



Le biotecnologie a supporto del breeding convenzionale

La ricerca punta a produrre varietà resistenti e di buona adattabilità. Sfruttando il germoplasma di piante secolari si realizzano incroci e dalla loro discendenza vengono selezionati i caratteri di maggiore interesse, come la tolleranza al freddo

DI ANTONIO RICCI

La proliferazione di progetti di ricerca in olivicoltura e in elaiotecnica, non sempre viene supportata da programmi concordati tra la comunità scientifica e gli operatori del settore (olivicoltori e frantoiani), con il risultato che purtroppo si verifica una dispersione di risorse intellettive e finanziarie che l'Italia non può permettersi.

La rivoluzione avvenuta negli ultimi decenni anche nella ricerca olivicola ha avuto come artefice principale il miglioramento genetico, anche se finora si è guardato troppo al passato con uno spirito conservatore, spesso dovuto a falsi problemi di etica, che di fatto ha rallentato la comunità scientifica nel ricercare tecniche più avanzate.

L'obiettivo di migliorare la redditività della coltivazione dell'olivo può essere raggiun-

to se si fa ricorso alle biotecnologie non solo tradizionali, utilizzate da secoli per produrre alimenti, ma anche a quelle moderne, basate sulle tecniche del Dna ricombinante.

Le biotecnologie possono contribuire in maniera determinante come supporto ai programmi di miglioramento genetico convenzionale, al risanamento dai patogeni interni alle cellule, ad aumentare la resa estrattiva dell'olio, alla caratterizzazione varietale e allo smaltimento e all'impiego delle acque di vegetazione dei frantoi.

Obiettivi di vitale importanza per il nostro settore olivicolo-oleicolo che vede impegnati istituti di ricerca, università e anche aziende private, ma soprattutto il Centro di ricerca per l'olivicoltura e per l'industria olearia, C10 (Cra-Oli) che è uno dei 15



▲ Germoplasma Cra-Oli, sede di città Sant'Angelo (Pe).

Centri di ricerca del consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura (Cra), ente pubblico di ricerca e sperimentazione con competenza scientifica generale nel settore agricolo, agroindustriale, ittico e forestale, posto sotto la vigilanza del Mipaaf.

Il Centro si articola in due sedi scientifiche, a Rende (Cs) e Pescara, e in una sede distaccata a Spoleto (Pg).

«Un centro di ricerca – fa presente il direttore **Enzo Perri** – che sin dalla sua costituzione ha svolto, e continua a svolgere, un'attività interd-

L'attività del Cra-Oli

Il Cra-Oli si dedica alla biologia, alla genetica, al miglioramento genetico e alla selezione varietale dell'olivo, alla identificazione e caratterizzazione di geni utili e allo sviluppo di metodologie biomolecolari di supporto al miglioramento genetico.

Studia le tecniche di coltivazione e di difesa della specie con particolare riferimento alle tecniche di produzione integrata e biologica.

Sviluppa attività di ricerca relative alla raccolta, conservazione e relativa chimica del frutto, sia per la trasformazione in olio che per il consumo fresco. Si occupa della caratterizzazione delle cultivar locali e delle relative produzioni in un'ottica di valorizzazione del binomio territorio-prodotto. Sviluppa le attività scientifiche relative all'elaiotecnica, alle tecniche per la conservazione dell'olio e per la tracciabilità delle produzioni. Studia i problemi legati allo smaltimento, utilizzazione e valorizzazione dei prodotti secondari dell'industria olearia.

Il Centro dispone di competenze scientifiche interdisciplinari annoverando ricercatori con lauree in Chimica, Scienze agrarie, Scienze biologiche e tecnici diplomati con notevole esperienza delle problematiche della filiera olivicolo-olearia. Infine, molti, tra i ricercatori e i tecnici del Cra-Oli sono anche assaggiatori professionisti di oli vergini di oliva, iscritti all'albo nazionale degli assaggiatori e capi panel esperti nella valutazione sensoriale degli oli.

Nei campi collezione del germoplasma olivicolo del Centro presso Rende, Mirto Crosia (Cs), Spoleto (Pg) e Città S. Angelo (Pe), sono presenti oltre 600 varietà di olivo e numerosi cloni selezionati nel corso degli anni in varie regioni italiane.

In passato, il Centro ha condotto ricerche finalizzate soprattutto alla selezione varietale e clonale dell'olivo ed al miglioramento genetico mediante mutagenesi ed incrocio.

Recentemente, a causa di una scarsa disponibilità di fondi per ricerche "ordinarie", il Centro si è impegnato in alcuni progetti di ricerca straordinari, relativi alla genomica dell'olivo (progetto Genomica e miglioramento genetico dell'olivo, Olea), alla biodiversità dell'olivo (Esplorazione della biodiversità vegetale e animale alla ricerca di alleli superiori da inserire nei programmi avanzati di miglioramento genetico a sostegno dell'agricoltura nazionale, Esplora), e alla conservazione e studio del germoplasma olivicolo in collezione (progetti Trattato internazionale Fao per le risorse genetiche vegetali per l'alimentazione e l'agricoltura, Progetto Rgv-Fao).

■ A.C.

sciplinare d'indubbio interesse scientifico che ha coinvolto, mediante progetti finalizzati, docenti, ricercatori e tecnici, il cui contributo ha consentito anche di trasferire in campo le pratiche agronomiche e elaiotecniche frutto della ricerca» (vedi box sopra).

Produttività e adattabilità

Entrando più dettagliatamente in alcuni campi di ricerca condotti dal Cra-Oli, abbiamo interpellato **Samanta Zelasco**, ricercatore e responsabile del laboratorio di miglioramento

genetico e genomica dell'olivo.

L'attività scientifica tende verso il raggiungimento di due principali obiettivi: l'innalzamento della produttività e lo studio dell'adattabilità dell'olivo ad ambienti marginali attraverso approcci di genetica classica e molecolare.

La variabilità genetica dell'olivo rappresenta una ricchezza immensa sia in termini di selezione varietale, sia come base genetica per nuovi programmi di breeding, ma è una risorsa che va studiata e gestita per massimizzare i ri-

sultati del miglioramento.

Fino a oggi sappiamo molto poco riguardo al comportamento genetico delle varietà. Lo stato delle conoscenze sulla genetica della specie è infatti molto più arretrato rispetto a quello delle altre colture arboree da frutto.

«Il miglioramento genetico dell'olivo è una grande sfida – fa presente Zelasco – per una serie di ragioni. Innanzitutto esiste confusione in relazione al panorama varietale sia per la presenza di numerosi sinonimi e denominazioni locali delle varietà, sia, talora, per la mancanza totale di conoscenza o incertezza relativa all'identità genetica della cultivar, come può anche accadere in impianti più tradizionali e antichi. Lo studio dell'espressione d'importanti caratteri agronomici in olivo è spesso confinato soltanto a un particolare areale o talora subordinato a osservazioni empiriche. Tutto questo non consente di valutare oggettivamente le reali potenzialità di adattabilità ai diversi contesti ambientali delle cultivar. Il semenzale di olivo, poi, impiega molti anni prima di andare a fiore, pertanto la valutazione della progenie per caratteri legati alla pro-

duktività richiede tempi molto lunghi, e se non si conoscono le performance dei parentali in modo oggettivo, si rischia di non ottenere i risultati previsti».

Correlazione dei caratteri

Inoltre, vi è ancora poca conoscenza sulla correlazione dei caratteri. «Un altro aspetto che rallenta il miglioramento genetico dell'olivo – afferma Zelasco – è legato all'attuale mancanza d'informazione genomica».

Il riconoscimento delle cultivar viene tuttora effettuato con marcatori micro satelliti che, pur essendo altamente discriminanti, quelli isolati in olivo sono piuttosto ridotti come numero, e per lo più presentano caratteristiche che rendono difficile l'assegnazione degli alleli, complicando l'identificazione varietale.

La conoscenza della sequenza genomica è necessaria non solo perché porterebbe alla produzione di un numero maggiore e di diverse tipologie di marcatori utili all'identificazione, ma anche allo sviluppo di marcatori funzionali, ovvero marcatori cui può essere associata parte dell'espres-



▲ Campi collezione del Cra-Oli in Città S. Angelo (Pe).

sione di un dato carattere e che potrebbero essere utilizzati per la selezione precoce assistita, accelerando e ottimizzando i tempi e i costi del *breeding* in olivo.

Sviluppo di tool molecolari

I progetti in atto (finanziati dal Mipaaf) riguardano essenzialmente due grandi filoni: l'individuazione di materiali genetici di pregio e sviluppo di tool molecolari idonei a programmi di breeding assistito.

Per quanto riguarda il primo aspetto, spiega Zelasco, il laboratorio seleziona cultivar e/o parentali di pregio studianone le caratteristiche agronomiche e il loro comportamento nei differenti ambienti, analizzando sia i dati reperiti in letteratura, sia studiando direttamente in campo e/o in condizioni controllate caratteri quali la capacità di radicazione, la vigoria, l'architettura vegetativa, la precocità d'ingresso in fioritura, la biologia e fenologia fiorale, l'alternanza di produzione, la resa produttiva, il contenuto in olio e la sua qualità, la tolleranza agli stress biotici e abiotici.

«Riteniamo – sottolinea Zelasco – che la collaborazione con enti pubblici e privati sia di fondamentale importanza per il raggiungimento concreto dei nostri obiettivi. Lo studio della biodiversità e il breeding in olivo richiedono un enorme impegno toccando ambiti disciplinari complementari, oltre a richiedere spazi, infrastrutture, strumentazione, risorse umane e costi piuttosto elevati. Si ritiene pertanto che sia necessario uno sforzo comune orientato a obiettivi ben chiari e definiti, attraverso la creazione di un vero e proprio *network* di ricercatori, sperimentatori e privati, oltre alla necessità di fi-



▲ Campi collezione del Cra-Oli di Mirto Crosia (Cs).

nanziamenti dedicati e continuativi».

Il laboratorio del Cra-Oli collabora con il Cnr-Ivalsa di Firenze e con il Cnr-Igv di Perugia nella gestione e aggiornamento del database oleadb (responsabile Giorgio Bartolini), strumento utilissimo per l'acquisizione d'informazioni sulle cultivar di olivo e per la loro identificazione genetica.

Un altro strumento fondamentale, fa presente Zelasco, per l'acquisizione d'informazioni sul comportamento genetico delle cultivar è il campo collezione: «In Italia ce ne sono molti (il più grande è proprio del Cra-Oli a Mirto Crosia, Cs), ma troviamo confusione e difficoltà nella gestione *ex situ* delle risorse genetiche per varie ragioni.

Il riordino di alcune collezioni di riferimento nazionale come riserva e fonti di studio della biodiversità (banche e germoplasma), permetterebbe un enorme passo avanti nella caratterizzazione delle cultivar. Da queste collezioni si potrebbe attingere materiale di propagazione uniforme, caratterizzato secondo parametri e protocolli comuni e testarlo attraverso la sperimentazione agronomica (ancora molto ne-

cessaria) in differenti areali. Questo potrebbe essere la chiave di volta verso la possibilità di fare ordine nell'immenso patrimonio varietale italiano e verso una selezione varietale/scelta dei parentali più oggettiva e razionale».

Il laboratorio, inoltre, collabora con il Cra-Gpg di Fiorenzuola d'Arda con il quale è coinvolto nel progetto Olea (miglioramento genetico e genomica dell'olivo), mettendo a punto dei sistemi di *screening* rapido per la valutazione e selezione di cultivar alla tolleranza a *Verticillium dahliae* (anche in collegamento con la sezione di difesa del Cra-Oli e con l'Università di Bari) e al freddo (in collegamento anche con l'Università di Parma, la Fondazione Fojanini della provincia di Sondrio e alcuni privati).

«Di particolare rilevanza per l'aspetto adattativo è il germoplasma secolare o plurisecolare che stiamo raccogliendo in diverse regioni, identificandolo e caratterizzandolo per caratteri quali la tolleranza al freddo».

Il laboratorio esegue incroci controllati scegliendo parentali le cui caratteristiche siano state sufficientemente stu-

diate e testate possibilmente in diversi ambienti, o almeno su scala regionale. È attualmente in atto un programma di incroci tra varietà locali della regione Calabria.

Il laboratorio collabora anche l'Usda-ars-national clonal germplasm repository, Davis (California) per la caratterizzazione genetica e lo studio delle varietà del campo collezione americano.

Si prevede di scambiare materiale genetico interessante da inserire nel campo collezione di Cra-Oli di Mirto Crosia (Cs).

Per quanto riguarda lo sviluppo di tool molecolari, il laboratorio del Cra-Oli, in collaborazione con l'istituto de la Grasa di Siviglia (Spagna) e il Cra-Fru di Roma, isola e caratterizza geni chiave coinvolti nella biosintesi dei lipidi, ricerca sulla sequenza genica mutazioni responsabili della differente composizione acidica nelle cultivar (marcatori funzionali) e sviluppa dalla sequenza nucleotidica nota, nuovi marcatori utili all'identificazione genetica.

In collaborazione con il Cra-Gpg di Fiorenzuola individua, attraverso avanzatissime tecniche genomiche (*next generation sequencing*), i geni responsabili dei meccanismi di tolleranza agli stress biotici (*V. dahliae*) e abiotici (freddo).

Miglioramento genetico

L'attività di ricerca viene svolta anche dalle Università, fra le quali quella della Tuscia, dove i **Edo Rugini** e **Rosario Muleo**, del dipartimento Dafne, hanno messo a punto tecniche molecolari e biotecnologiche, oltre che agronomiche di base e applicative, atte ad accelerare le tecniche di miglioramento genetico, per produrre nuovi genotipi adatti a

un'olivicoltura moderna che in Italia stenta ad affermarsi per ragioni indipendenti dalla scienza.

«Oggi il miglioramento genetico – sottolineano Rugini e Muleo – non può prescindere dalle nuove tecnologie che sono indispensabili per accelerare quelle classiche e per migliorare le varietà tradizionali di olivo tramite il loro impiego diretto».

Riguardo a quest'ultimo punto, già possiamo segnalare il successo ottenuto con la cv Canino in cui erano stati inseriti geni capaci di renderla più tollerante a malattie fungine, al freddo e meno vigorosa, ma distrutte per una precisa volontà politica, la stessa che non vuole accettare non solo il miglioramento delle varietà tradizionali, perché andrebbe a inficiare la tipicità, ma soprattutto qualsiasi cambiamento nei sistemi di coltivazione a discapito degli agricoltori italiani.

Nonostante questa posizione che certamente offende e penalizza la scienza e in particolare la ricerca sull'olivo, Rugini e Muleo continuano la loro attività in vari campi della ricerca.

Le tecniche di micropropagazione, impiegate nella propagazione di microtalea, sono molto efficaci nella produzione di piante con struttura scheletrica della chioma più uniforme e più adatta alla raccolta meccanica dei frutti e, per alcune cultivar, per la loro scarsa attitudine di radicazione avventizia, anche più economica rispetto alla tecnica della talea e dell'innesto su semenzale; se impiegate nella germinazione *in vitro* sono imprescindibili per accelerare la produzione degli ibridi rispetto alla germinazione tradizionale.

Vengono condotti studi anche sulle tecniche di rigenerazione di piante da cellule, im-



▲ Collezione mirto crosia.

piegate per la rigenerazione di germogli e embriogenesi somatica, che sono indispensabili per l'attuazione di programmi di miglioramento genetico biotecnologici come: variabilità soma clonale, trans e cis-genosi, ibridazione somatica, produzione di aploidi via androgenesi, ginogenesi e con impollinazione controllata, e rigenerazione da tessuti mutagenizzati per evitare il chimerismo.

Incroci intervarietali

Inoltre, sono stati effettuati vari tipi di incroci intervarietali per produrre nuove varietà di media-ridotta vigoria, con una maggiore resa e olio di elevata qualità sfruttando la variabilità all'interno della specie e la mutagenesi indotta (produzione di mutanti autofertili e interfertili, varietà 4n autofertili e con frutto più grande e selezione di ibridi ottenuti tra Leccino e Bianca di Tirana per tolleranza alla mosca olearia).

Incroci interspecifici e intervarietali dai quali si sono ottenuti nuovi portinnesti per ridurre la vigoria di molte cultivar di élite, tramite incroci intervarietali e la selezione di

tetraploidi, come nel caso del Leccino e del Frantoio, il cui materiale è stato isolato con tecniche biotecnologiche (4n) e (3n), oltre ad altre tecniche (Leccino); a mo' di esempio della riduzione della vigoria del nesto si menziona quella della cv Canino, già in avanzato stato di sperimentazione con buon successo; incroci tra mutanti diploidi, LD e LM₁₋₅, della cv auto-sterile Leccino, capaci già di ridurre la vigoria del nesto, ma che sono risultati interfertili tra loro e con la pianta madre, effettuati per esplorare e sfruttare l'ibriding sia in questa cultivar che nel Frantoio (FRM₁₋₄); incroci interspecifici con *Olea Cuspidata* per trasferire nei discendenti la capacità di adattamento a suoli con altissimo contenuto in scheletro (lavori di svolgimento in Nepal).

«L'olivo, pur essendo una specie a forte diffusione in tutta l'area del mediterraneo – fanno presente Rugini e Muleo – è paradossalmente la specie che dal punto di vista genetico e molecolare è la meno studiata, pertanto per reperire le conoscenze rapidamente è stato concepito un progetto di analisi del genoma innovativo: il progetto Olea; infatti al di se-

quenziamento del genoma sono associati studi della trascrittomico, della proteomica e della metabolomica, oltre che la costituzione di una libreria fenotipica della specie al fine di associare a un determinante genico la sua funzione per la comprensione delle capacità adattative delle piante».

La direzione nazionale è stata affidata al dipartimento Dafne della Tuscia nella figura di Rosario Muleo, il quale direttamente si occupa in particolare di:

- individuazione isolamento del complesso genico regolante il cambiamento di fase e l'induzione florale;
 - identificazione geni coinvolti nella auto-incompatibilità;
 - miglioramento genetico tramite incroci per analizzare i fattori genetici e epigenetici riguardanti lo sviluppo ovario, l'aborto e la dimensione del frutto. Incroci effettuati Canino autofecondato, Canino x Leucocarpa;
 - geni di regolazione del metaboloma (MYB e geni MYC), e analisi di mutanti nulli per la sintesi di polifenoli (Leucocarpa);
 - analisi del mirna regolanti lo sviluppo della pianta, e dei mirna potenzialmente attivi nella regolazione di geni umani;
 - individuazione di marcatori morfologici-molecolari per la selezione precoce di piante derivate da incroci e/o da selezione clonale;
 - impiego di genotipi per lo studio dell'architettura della chioma e della sindrome di fuga dall'ombra attiva nelle piante che sono soggette a vivere in comunità più o meno dense.
- Un'attività di elevata scienza genetica e genomica che merita senz'altro un'adeguata disponibilità di risorse finanziarie senza che interferenze a volte populiste e oscurantiste ostacolino la loro prosecuzione. ■