

ARSIAL e CNR-IBBR

Progetto

“RECUPERO E VALORIZZAZIONE DI VARIETA’ LOCALI DI OLIVO DEL LAZIO”

La competitività economica delle aziende olivicole tradizionali è bassa e i margini di guadagno si basano esclusivamente sulla possibilità di ottenere prodotti di alta qualità commercializzati a prezzi elevati. La strategia di impiego di varietà a larga diffusione o internazionali, largamente impiegate per la realizzazione di impianti intensivi e super intensivi, se da un lato consentono l'introduzione di tecnologie che riducono i tempi di lavoro, dall'altro mal si adattano a condizioni ambientali difficili di molti territori regionali, e producono oli di massa di scarso valore commerciale.

Il progetto prende le mosse dal presupposto che il tassello fondamentale per ottemperare alle esigenze di una moderna olivicoltura in termini di sostenibilità ambientale e qualità delle produzioni, è rappresentato dalla valorizzazione delle risorse genetiche locali.

Per queste ragioni l'Azienda Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura del Lazio (ARSIAL) in stretta collaborazione con il CNR Istituto di Bioscienze e Biorisorse (CNR-IBBR) hanno intrapreso una collaborazione dal 2010 per salvaguardare la diversità olivicola del Lazio. Questa collaborazione ha offerto nuove opportunità di sviluppo e di tutela dell'agro-eco-sistema per il settore olivicolo-oleario, favorito la possibilità di realizzare nuovi impianti olivicoli più sostenibili dal punto di vista ambientale ed economico, più tolleranti alle avversità climatiche e alle emergenze fitopatologiche, più idonei a fronteggiare i cambiamenti climatici, in grado di valorizzare le caratteristiche qualitative regionali dell'olio.

Il presente progetto, partendo dall'esperienza pregressa si farà carico di esplorare, caratterizzare, selezionare e diffondere in coltura varietà locali, che manifestano un ottimo adattamento alle condizioni pedo-climatiche e paesaggistiche dei diversi territori del Lazio.

Verranno individuate cultivar in grado di garantire standard qualitativi elevati a fronte di una sostanziale riduzione degli input energetici necessari alla coltivazione ed un significativo legame al territorio di origine.

Il progetto rappresenta l'occasione per l'esplorazione delle ricchissime risorse genetiche autoctone, per l'individuazione, la valutazione e la diffusione di varietà locali del Lazio.

La prospezione dettagliata del germoplasma locale laziale e la caratterizzazione molecolare di oltre 350 genotipi (incluse repliche clonali), consentirà di verificare che, oltre alle varietà di maggiore diffusione nelle principali aree di produzione, ne esistono moltissime altre, rappresentate da pochi esemplari o alberi unici, spesso insediati in ambienti estremi per altitudine, esposizione, povertà del terreno o altre limitazioni.

Tali varietà, sopravvissute da un'antica olivicoltura oggi scomparsa, rappresentano una risorsa mai esplorata prima e che riveste un enorme serbatoio di caratteri utili per un nuovo modello di olivicoltura del Lazio, in primis perché sono certamente portatrici dei caratteri di adattamento e di tolleranza. Tuttavia, non conoscendo gli scenari futuri che si prospettano, poter disporre di genotipi che sono sopravvissuti alle avversità climatiche passate questi potrebbero rappresentare certamente un plusvalore per il futuro.

Verranno applicati approcci di valutazione genetica, agronomica, fisiologica, biochimica e tecnologica dei genotipi identificati.

Obiettivi

In termini generali, con questo progetto si intende studiare, selezionare e reintrodurre in coltura il più ampio set di genotipi di olivo localmente diffusi nella regione Lazio, più sostenibili dal punto di vista

ambientale e da proporre agli olivicoltori locali come risorse neglette in grado di imprimere una nuova vitalità al prodotto locale.

Nello specifico, si perseguiranno i seguenti obiettivi:

- *screening* e identificazione dei genotipi locali di olivo mediante strumenti molecolari;
- individuazione di un pool di varietà locali precedentemente inesplorate, con basse esigenze di input energetici e idrici, tolleranti alle avversità climatiche e alle emergenze fito-patologiche e caratterizzate da un elevato livello qualitativo dell'olio;
- identificazione di genotipi portatori di caratteri specifici (elevato contenuto in olio nei frutti, elevato contenuto in composti bioattivi per la salute);
- controllo genetico della filiera di propagazione, che include la localizzazione e salvaguardia delle piante madri originarie, delle piante capostipiti da esse derivate da impiegare come fonte di marze, talee e portinnesti, delle piante messe in commercio e di quelle messe a dimora in campo.

Rapporto tra obiettivi del progetto e fabbisogni di conservazione e d'innovazione

Il Progetto propone di attuare attività di prospezione, studio e selezione di cultivar locali laziali, per salvaguardare il germoplasma olivicolo laziale e metterlo a disposizione degli operatori, in particolare verranno anche analizzati i seguenti parametri:

- studio genetico *in situ* ed *ex situ* e caratterizzazione univoca di ciascun singolo genotipo,
- studio fenologico e stima della produttività,
- stima della tolleranza ai principali parassiti (*Bactrocera oleae*) e patogeni (*Spilocaea oleagina*, *Pseudomonas savastanoi*),
- stima della tolleranza ai principali fattori di stress ambientale (idrico, termico),
- caratterizzazione morfologica mediante definizione dell'architettura degli alberi e analisi d'immagine di foglie, infiorescenze, frutti e noccioli,
- analisi della resa in olio e della sua qualità dal punto di vista chimico-fisico ed organolettico.

Concetto ed approccio

Approccio globale e metodologia

Verranno applicati diversi approcci, complementari e sinergici tra loro, per la realizzazione delle diverse attività previste:

- Esplorazione del territorio olivicolo tradizionale regionale, geolocalizzazione degli esemplari di maggiore interesse;
- Screening del germoplasma olivicolo mediante strumenti molecolari per il riconoscimento e discriminazione delle varietà;
- Valutazione agronomica e delle patologie più comuni del germoplasma locale minore già presente in collezioni *ex-situ* e inesplorato;
- Propagazione vegetativa dei genotipi unici;
- Valutazione chimica e organolettica di oli dalle varietà locali di maggiore interesse.

Piano di lavoro

Sono previste le seguenti attività:

1. Analisi molecolare per confermare l'identità delle varietà già iscritte al Registro Varietale Regionale (RVR) del Lazio e di altre varietà da iscrivere al RVR, sia *in situ* presso agricoltori storici sia *ex situ* presso la collezione di Montopoli;

2. Analisi molecolare di alberi segnalati ex novo e caratterizzazione di varietà presenti *in situ* in azienda o *ex situ* presso la collezione ARSIAL di Montopoli
3. Prelievo di materiale vegetale e propagazione di varietà da agricoltori storici per il completamento del Campo Catalogo ARSIAL presso Montopoli
4. Verifica della corrispondenza genetica tra delle varietà analizzate nelle Attività 1 e 2 con le piante madri commercializzate dai vivai
5. Verifica della corrispondenza genetica tra le varietà analizzate nelle attività 1 e 2 e le piante presso gli agricoltori custodi
6. Caratterizzazione morfologica e fenologica delle varietà locali non pubblicate nel precedente catalogo e identificate durante le precedenti attività
7. Caratterizzazione degli oli monovarietali di varietà locali già iscritte o da iscrivere al RVR
8. Pubblicazioni tecnico scientifiche e altre iniziative di divulgazione

Prima annualità

Di seguito vengono riportate le 8 attività previste, divise in due annualità e comunque da concludere entro il 31 Dicembre 2020.

1. Analisi molecolare per confermare l'identità delle varietà iscritte al Registro Varietale Regionale (RVR) del Lazio e di altre varietà da iscrivere al RVR, sia in situ presso agricoltori storici sia ex situ presso la collezione di Montopoli

Partner coinvolti: ARSIAL, CNR-IBBR, Aziende

Campioni da analizzare in questa attività: il numero totale di piante riguarda 84 campioni, così suddivisi:

- 13 x 2 (26) genotipi *in situ* già iscritti
- 15 x 2 (30) genotipi *in situ* da iscrivere
- 28 genotipi *ex situ* presenti presso il campo collezione di Montopoli

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
a) Raccolta dei campioni da sottoporre ad analisi genetica, con rilevazione GPS di ciascun individuo e marcatura delle piante con segni di riconoscimento	ARSIAL Aziende CNR-IBBR
b) Estrazione del DNA dal materiale fogliare campionato	CNR-IBBR
c) Analisi genetica attraverso marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeat)	CNR-IBBR
d) Elaborazione bioinformatica dei dati ottenuti e identificazione dei genotipi unici attraverso il confronto con database molecolare e verifica della corrispondenza con quanto dichiarato	CNR-IBBR

Ore/uomo CNR-IBBR*: CTER IV livello, 178 ore uomo x € 35,89 = € 6.388,42, più 16 pasti, vedi circolare allegata relativa a missioni personale CNR = 352,00 € vedi circolare missioni CNR, più rimborso km, vedi schede ACI 2019 allegate, 5.600 km x 0,5041 = 2.822,96; CTER VI livello, 50 x 29,59 = € 1.479,50; I Ricercatore V livello II fascia, 10 x € 58,87 = € 588,70

Totale: € **11.631,58**

**I prezzi dei costi orari indicati sono stati estrapolati dalle tabelle ufficiali del costo del personale CNR assunto da più di tre anni e sono inclusivi di IRAP.*

2. *Analisi molecolare di alberi segnalati ex novo e caratterizzazione di varietà presenti in situ in azienda o ex situ presso la collezione ARSIAL di Montopoli*

Partner coinvolti: *ARSIAL, CNR-IBBR, Aziende*

Numero totale di piante da analizzare: 39, così suddivisi:

- 13 x 3 (39) genotipi *in situ* di nuova segnalazione

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
e) Raccolta dei campioni da sottoporre ad analisi genetica	ARSIAL - Aziende
f) Estrazione del DNA dal materiale fogliare campionato	CNR-IBBR
g) Analisi genetica attraverso marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeat)	CNR-IBBR
h) Elaborazione bioinformatica dei dati ottenuti dalla sub-attività "e" ed individuazione attraverso il confronto con database molecolare dei genotipi unici e corrispondenti a quanto dichiarato ed eventualmente già presente nella collezione <i>ex situ</i> di Montopoli	CNR-IBBR

Ore/uomo CNR-IBBR: CTER IV livello, 24 ore uomo x € 35,89 = € 861,36; CTER VI livello, 24 x 29,59 = € 710,16; I Ricercatore V livello II fascia, 10 x 58,87 = € 588,70

Totale: € **2.160,22**

Seconda annualità (prevista fino al 31 Dicembre 2020)

3. *Prelievo di materiale vegetale e propagazione di varietà da agricoltori storici per il completamento del Campo Catalogo ARSIAL presso Montopoli*

Partner coinvolti: *ARSIAL, Aziende*

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
i) Raccolta di marze per la propagazione di 20 genotipi identificati nelle precedenti attività	ARSIAL - Aziende
j) Propagazione attraverso innesto/talea per almeno 10 copie/genotipo	ARSIAL
k) Allevamento delle piante ottenute e loro messa a dimora presso il campo sperimentale di Montopoli	ARSIAL

4. *Verifica della corrispondenza genetica tra le varietà analizzate nelle Attività 1 e 2 e le piante madri commercializzate dai vivai*

Partner coinvolti: *ARSIAL, Vivai, CNR-IBBR*

Campioni da analizzare in questa attività: 84, così suddivisi:

- 28 x 3 (84) genotipi presenti come piante madri nei tre vivai scelti

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
l) Raccolta dei campioni presso i vivai da sottoporre ad analisi genetica	ARSIAL - Vivai
m) Estrazione del DNA dal materiale fogliare campionato	CNR-IBBR
n) Analisi genetica attraverso marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeat)	CNR-IBBR
o) Elaborazione bioinformatica dei dati ottenuti dalla sub-attività "k" ed individuazione, attraverso il confronto con database molecolare, dei genotipi corrispondenti a quanto dichiarato	CNR-IBBR

Ore/uomo CNR-IBBR*: CTER IV livello, 50 ore uomo x € 35,89 = € 1.794,50; CTER VI livello, 50 x 29,59 = € 1.479,50; I Ricercatore V livello II fascia, 10 x € 58,87 = € 588,70
Totale: € 3.862,70

5. *Verifica della corrispondenza genetica tra le varietà analizzate nelle attività 1 e 2 e le piante presso gli agricoltori custodi*

Partner coinvolti: *ARSIAL, Vivai, CNR-IBBR, Aziende*

Numero totale di piante da analizzare in questa attività: 150, così suddivisi:

- Tre vivai x 5 piante registrate x 10 repliche

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
p) Raccolta dei campioni presso i vivai o da aziende agricole da sottoporre ad analisi genetica	ARSIAL - Vivai
q) Estrazione del DNA dal materiale fogliare campionato	CNR-IBBR
r) Analisi genetica attraverso marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeat)	CNR-IBBR
s) Elaborazione bioinformatica dei dati ottenuti dalla sub-attività "n" ed individuazione, attraverso il confronto con database molecolare, dei genotipi corrispondenti a quanto dichiarato	CNR-IBBR

Ore/uomo CNR-IBBR: CTER IV livello, 100 ore uomo x € 35,89 = € 3.589,00; CTER VI livello, 100 x 29,59 = € 2.959,00; I Ricercatore V livello II fascia, 15 x 58,87 = € 883,05

Totale: € 7.431,05

6. *Caratterizzazione morfologica e fenologica delle varietà locali non pubblicate nel precedente catalogo e identificate durante le precedenti attività*

Partner coinvolti: *ARSIAL, CNR-IBBR, Aziende*

Numero totale di piante da analizzare in questa attività è previsto per 15 genotipi. Dalla pianta madre verranno raccolti campioni dei vari tessuti ed organi come di seguito specificato.

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
t) Raccolta dei campioni da sottoporre ad analisi morfologica	ARSIAL - Aziende
u) Trattamento dei campioni pervenuti in laboratorio: preparazione foglie, infiorescenze, frutti e noccioli (in numero minimo di 50)	CNR-IBBR
v) Scannerizzazione delle foglie (30)	CNR-IBBR
w) Fotografie dei frutti (30) e valutazione della forma e del peso secondo gli standard COI	CNR-IBBR
x) Fotografie delle infiorescenze (30) e determinazione del numero medio di fiori per infiorescenza e della forma	CNR-IBBR
y) Fotografie dei noccioli (a seguito della denocciolatura degli stessi frutti fotografati, vedi punto precedente) (30) e valutazione della forma e del peso	CNR-IBBR
z) Rilevamento delle fasi fenologiche ogni 15 giorni, a partire da marzo fino a dicembre, verificando la ripresa vegetativa,	ARSIAL

ingrossamento delle gemme, fioritura, allegagione, invaiatura e maturazione	
aa) stima della tolleranza ai principali parassiti (<i>Bactrocera oleae</i>) e patogeni (<i>Spilocaea oleagina</i> , <i>Pseudomonas savastanoi</i>); stima della tolleranza ai principali fattori di stress ambientale (idrico, termico)	
bb) Penetrometria e indice di maturazione su 50 frutti, settimanalmente dalla prima settimana di ottobre fino all'inizio della seconda settimana di dicembre	ARSIAL - CNR-IBBR
cc) Elaborazione delle immagini (foglie, infiorescenze, frutti e noccioli) ottenute attraverso software, post preparazione delle stesse attraverso analisi di immagine	CNR-IBBR

Ore/uomo CNR-IBBR: CTER IV livello, 200 ore uomo x € 35,89 = € 7.178,00; CTER VI livello, 100 x 29,59 = € 2.959,00; I Ricercatore V livello II fascia, 10 x 58,87 = € 588,70

Totale: € **10.725,70**

7. *Caratterizzazione degli oli mono-varietali di varietà locali dalle piante madri già iscritte o da iscrivere al RVR*

Partner coinvolti: *ARSIAL, CNR-IBBR, Aziende*

Numero totale di piante madri da analizzare in questa attività è previsto per circa 30, per un peso minimo di drupe di 3 kg a pianta madre. I risultati verranno espressi come media di tre repliche tecniche eseguite su una unica estrazione di olio.

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
dd) Raccolta dei campioni da sottoporre ad analisi chimico-fisica e organolettica	ARSIAL - Aziende
ee) Estrazione dell'olio dai campioni pervenuti in laboratorio	CNR-IBBR
ff) Analisi chimico-fisica: Acidità; Profilo Acidi Grassi C18:1, C18:2, C18:3; Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto – K232, K268, K270, ΔK; Numero di perossidi; Profilo fenolico: oleuropeina, ligustroside, oleocantale, tirosolo e idrossitirosolo, pinosresinolo, acido caffeico, luteolina, polifenoli totali; squalene; tocoferoli; vitamina A	CNR-IBBR (il migliore dei 3 preventivi allegati)
gg) Analisi sensoriale degli oli ottenuti	CNR-IBBR

Ore/uomo CNR-IBBR: CTER IV livello, 80 ore uomo x € 35,89 = € 2.871,20; CTER VI livello, 30 x 29,59 = € 887,70; I Ricercatore V livello II fascia, 10 x 58,87 = € 588,70.

Totale: € **4.347,60**

Per le analisi chimico-fisiche una indagine preliminare ha evidenziato un costo unitario-medio di € 240,00/campione che, per 30 campioni previsti, equivale a € 7.200,00 uguale a **8.784,00** IVA inclusa

Totale: € **13.131,60**

8. *Pubblicazioni tecnico-scientifiche e altre iniziative di divulgazione*

Partner coinvolti: *ARSIAL, CNR-IBBR*

I dati ottenuti saranno utilizzati per la stesura di pubblicazioni tecnico-scientifiche. Il partner CNR-IBBR fornirà i dettagli numerici e grafici da inserire all'interno delle stesse sulla base dei risultati

ottenuti dalle attività precedenti. Inoltre il CNR-IBBR fornirà le fotografie effettuate per le analisi morfologiche (Attività 6) ad alta risoluzione (300 dpi) e provvederà alla documentazione tecnico scientifica necessaria per aggiornamento scheda varietale delle varietà di olivo iscritte al RVR. ARSIAL provvederà alla stesura dei testi, alla eventuale stampa e divulgazione.

L'attività include le seguenti sub-attività e sarà svolta da:

Sub-attività	Partner coinvolti
hh) Testo sulle varietà tutelate dalla Legge Regionale 15/2000	ARSIAL - CNR-IBBR
ii) Aggiornamento del catalogo varietale regionale	ARSIAL - CNR-IBBR
jj) Giornata di divulgazione pubblica dei risultati ottenuti nel presente progetto organizzata da ARSIAL e che vedrà la presenza di tutti i partner coinvolti	ARSIAL - Aziende Vivai - CNR-IBBR

Ore/uomo CNR-IBBR*: CTER IV livello, 20 ore uomo x € 35,89 = € 717,80, più 3 pasti = 66,00 € vedi circolare missioni CNR; più rimborso km, vedi schede ACI 2019, 1.050 km x 0,5041 = 529,81; CTER VI livello, 20 x 29,59 = € 591,80, più 3 pasti = 66,00 € vedi circolare missioni CNR; I Ricercatore V livello II fascia, 20 x € 58,87 = € 1.177,40, più 3 pasti = 90,00 € vedi circolare missioni CNR.

Totale: € **3.238,81**

SPESE PROGETTO

COSTO REAGENTI PER ANALISI MOLECOLARI:

Considerando: 357 campioni totali

Estrazione del DNA totale;

- Analisi con 10 marcatori SSR riconosciuti a livello internazionale per il loro grado di discriminazione, di seguito l'elenco specifico (DCA3, DCA5, DCA9, DCA16, DCA18, EMO90, GAPU71B, GAPU101, GAPU103A, UDO43) mediante amplificazione PCR,
- Corsa su sequenziatore capillare,
- Elaborazione dei dati ottenuti attraverso software bio-informatici come da recente letteratura scientifica,
- Comparazione con un database di confronto contenente oltre 2.000 profili molecolari di varietà di olivo incluse cultivar locali, nazionali ed internazionali.

Dettaglio costi**:

- N. 2 kit, GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit o similari da acquistare attraverso MEPA, spesa prevista **792,00 € vedi tre preventivi migliore LIFE**
- N. 1 conf. da 1000 pz Buste estrazione in plastica universal, unicità per metodo di estrazione, spesa prevista **220,50 € vedi unicità di distribuzione EUROCLONE**
- N. 2 conf. Primo 96 well plate non-skirted, clear o similari da acquistare attraverso MEPA, spesa prevista **211,76 € vedi tre preventivi migliore EUROCLONE**
- N. 1 conf. Primo Transparent Adhesive PCR o similari da acquistare attraverso MEPA, spesa prevista **78,54 € vedi tre preventivi migliore LIFE**
- N. 10 conf. filter tips 0,1-10ul, o similari da acquistare attraverso MEPA, spesa prevista **334,20 € vedi tre preventivi migliore EUROCLONE.**
- N. 5 conf. filter tips 100-1000ul, o similari da acquistare attraverso MEPA, spesa prevista **176,20 € vedi tre preventivi migliore EUROCLONE.**
- N. 18.000 unità Taq Polymerase, o similari da acquistare attraverso MEPA, spesa prevista: **1.836,00 € vedi tre preventivi migliore EUROCLONE per quantità precisa (18.000 unità) e per mix contenente tutti i reagenti necessari.**
- N. 4 conf. 3130 POP-7, unicità per strumento sequenziatore ABI3130, spesa prevista **1.057,40 €**

- N. 2 conf. HI-DI formamide, unicità per strumento sequenziatore ABI3130, spesa prevista **92,22 €**
- N. 8 conf. LIZ (500) size standard, unicità per strumento sequenziatore ABI3130, spesa prevista **4.732,80 €**
- N. 1 conf. Capillary array, unicità per strumento sequenziatore ABI3130, spesa prevista **1.018,30 €**
- N. 10 conf. Custom prism primer, unicità per strumento sequenziatore ABI3130, spesa prevista **1.032,00 €**
- N. 5000 basi Primer 25 nMol tube, o similari da acquistare attraverso MEPA, spesa prevista **800,00 €**

**I costi del personale sono stati calcolati seguendo le circolari ufficiali e attive del CNR, si allega tutto il materiale documentale.*

***I prezzi indicati sono stati estrapolati da preventivi ufficiali e da reagenti che si utilizzano abitualmente per gli esperimenti richiesti come da documentazione allegata. Si forniscono tre preventivi per i materiali comuni ed eventuali indicazioni di unicità per quelli che sono necessari per lo svolgimento del lavoro.*

TOTALE COSTO REAGENTI = € 12.381,92 IVA esclusa, € 15.105,94 (IVA inclusa)

TOTALE COSTO ORE/UOMO = € 39.470,89

TOTALE COSTO PASTI: 574,00 €

TOTALE COSTO RIMBORSO KM: 3.352,77

TOTALE COSTO ANALISI CHIMICHE = € 7.200,00 IVA esclusa, € 8.784,00 (IVA inclusa)

TOTALE SPESA PROGETTO "RECUPERO E VALORIZZAZIONE DI VARIETA' LOCALI DI OLIVO DEL LAZIO" = € 67.287,60 (IVA reagenti inclusa)