentano con caratteristiche chimiche e sensoriali uniformi.

I dati confermano due trend di diversa natura che tendono a contribuire a tale differenziazione: uno probabilmente giustificato dall'ambiente di provenienza che ha esaltato l'influenza pedoclimatica sull'olio estratto da olive coltivate in zone diverse, infatti oli di diverse provenienze mostravano caratteri profondamente diversi rispetto a quelli provenienti da altre aree.

L'altro elemento di discriminazione è probabilmente dovuto alla variabilità genetica e naturale tra piante coltivate nello stesso ambiente.

I nostri dati, relativi soprattutto al profilo sensoriale, elemento fortemente caratterizzante per l'olio e, in maniera minore, ai principali parametri chimici, evidenziano come le tesi siano fortemente diversificate tra loro, pur mantenendo costanti sia il processo di estrazione che le condizioni di stoccaggio e di analisi.

## **REALIZZAZIONE DEGLI IMPIANTI**

Presso l'Azienda Didattico Sperimentale dell'Università degli Studi della Tuscia nell'estate-autunno 2013 è stata preparata una superficie idonea per la piantagione delle nuove linee di olivo caratterizzate e moltiplicate nel progetto.

La preparazione ha previsto:

- l'apporto di sostanza organica;
- lo scasso;
- lavorazioni preparatorie superficiali;
- la predisposizione per l'impianto di irrigazione.

Appena pronte le piante verranno messe a dimora e allevate per valutarne le performance produttive sia in termini di quantità che di qualità dell'olio.