

ISSN 1128-7969

Numero 1  
Gennaio - Marzo 2013  
Anno 42  
pubblicazione trimestrale

Sped. in abb. post. 70%  
Filiali di Roma

FOSAN 

Fondazione per lo Studio  
degli Alimenti e della Nutrizione

LA RIVISTA DI  
**SCIENZA DELL'ALIMENTAZIONE**  
*Journal of Food Science and Nutrition*



1

contributi di

E. Perri  
J.-L. Barjol  
L. Rallo  
C. Di Vaio  
R. Muleo  
L. Baldoni  
S. Zelasco  
E. Marone

P. Fiorino  
F. Alagna  
R. Rao  
G. Loconsole  
V. Savino  
G. Bongi  
N. Vignozzi  
G. Zimbalatti

V. Simeone  
B. De Gennaro  
C. Benincasa  
D. Britti  
S. Cuzzocrea  
E. Toti  
M. Sciarroni  
R. Pellati

M. Pagliai  
A. Tombesi  
M. Saponari  
G. Bottalico  
F. Faggioli  
G. Albanese



LA RIVISTA DI SCIENZA  
DELL'ALIMENTAZIONE  
*Journal of Food Science and Nutrition*

*Comitato Scientifico*  
*Scientific board*

Franco Antoniazzi  
Paolo Aureli  
Maurizio Boccacci Mariani  
Furio Brighenti  
Francesco Maria Bucarelli  
Eugenio Cialfa  
Amleto D'Amicis  
Andrea Ghiselli  
Agostino Macrì  
Aldo Mariani Costantini  
Pietro Antonio Migliaccio  
Gianfrancesco Montedoro  
Enzo Perri  
Giovanni Battista Quaglia  
Giuseppe Rotilio  
Mauro Serafini  
Marcello Ticca  
Carmela Tripaldi  
Aida Turrini

Direttore Responsabile: Davide Malacaria  
Capo Redattore: Angela Iapello  
Periodico trimestrale pubblicato da:

FOSAN 

Fo.S.A.N. Fondazione per lo Studio degli Alimenti e della Nutrizione  
Piazza dell'Esquilino, 29 - 00185 Roma  
Tel. 064880635 - Fax 0648930976  
E-mail: segreteria.fosan@gmail.com

 Associata all'USPI - Unione stampa periodica Italiana  
Autorizzazione del Tribunale di Roma n. 14418 del 10 marzo 1972  
Iscrizione al n. 1364/84 del Registro Stampa



## SOMMARIO

Introduzione <i>E. Perri</i>	9
The present and global future of olive growing and olive oil market proceedings <i>di J.-L. Barjol</i>	11
The olive growing in Spain and its genetic improvement <i>di L. Rallo</i>	17
Caratterizzazione e valutazione del germoplasma di olivo in Campania <i>di C. Di Vaio e S. Nocerino</i>	39
OLEA: il progetto per la genomica e il miglioramento genetico dell'olivo <i>di R. Muleo, L. Baldoni, S. Zelasco</i>	49
Nuove teorie sulla crescita vegetativa e sulla formazione del fiore in olivo coltivato <i>di E. Marone, P. Fiorino, A. Ottanelli</i>	53
Caratterizzazione molecolare di varietà campane di olivo e studio della risposta della drupa alla mosca dell'olivo <i>di F. Alagna, D. Scarano, P. Varricchio, L. Baldoni, G. Corrado e R. Rao</i>	67

<b>Production of Nuclear Stock olive plants for certification programs</b> <i>di G. Loconsole, M. Saponari, G. Bottalico, F. Faggioli, G. Albanese and V. Savino</i>	75
<b>Olive (&amp; drupes) Tri Acyl Glycerols adaptation to the temperature of growth: the databases.</b> <i>di G. Bongj and C. Ranocchia</i>	85
<b>Olivicoltura sostenibile e gestione del suolo</b> <i>di N. Vignozzi, A. Agnelli, M. Platinetti, S. Pellegrini, S. Simoncini, M. Pagliai, C. Xiloyannis, G. Celano, A.M. Palese</i>	91
<b>Advances in harvesting and pruning of olive trees</b> <i>di A. Tombesi</i>	97
<b>La raccolta in olivicoltura richiede maggiore innovazione tecnologica</b> <i>di G. Zimbalatti e B. Bernardi</i>	105
<b>Innovazioni nella difesa fitosanitaria</b> <i>di N. Iannotta</i>	111
<b>Linee guida per la gestione degli oliveti secolari</b> <i>di V. Simeone, M. Tucci, R. Viti, J. Calabrese, E. Perri</i>	127
<b>La filiera olivicola-olearia pugliese: struttura, organizzazione e competitività</b> <i>di B. De Gennaro e L. Roselli</i>	165
<b>Il mercato mondiale delle olive da mensa: produzione, consumo e prospettive</b> <i>di B. Lanza</i>	175

<b>Analytical and organoleptic parameters for the differentiation of olive oils according to the areas of origin, healthy and nutritional properties</b> <i>di C. Benincasa, E. Romano, M. Pellegrino, E. Perri</i>	<b>181</b>
<b>Oleuropein olive oil compound in acute and chronic inflammation models: facts and perspectives</b> <i>di D. Britti, D. Impellizzieri, A. Procopio, S. Cuzzocrea</i>	<b>187</b>
<b>Breve rassegna sull'indicazione di origine dell'olio extravergine di oliva</b> <i>di E. Toti</i>	<b>219</b>
<b>Certificazione dell'olio di oliva biologico</b> <i>di M. Sciarroni</i>	<b>221</b>
<b>Storia, miti e leggende dell'olio d'oliva</b> <i>di R. Pellati</i>	<b>223</b>
<b>Schede Varietali</b> <i>di C. Di Vaio</i>	<b>231</b>



# Introduzione

Le relazioni inedite, presentate al Convegno scientifico per la divulgazione dei risultati delle ricerche ed il trasferimento delle innovazioni alla filiera olivicola-olearia del Progetto "Ricerca ed innovazione per l'Olivicoltura Meridionale" (RIOM), organizzato dal CRA Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI) e dall'Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olio di Spoleto, in collaborazione con il Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali e con il patrocinio e della Società Orticola Italiana, celebrato a Rende l'8 ed il 9 novembre 2011, conservano inalterato, a distanza di quasi due anni, il loro valore scientifico e divulgativo, rappresentando un prezioso contributo al dibattito avviato negli ultimi anni, e non ancora sopito, sullo stato dell'arte delle ricerche e sulle innovazioni possibili in olivicoltura ed elaiotecnica, in un contesto di crisi economica e scarsa competitività del nostro comparto olivicolo. Mentre lo scenario mondiale è sempre più caratterizzato dalla costante crescita delle superfici olivicole in Spagna e nei Paesi non Europei, il nostro Paese non riesce a dotarsi di una strategia condivisa, in grado di rilanciare la nostra olivicoltura e di rinnovare gli impianti. In questo quadro, utili spunti per una riflessione sugli scenari futuri, sono rappresentati, all'interno del volume, dalle relazioni del Prof. Luis Rallo dell'Università di Cordoba e del Direttore esecutivo del Consiglio Oleicolo Internazionale di Madrid, Jean-Louis Barjol, mentre, sul piano dell'analisi economica, utile e puntuale è il contributo di De Gennaro e Roselli sulla struttura e competitività della filiera olivicola-olearia della prima regione olivicola Italiana: la Puglia. Analogamente, preziose, esaustive e mature le riflessioni di Tombesi, Zimbalatti e Bernardi sullo stato dell'arte delle innovazioni possibili nel campo della meccanizzazione della raccolta e della potatura, rispettivamente, nella realtà Italiana e Calabrese. Acuto ed originale il contributo di Fiorino, Marone e Ottanelli nel campo della biologia fiorale dell'olivo; innovativo l'apporto dei biologi molecolare nel campo della genomica della specie, grazie anche alla continuità delle ricerche assicurate dal finanziamento MIPAAF dei progetti Esplora ed Olea. Infine, interessanti i contributi di Di Vaio e Nocerino sul germoplasma Campano, di Vignozzi, Xiloiannis *et al.*, sulla olivicoltura sostenibile e la gestione del suolo, di Bongi sulla biosintesi dei trigliceridi, di Iannotta sulle innovazioni nella difesa fitosaitaria, di Savino *et al.* sulla certificazione fitosanitaria, di Britti, Impellizzeri, Procopio e Cuzzocrea sull'attività farmacologica dell'oleuropeina e derivati, di Benincasa *et al.*, sulle caratteristiche degli oli meridionali. Infine, proprio sulla base di queste ultime considerazioni salutistiche si schiude l'opportunità per l'adozione di una nuova strategia nazionale, suggerita anche da due importanti novità normative: da un lato il Reg UE 432/2012, del 16 maggio 2012, relativo alla compilazione di un elenco di indicazioni sulla salute consentite sui prodotti alimentari, diverse da quelle facenti riferimento alla riduzione dei rischi di malattia e allo sviluppo e alla salute dei bambini, entrato in vigore il 14/12/2012, che prevede per i polifenoli la seguente indicazione: "i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo" per una assunzione giornaliera di almeno 250 mg di fenoli per Kg di olio di oliva; dall'altro, la proposta di un Decreto ministeriale che, in conformità con quanto previsto dall'art. 22, paragrafo 2 del regolamento CE n.1974/2006, prevede l'istituzione di un Sistema di Qualità Nazionale Olio Extra Vergine di Oliva che individua il prodotto Olio Extra Vergine di Oliva avente caratteristiche specifiche che determinano una qualità del prodotto finale significativamente superiore rispetto alle norme commerciali correnti, secondo caratteristiche descritte in uno specifico e corrispondente Disciplinare.

Infine, desidero ringraziare la Fondazione per lo Studio degli Alimenti e la Nutrizione (FO-SAN), la redazione de "La Rivista Italiana di Scienza dell'Alimentazione" e tutti i membri della redazione della stessa, per aver accolto la proposta di pubblicare un numero monografico al servizio della filiera olivicolo-olearia, con l'auspicio che i claim e le evidenze scientifiche relative ai benefici di una alimentazione mediterranea ricca di olio extravergine d'oliva di alta qualità possano rendere più remunerativa la coltivazione dell'olivo.

Il Coordinatore Generale  
Dott. Enzo Perri

# The present and global future of olive growing and olive oil market proceedings

## J.-L. Barjol

IOC Executive Director

The International Olive Council is the world's only international intergovernmental organisation in the field of olive oil and table olives. By bringing together olive oil and table olive producing and consuming stakeholders, this places it in a unique position as a forum for authoritative discussion on issues of interest to the olive industry.

The Council was set up in Madrid, Spain, in 1959, under the auspices of the United Nations. It used to be known as the International Olive Oil Council or IOOC until 2006, when its name was changed to the International Olive Council or IOC because its scope was extended to encompass table olives. The Council is a decisive player in contributing to the sustainable and responsible development of olive growing and it serves as a world forum for discussing policymaking issues and tackling present and future challenges. It does so by:

- Supplying clear, accurate information and statistics on the world olive and olive oil market, like all the other international commodity bodies;
- Drawing up and updating international product trade standards;
- Supplying its Members with technical assistance to help them improve quality from field to fork via cooperation on research and development projects, training and the transfer of technology;
- Promoting world consumption of olive oil and table olives through innovative campaigns and action plans.

To do all this, it assembles government representatives and experts regularly to discuss problems and concerns and to fix priorities for IOC action. It also works in close partnership with the private sector, via its Advisory Committee.

Its current membership includes the leading international producers and exporters of olive oil and table olives. Ninety-eight percent of the world's olive oil is produced by the IOC member countries<sup>1</sup>, amongst which the 27-Member European Union accounts for 75%. At the head of the EU production league is Spain, followed by Italy and Greece [and to a lesser extent Portugal, France, Slovenia, Cyprus and Malta]. Tunisia, Turkey and Syria are the top producers among the other member countries of the IOC. Next in place is Morocco [followed further down the scale by Algeria, Argentina and Jordan, and then Libya, Lebanon, Albania and Croatia, Iran, Israel, Egypt and Montenegro]. IOC producer Members account for 98% of world exports.

---

<sup>1</sup> Albania, Algeria, Argentina, Croatia, Egypt, European Union, Iran, Iraq, Israel, Jordan, Lebanon, Libya, Montenegro, Morocco, Syria, Tunisia and Turkey.

The IOC is committed to the integrated, sustainable development of world olive growing. It attempts to translate this commitment into tangible advancement for its member countries and, most importantly, for the ordinary people who earn their livelihood from the produce of the olive tree.

From a technical point of view, the IOC devises and implements technical cooperation programmes to modernise the olive sector and stimulate the sustainable, environmentally friendly development of olive growing, olive oil production and table olive processing in the member countries. Research & development is mainly channelled through the design and implementation of technical projects, often in partnership with the Common Fund for Commodities, aimed at transferring technology.

The IOC's R&D programme is meant to reinforce research in the member countries and to promote the effective application of research results to olive growing, olive oil and table olives.

IOC projects encourage collaboration and the collective construction of a point of convergence where the individual objectives or goals of each country find a coherent, complementary place alongside those of other project participants.

Many lines of action have been identified:

- *Research-oriented action* to develop new concepts and ideas in the different spheres of research in the olive sector
- *Development-oriented action* to design and develop projects specifically oriented at quality enhancement and technology transfer

These lines of action are important for the sector because they aim:

- To modernise olive growing and the olive oil and table olive industry through technical and scientific planning;
- To enhance product quality;
- To reduce costs of production, particularly of olive oil to improve its position in the overall market for fluid edible vegetable oils;
- To lessen the environmental impact and potential harmful effects of the olive oil and table olive industry;
- To help small farmers, via projects, by making olive growing sustainable and preventing rural depopulation.

Activities in this area are coordinated by the department of research & development and environmental affairs of the Executive Secretariat, which looks to promote the use of modern techniques in the olive orchard and later at the olive oil mill and table olive processing facility, all with the aim of increasing production, lowering costs, upgrading quality and protecting the environment. Its interest spans every area of olive growing: from breeding to genetic improvement, from pest and disease control to irrigation, from pruning to harvesting, from soil management to olive oil production and by-product recycling. The department can approach each question in different ways, for instance through projects carried out in the member countries, technical publications and guides or international seminars. Some projects are financed in full by the IOC budget whereas others are co-financed with the Common Fund for Commodities.

The RESGEN project for the conservation, characterisation, collection and utilisation of genetic resources in olive, implemented so far in 20 countries, has made it possible to recover and conserve the priceless genetic heritage of the olive in the national collections of the participant countries as well as in three world collections (in Spain, Morocco and Turkey). The application of molecular markers (SSRs) will allow the definitive identification of all the varieties. This will be the first stage of a bigger project for the use of genomic tools to identify worthwhile traits of olive fruits and olive oil and agronomic characteristics linked to more efficient olive production and to harness these traits for breeding purposes.

The project for the creation of pilot demonstration and training olive nurseries will be the second stage of the above project.

The programme for the development and dissemination of sustainable irrigation management in olive growing, Irrigaolivo CFC/IOOC/06 is another important project implemented by the IOC.

The IOC also publishes the information generated by its activities in addition to handbooks, CDs and guides.

A glossary of terms relating to olive oil technology, table olive processing, olive growing, chemistry and organoleptic analysis is available on the IOC website ([http://www.internationaloliveoil.org/glosario\\_terminos/index](http://www.internationaloliveoil.org/glosario_terminos/index)) in the five official languages of the Organisation.

A guide to geographical indications (GIs) drawn up for countries potentially interested in setting up their first GI scheme for olive oils and table olives can be consulted on the IOC website at the following address: <http://www.internationaloliveoil.org/store/index/487-technical-scientific-publications>.

The IOC is planning to undertake a project on carbon footprinting. This idea is prompted by the growing interest of companies in calculating their CO<sub>2</sub> emissions and informing consumers, who are increasingly aware of the importance of lowering carbon dioxide emissions in the fight against global warming. The IOC intends to set up a multidisciplinary team of people and organisations with expert knowledge about olive oil, sustainability and climate change. The first task of the team will be to analyse the technical and scientific feasibility of drafting a carbon footprinting protocol for olive oil.

Together, the IOC Members define a clear-cut strategy for the institution whether it be in the promotional, economic, chemistry or technical cooperation areas, particularly for the training activities and specific operations implemented as a feature of international technical cooperation, in order to come to grips with a scenario that is becoming more and more competitive and demanding.

Against this background, the objectives are to enhance product definition, characterisation and control and to intensify information flow about product characteristics, health-promoting properties and environmental impact, while overseeing the development of the olive and olive oil industry in the member countries.

The goal pursued through training activities and specific operations is to relay results and transfer the latest technological advances to the Members in need of such input for their development.

At international level, some of the training and specific operations for implementation in 2013 are university specialisation course on the organoleptic assessment of virgin olive oil (co-organised with the University of Jaén); seminar on advanced marketing strategies (co-organised with the Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza – International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (IAMZ-CIHEAM) and seminar on olive oil and table olive nutrition (as a satellite event at the World Nutrition Congress). The IOC also has a scholarship programme (PhDs and Masters).

Olive oil chemistry and standardisation is a crucial area of IOC work broadly spanning the constant development or updating of chemical and sensory testing methods for olive oils and table olives for inclusion in the IOC's international trade standards and the harmonisation of international standards or regulations. The IOC also runs a prestigious recognition scheme for olive oil chemical and sensory testing laboratories and it organises the IOC Mario Solinas Quality Award, an annual international award for excellence in the production of extra virgin olive oil.

Ring tests are performed to finalise various methods of analysis designed to improve product quality and authenticity (primarily for the determination of alkyl esters, stigmastadienes and waxes; mineral oils, etc.). In addition, several expert groups meet to discuss topics of significance to the sector (notably, labelling (first meeting), alignment of the Codex and IOC table olive standards, organisation of the activities to train the first table olive tasting panels and preparation of reference samples for table olive sensory analysis, continuing search for new methods of analysis and harmonisation of standards) and arrangements are made for the annual laboratory proficiency check tests in which more than 70 physico-chemical testing laboratories and 60 olive oil tasting panels take part from IOC member and non-member countries. The fact that these panels and laboratories come from all over the world shows the acknowledged international role of the IOC in the field of standardisation and quality. The IOC Chemistry & Standardisation Unit takes part in international events held in both member and non-member countries.

A programme for the quality control of the olive oils and olive pomace oils sold in import markets (Australia, Canada, Brazil and the United States) is under way.

Since its inception, the IOC has centred promotion on broadcasting information about the health-related benefits and gastronomic versatility of olive oil, a staple of the Mediterranean Diet.

Judging from the results, IOC advocacy of scientific research has been crucial in sealing the success of promotion by working scientific findings into the promotional messages targeted at potential consumers with a specific income level and educational background. As consumers become more and more health and diet-conscious and a growing number of products are released on the market, it is vital to tap the results of scientific research in order to tell the public at large about olive oil's unique, scientifically proven properties.

How does the IOC do so? It arranges and/or takes part in international scientific seminars, congresses and symposiums – sometimes congress proceedings are later published in medical journals –, it partners with internationally renowned institutions and it generates extensive media coverage.

It meticulously monitors, collects and processes the latest scientific information on the nutritional and disease-prevention aspects of olive oil. It weaves this information into its promotional messages, which keep up to date with scientific findings, as well as into the scientific promotional material it produces for distribution at events. Specific sessions focused on olive oil are also arranged during international congresses to consolidate IOC collaboration with scientific institutions.

Scientific information has to be customised to the concerns and culture of each country. When designing its promotional campaigns, the IOC takes into account the incidence of certain diseases in the target countries and the proven effect of olive oil in their prevention. For instance, child and adult obesity is a health problem in the more developed countries. To reach its objectives, the IOC is willing to build up a strong relationship with the scientific community in order to establish its work upon robust and updated scientific evidence.



# The olive growing in Spain and its genetic improvement

L. Rallo

Professor of Pomology, Department of Agronomy. University of Córdoba

## Abstract

The olive area in Spain reached 2,35 million ha by 1965, decreased afterwards down to 2,1 million ha by 1985-86 and then increased steadily up to date. The recent expansion of olive plantations was promoted by the entrance of Spain in the EU in 1986 and by the continuous expansion of the olive oil and table olives market in the World. Now there is more than 2,4 million ha which represents the 28% of the Total World Area. This recent expansion has been associated with an intensification of the orchards. New orchards and training systems more adapted to mechanical harvesting have been established. A steady increase in drip irrigation occur in traditional and in new plantations doubling the production of olive oil and table olives in the last fifteen years. Relevant innovations in the processing systems of olive oil and table olives have also occurred. We are finally attending to a dramatic change in the cultivars planted in the new orchards which has been associated to the boom of the nursery industry and to the expansion of new intensive orchards. This lecture summarises the recent changes of the olive industry in Spain with particular reference to the studies on genetic resources and the olive breeding programs in progress.

## From traditional to new olive growing

### Traditional Olive Plantations. (Figure 1)

Several patterns characterize current traditional olive plantations in Spain and in other Mediterranean Countries. A big size of the tree, which is a common feature in many plantations, constitutes a difficulty for harvesting the crop. Many plantations are more than 50 years old, even sometimes they are centennial olives. This longevity represents a major constrain for the olive orchards to be adapted to the social and economical changes that are taking place nowadays. Therefore obsolescence becomes a common feature of many olive groves (Rallo, 1986).

Olive tree is very well adapted to the Mediterranean climate which is characterized by a mild and short winter and a long, dry and hot summer. Olive has developed adaptation mechanisms to summer water stress insuring the survival of the trees but reducing yield (Ferrer, 1984). Up to recent years only 8-10 % of olive orchards were irrigated (Civantos, 2008). Olive has commonly been planted in low yield potential soils, many of them in sloping lands, without possibility of irrigation. These plantations yielded a low crop. Therefore, the increasing demand for olive oil and table olives has traditionally been met by planting olives in new more fragile and less yield potential soils. For instance, although more than one million ha of olive trees were planted in Spain between 1888 and 1972, the average yield per ha decreased (Rallo, 1986).

Harvesting olives has been a highly consuming hand labour task. More than 70% of total labour demand in traditional olive orchards is required for harvesting (García-Ortiz et al., 2008). In many

cases olive harvest has represented the main demand for labour in many rural olive areas. Consequently olive expansion has been historically associated to periods of demographic rising. The progressive concentration of plantations in many olive producing zones of the Mediterranean world has triggered a temporary demand of labour to attend olive harvesting. Temporary migration during the 2-4 months of olive harvest and cultural celebrations associated to the end of the harvest are common features in the olive world. Concomitantly, unemployment along the rest of the year, biennial trend of the olive tree crop and cyclic crisis of prices have represented causes for social instability in olive zones with monoculture.

Most of the traditional olive growing technology is local and empirically based. Cultivars used and pruning practices are clear examples. Olive cultivars in almost all Mediterranean countries have been locally selected among random seedlings and vegetative propagated by farmers since many centuries. As a rule, diffusion of most cultivars was confined around their supposed area of origin. For instance, 24 cultivars account for most of the crop in Spain. These cultivars have been diffused to only one continuous area (Barranco et al. 2005, Rallo and Barranco, 2006).. Only two main cultivars, 'Manzanilla de Sevilla' and 'Empeltre', both propagated by grafting, have been largely cultivated out of their original area of diffusion. Thus, farmers have used the best performing cultivar among the selected in their growing areas. Also pruning practices are empiric, local and divers. Reducing tree size to facilitate the accession to the canopy at harvesting has been a common feature of many pruning practices. Divers local criteria led to many local pruning systems in different growing areas.

### The new olive orchards (Figure 2)

Migration towards cities reduced rural population in olive growing areas of Southern Europe after War World II. First in Italy and afterwards in Spain, Portugal and Greece, the scarcity and increasing cost of man labour became a major economical problem in olive areas of these countries. Furthermore, low olive orchards yield and low prices of other vegetal oils from annual crops, such as soybean, sunflower and rape, triggered a deep crisis in the olive oil sector by 1970's. In Spain, a public program to reconvert olive yards, aiming at increase yield and reduce costs by mechanical harvesting, was set up between 1972 and 1986. This year Spain and Portugal entered the EU. The European subsidies for the olive oil have then promoted high yield orchards. Since that time new olive plantations have transformed the Spanish Olive Orchards. The following paragraphs illustrated these major changes:

*1. Mechanical harvesting and high density orchards.* By the seventies, mechanical harvesting becomes a must for the new plantations. Trunk shaker associated to different frameworks to collect the dislocated fruits from the trees was the first approach to mechanical harvesting. Traditional olive orchards in Spain have been characterized by a density of 70-80 trees/ha, with 3 trunks per tree and a medium-low productivity (Navarro and Parra, 2008). Since the 1970's new planting systems with 200-450 trees/ha and single trunk trees were established. These new orchards provide higher productivity and they also facilitate mechanical harvesting with tree trunk shakers.

In the first half of the 1990's a new planting system: the high density hedgerow (>1.500 trees per ha) (De la Rosa et al, 2007; Tous et al., 2006), was promoted by the nurseries and the vine straddle harvester manufacturers. In this system 'Arbequina' is the standard cultivar. 'Arbosana' and 'Koroneiki' are also planted. Since 1993 the expansion of this system has been exponential and currently more than 60.000 ha have been planted in many countries according to the estimates of the nursery industry. This system requires high investment (>6000€/ha), yield the earliest crop (> 1.000 kg of oil /ha at the third year of planting and more than 1800 kg of oil per ha from the 5<sup>th</sup> to the 9<sup>th</sup> -10<sup>th</sup> years of planting) with 150-250 mm of applied water. One harvester may collect up to 2, 5 ha per day, thus,

reducing drastically harvest costs. When orchards get older than 9-10 years the height of the hedge-row requires canopy management to avoid shading of the incident solar radiation on the canopy and yield reduction. There has also been reported higher incidence of some pest and diseases, particularly *Colletotrichum spp* and *Pseudomonas savastanoi*. (Moral et al., 2006), than in other intensive systems. New ongoing harvester designs may allow orchard densities on the range of 450-1000 trees per ha that will allow a longer time without restriction for mechanical harvesting because of a big canopy size. Current breeding programs try to obtain new low vigour cultivars or dwarfing rootstocks to enhance mechanical harvesting and extend the age for maximum crop in this new plantation system.

2. *Irrigation*. Increasing planting density was the general strategy for high yield, early bearing and mechanical harvesting in the new orchards. However, water stress limited crop and oil yield. By the 1960's irrigation was the most efficient way to increase yield in California and Israel orchards. In Spain a shy increase in drip irrigation in the 1970's and early 1980's was followed by a steady increase. In 1997 more than 40 % of the new orchards were drip irrigated and this percentage has risen continuously since that time (Consejería de Agricultura y Pesca, 2003). Currently, most of the new orchards are irrigated following a deficit irrigation strategy (Pastor, 2005). The new irrigated orchards represent about 450.000 ha. Irrigation is the main reason for the increase of the oil production per year in Spain from 600.000 t in 1980-1985 to 1.100.000 t in 2003-2008

3. *Changes in processing*. Spain innovated the processing systems for oil and table olive production in the 1980's. New continuous systems based on centrifugation for oil processing increased both the rate and the capacity of the oil industry. This change carried out a notorious improvement of the olive oil quality (Alba, 2008). The table olive industry has also increased its capacity and diversified the types of table olive produced (Rejano and Garrido, 2008).

4. *Nursery Development, Varietal Change and Verticillium Wilt Spreading*. Propagation of big hardwood cuttings by the farmers has been the usual method for olive in Spain. A shy development of nurseries using semi hardwood and softwood cuttings under mist (Caballero y Del Río, 2008) began in the 1980's and triggered a continuous expansion of the nursery industry which production over passed thirty millions plants per year in 2007. The expansion of the nurseries was associated to the propagation of few traditional cultivars. Between 1975 and 1995 the varietal structure of the Spanish Orchard has been modified. This trend will continue in the near future. Thus propagation by the farmer has practically disappeared and only three oil cultivars ('Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca') and one table olive variety ('Manzanilla de Sevilla') account for more than 95% of produced plants. For the first time, the risk of genetic erosion has dramatically appeared in olive growing.

The increasing incidence of *Verticillium* wilt in olive, a disease caused by the fungus *Verticillium dahliae* Kleb., has been associated to infected plants from nurseries among other factors (Trapero and Blanco, 2008). The certification of nursery plants is a main issue to limit the expansion of this disease. Certification programs are however far from being generalized in the country. Tests to identify the cultivars by SSR and morphological characteristics (Trujillo et al., submitted) and for early detection of asymptomatic and infected nursery plants by the main virus, by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and by *Verticillium dahliae* with specific SSRs and RT-PCR are currently available (Bertolini et al., 2003; Mercado-Blanco et al., 2003). Certification should be compulsory for the Spanish nursery industry in the next years.

5. *Integrated Pest Management (IPM)*. Major olive pests and diseases and their control have been

review by Alvarado et al. (2008) and by Trapero and Blanco (2008). The entomological fauna of traditional olive orchards is usually balanced. However, the intensification of the planting systems and the irrigation has modified the incidence of pest and diseases. For example, in new irrigated orchards *Verticillium* wilt has become the most prevalent disease. Anthracnose and shoot moth have also become important problems in the hedgerow orchards.

Pest and disease control is usually done with the standard traditional pesticides and fungicides because of their efficiency and low cost. However, the Integrated Pest Management (IPM) approach developed in the last 30 years. Initially, the Atria's (local groups for common treatments) develop IPM according to the concept of economic threshold for pesticide application. Currently the concept of Integrated Crop Management (ICM), in which the whole orchard management is taken into consideration, is progressively extended to many local groups. Also organic farming is progressively extended in traditional olive orchards. The two later systems of production have been promoted by the regional governments. More than 20% of traditional orchards are cultivated following the controls required in both systems.

## The genetic resources in Spain

### The Spanish Germplasm and the World Olive Germplasm Bank (WOGB)

In 1970, within a cooperative Program with FAO, an International World Olive Germplasm Bank (WOGB) began to be established in Cordoba (Caballero et al., 2006). This initiative led to complete the systematic surveys and descriptions of the Spanish cultivars. The methodology of the survey and the morphological descriptions of Andalusia allowed a complete catalogue of the cultivars of the most important olive region of the world (Barranco and Rallo, 1984). Other similar works in Catalonia (Tous and Romero, 1993) and in Valencia (Iñíguez *et al.*, 2001) has been followed by a general Elaiographie of the Spanish cultivars (Barranco *et al.* 2005). As in many other olive-producing countries, plant material cultivated in Spain is characterized by the abundance of very old cultivars restricted to specific areas where they were originally cultivated. The diversity of cultivars - 262 cultivars with 501 varietal denominations have been identified in Spain (Barranco et al., 2005) - is due to their local origin and reduced pressure of selection by farmers throughout history. The limited spread of cultivars may have been due to difficulties involved in transporting the voluminous plant material required in traditional propagation procedures and the scant knowledge of the behaviour of cultivars in areas far from their place of origin.

The progressive use of molecular markers ( isozymes, RAPDs , AFLPs and SSRs ) supported the discriminating capacity of the morphological schedule used in the refered works and provide a more powerful tool that guarantee also the varietal identification of nursery produced plants (Rallo, P. *et al.*, 2000, Belaj *et al.* 2004; De la Rosa *et al.*, 2002; Trujillo *et al.*, 2005).

The use of morphological and molecular markers allowed also the genetic discriminations of the accessions at the WOGB (Trujillo et al., submitted). 824 trees, representing 499 accessions from 21 countries of origin were characterized by 33 SSRs markers and 11 morphological characteristics of endocarps. The accessions have shown 411 different SSR profiles and they correspond to 332 identified cultivars based on unique combinations of SSRs markers and endocarp morphologies, 201 were authenticated due to genotypic and phenotypic matches with authentic control samples, 28 cultivars did not match their respective authentic control samples, and 103 cultivars could not be authenticated because reference endocarp samples were not available. 130 SSR genotypes were considered molecular variants of 48 different cultivars and several pairs of cultivars present identical or very similar SSR profiles but different morphologies. A minimum set of 17 SSR markers was sufficient to

identify all of the cultivars. The history and the current state of the WOGB have been summarized (Caballero et al., 2006).

Two additional works have been undergone in the last years. A survey of ancient monumental olive and wild olive trees in Andalusia that were genotyped with 14 SSRs (Muñoz Díez, 2008) have evidenced that only 17% of cultivated genotypes were identified as known varieties, 32% was grafted mostly onto wild olives. Genetic analysis showed two major groups: cultivated and wild. The cultivated genotypes were associated between themselves according to their geographical origin, thus supporting the hypothesis of local selection and domestication of olive cultivars. In this work the author also genotyped wild trees from three different olive regions (Andalusia, Valencia and Cataluña) with the same SSRs. The observed pattern of genetic variation revealed differential clustering of wild and cultivated genotypes in the studied regions which points to autochthonous or allochthonous origin of the cultivated varieties accordingly. Higher variability was observed in wild than in cultivated olives and the tolerance to biotic and abiotic stress over the time strongly suggest the interest of wild olives for the current breeding programs.

The risk represented by the incidence of *Verticillium* in the field lead us to establish an isolated repository at the University of Córdoba with plants true to type and free from pathogens. We have propagated all the identified accessions of the WOGB. We are currently growing the rooted plants in containers with substrate free from pathogens, particularly from *Verticillium*, and testing them for trueness to type and for pathogen status of the genotypes before the plants are finally established in the repository. This material will be available for the scientific community and to the sector according to the international legal prescriptions.

### Selection works

In Spain, evaluation of agronomic and oleotechnic characters of both the World Olive Germplasm Bank of the IFAPA in Córdoba and the Catalanian Bank of Germplasm of the IRTA in Reus are in progress since more than 20 years. In many cases a common protocol was adopted. These studies were carried out by the confluence of multidisciplinary teams belonging to R+D institutions located close to the Germplasm Banks. These results have recently been summarized (Tous et al., 2005a). Since 1975 several works on clonal selection within different olive cultivars were carried out (Tous et al., 2005 b) or are still in progress. The erratic results of these works, the uncertainty on the genetic basis of the observed agronomic variability and the scarce diffusion and incidence on yield of the known virus diseases question the differential value of these selections in respect to standard material true to type of the same cultivars. However, these selections have promoted the certification of true to type and free from pathogens nursery plant material.

## Breeding programs in Spain

### The Juvenile Phase

The length of the Juvenile Phase has been the main impediment for breeding fruit trees (Hackett, 1985). The length of the Juvenile Phase is even longer in olive than in other fruit trees (Humanes et al., 1967; Natividade, 1954; Ruggini, 1990). Bellini (1993) found only 20% of flowering seedlings from crosses among different olive cultivars 12-13 years after germination. This delay has been a major factor for the very few olive breeding programs undergone along the 20<sup>th</sup> Century. Also very few studies were carried out to shorten the Juvenile Phase in olive (Lavee et al., 1996).

Several breeding programs are currently in development in Spain. The first systematic breeding program was initiated in Córdoba in 1990-91 (Rallo, 1995). Later on other programs carried out by

the University of Seville (Rallo, P et al., 2006), by Agromillora (Cunill et al, 2006), an important Catalanian nursery, and by the IRTA (Tous, Pers. Commun.) are on progress.

#### The Córdoba Breeding Program (Figure 4)

This programme has been jointly developed by the University of Córdoba and the IFAPA, the Andalusia Research Institute for Agriculture and Fisheries. The programme included both methodological and agronomic purposes. Shortening the juvenile period, the search of criteria for early selection and for simplifying the breeding protocol have been methodological aims pursued since the beginning of the program. The initial agronomic objectives included early bearing, high oil content, high levels of oleic acid, adaptation to mechanical harvesting and resistance to *Spilocaea oleagina* Hughes (Cast) (León et al. 2005). Currently two new objectives have been added: resistance to *Verticillium* wilt and reduction in vigour and compact habit of growth (Rallo and Barranco, 2006).

1. *Crosses*. The first crosses were carried out among 'Arbequina', 'Frantoio' and 'Picual' between 1991 and 1993. These three cultivars belong to three different olive growing areas: Catalonia in North-East Spain, Toscana in Italy and Jaén in Andalusia. They are productive varieties with high oil content, differing in other traits such as earliness of bearing and oil composition. Later on, between 1994 and 2006, up to 83 new crosses, including selfing and open pollination, have been carried out among more than 20 different genitors among which 'Koroneiki', 'Lechín de Sevilla', 'Manzanilla de Sevilla', 'Meski' and 'Zaity' and 'Arbosana'. In the last crosses we used also 'Sikitita' (Sin: 'Chiquitita' in USA), the first released cultivar of this programme (Rallo et al. 2008). Crosses were done bagging shoots of the female genitor several weeks before flowering and spraying pollen of the male genitors several times since the beginning of bloom in the female genitors. Since 2003 paternity test for verifying the male paternity were done.

2. *Forcing protocol to shorten the Juvenile Phase*. We followed a protocol of forcing growth similar to that proposed by Zimmerman for crab apple (1971). Santos-Antunes (1999) and Santos-Antunes et al. (2005) reported this methodology. In summary, naked seeds harvested by the beginning of November were stratified at 14°C in the dark for 45 days until emergence of the radicle and then grown at 20- 22 °C until expansion of the second pair of true leaves. Then the plantlets were placed in 9 L plastic bags with a mix of sand and peat moss (2:1) and placed in a greenhouse at 22°C in average under continuous light provided by metallic halogen lamps and drip fertirrigated. The seedlings stayed into the greenhouse until the plants reached more than 160 cm of height. During this time lateral shoots were pinching off when they were longer than 10cm. At this time the plants were placed into a lathouse until planted in the open field the following spring. The trees were planted at 1,5m distance between trees in a row and 4, 0 m between rows. The canopy was freely formed above 1,6m. This seedling forcing protocol has been able to produce flowering seedlings 28<sup>th</sup> months after germination with >93% of flowering trees 65 months after germination.

The different parents used influenced the length of the juvenile periods of the descendents ('Frantoio' > 'Picual' > 'Arbequina') in correspondence with the length of their unproductive periods in vegetative propagated plants. This protocol has recently being modified reducing the height of the canopy at 1, 00-1, 30 m that facilitate plant training without delaying flowering (Moreno- Alias, 2009). The new progenies proceeding from the crosses done after 1993 and in the program of breeding table olives in Sevilla (Rallo,P. et al., 2008) confirm the efficiency of the protocol described for shortening the Juvenile Phase.

3. *Early Selection.* Early selection is a very useful tool in breeding perennial fruit crops for reducing the number of genotypes during the Juvenile Phase and saving time, space and money in the breeding programs. Two recent works (De la Rosa et al., 2006; Rallo, P et al., 2008) indicate that the size of the progenies may be reduced in the greenhouse forcing stage according to the height of the seedlings as this trait is related to earliness of flowering. Selections of seedlings resistant to *Spilocaea oleagina* at the Juvenile Phase has also be done in our breeding program (Trapero, Pers. Comun.).

Also selection in the first years of bearing may save time and labour thus increasing breeding efficiency. Correlations among years for oil and oleic acid content indicate that data of two years for oil content and of only one year for oleic acid content may provide confident basis for early selection (León et al., 2004c, d).

4. *Variability of the progenies.* A common pattern of the evaluated progenies have been the large range of variability for any trait. The range of variability among genotypes within any cross bred progeny was always higher than the range of variability among cross bred progenies for the evaluated traits (León et al., 2004d, e). These results are in agreement the expected high degree of heterozigosity for the olive. Different studies with SSRs confirm this high heterozigosity of the cultivated olive (Rallo, P. et al., 2000; De la Rosa et al., 2002; Diaz et al., 2006 ) that is enlarged when wild olive populations are evaluated (Belaj et al., 2007, 2010; Muñoz Díez, 2008).

5. *Response to selection.* We have estimated heritability on the basis of repeatability among years for several evaluated traits (León et al., 2004 c, d). We observed differences among traits. Whereas some characters as for instance content in oleic acid showed high values other like crop load and relative humidity showed a low repeatability. On the other hand, the observed relation between the length of unproductive period of the genitors and the length of the Juvenile Phase of the corresponding progenies and more recent observations on vigour and habit of growth (Hammami, 2009) indicate the possibility for establishing selection criteria for different agronomic traits.

6. *Simplifying the selection process.* Field evaluation of progenies is a long and expensive process. The protocols used to shorten the Juvenile Phase and for early selection have represented useful tools for increasing the efficiency of our program. High correlations coefficients among different evaluated traits may also allow indirect selection reducing the characters to be recorded (León et al., 2004 b). The use of NIR spectrometry is very useful in the selection stage of breeding programs (Batten, 1998) as it provide quick, non destructive sampling and simultaneous analysis for many different characteristics. Since the evaluation of the first progenies we have used NIRS spectrometry for the simultaneous analysis of traits such relative humidity, oil content and fatty acid composition of our progenies (León et al., 2003 and 2004 a).

7. *Preselections, advanced selections and cultivars release.* The Joint Breeding Program of the University of Córdoba and the IFAPA include 10021 seedlings proceeding from 83 crosses and has yield up to date more than 400 preselections and 31 advanced selections. Several intermediate field evaluation plots including the preselections with four to eight replications and several comparative field trials including different advanced selections are on progress. In 2006 a new cultivar 'Sikitita' (sin: 'Chiquitita' in the USA), selected for Super- High-Density Hedgerow was released (Rallo et al. 2008) and it was commercialized since the end of 2009. Currently 9 Spanish nurseries and one Italian nursery propagate 'Sikitita'. Commercial orchards start bearing in 2012. A web site [www.sikitita.es](http://www.sikitita.es) informs on this new cultivar.

In summary, these results indicate the high chance of obtaining valuable genotypes in a vegetative propagated plant like olive through a cross breeding program within a reasonable time.

### Prospective and ongoing research

Olive growing is attending to a changing era in Spain. Since the crisis of the 1960's, Spain olive growing has been progressively moving from traditional olive plantations to new intensive olive orchards. In this paper the changes undergone by the Spanish olive growing has been summarized with particular attention to the genetic resources and its improvement.

The efforts carried out in the collection, conservation, evaluation and sustainable use of the genetic resources since the beginning of the 1970's allowed the progressive establishment of three Germplasm banks of cultivars. The first one initiated in Córdoba is known as World Olive Germplasm Bank (WOGB) include approximately 700 accessions from 21 countries (499 have already been identified by SSR and endocarps markers and correspond to 332 different cultivars) and two regional in Reus (Catalonia) with 98 genotypes and in Liria (Valencia) with 78 genotypes. Morphological and molecular characterization of these banks is advanced. Agronomical evaluation is also progressing. A program has been proposed for the establishing a network of *ex situ* and *in situ* banks. The *ex situ* bank system will include a reserve lathouse with the genotypes identified and free from the main pathogens. The establishment of core collection in different ecologies is also considered. The *in situ* banks will pay attention to singular olives and to populations of wild olives. This framework will provide up dated information through a permanently actualized Data Base.

Since the beginning of the 1990's a breeding program was initiated in Córdoba by the University and the current IFAPA. Later on several breeding programs have been also established in Seville and Catalonia. The breeding programs have allowed notable methodological progress, preselections and advanced selections and, up to date, a new cultivar for hedgerow orchards. A program on functional genomics has been initiated. All these activities herald the time of scientific breeding in olive. Currently resistance to *Verticillium* wilt and adaptation to new olive mechanized growing system are included as objectives in several breeding programs.

Finally the boom of the nursery industry has triggered a real and dramatic change in the varietal structure in Spain. Currently different regional certification programs of nursery plants are on development.

### Aknowledgements.

The author is deeply in debt with the fellows participating in the genetic resources and breeding programs in Spain.

### Literature Cited

- Alba, J. 2008. Elaboración de aceite de oliva virgen. p. 657-698. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). *El Cultivo del Olivo*. (6<sup>th</sup> ed.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Alvarado, M. 2008. Plagas. p. 509-594. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). *El Cultivo del Olivo*. (6<sup>th</sup> ed.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Barranco, D. and Rallo, L. 1984. *Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía*. MAPA and Junta de Andalucía. Madrid

- Barranco, D., Trujillo, I. and Rallo, L. 2005. Libro I. Elaiografía Hispanica. p. 45-231. In: L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Martín, J. Tous and I. Trujillo. (eds.). Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Batten, G.D. 1998. An appreciation of the contribution of NIR to agriculture. J. Near Infrared Spectroscopy 6: 105-114
- Belaj, A., Trujillo, I., Barranco, D. and Rallo L. 2004. Characterization and identification of Spanish olive germplasm by means of RAPD markers. HortScience 39 (2): 346-350
- Belaj, A., Muñoz-Díez, C., Baldoni, L., Porceddu, A., Barranco, D. and Satovic, Z. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from North-Western Mediterranean assessed by SSR markers. Annals of Botany 100 (3): 449-458.
- Belaj, A., Muñoz-Díez, C., Baldoni, L., Satovic, Z. and Barranco, D. 2010. Genetic diversity and relationship of wild and cultivated olives at regional level in Spain. Scientia Horticulturae 124: 323 - 330.
- Bellini, E. 1993. Variabilidad genética y heredabilidad de algunos caracteres en las plantas de semillas de olivo obtenidas por cruzamiento. Olivae 49:21-34.
- Bertolini, E., Olmos, A., López, M.M. and Cambra, M. 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. Phytopathology 93:286-292
- Caballero, J.M. and Del Río, C. 2008. Métodos de multiplicación. p. 93-126. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). El Cultivo del Olivo. (6<sup>th</sup> ed.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Caballero J.M., Del Río, C., Barranco, D. and Trujillo, I. 2006. The Olive World Germplasm Bank of Córdoba. Olea 26: 14-19
- Civantos, L. 2008. La Olivicultura en el Mundo y en España. p.17-36. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). El Cultivo del Olivo. (6<sup>th</sup> ed.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Consejería de Agricultura y Pesca, 2003. El Olivar Andaluz. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla
- Cunill, M., Durán, S., Mestre, M. and Bordas, M. 2006. Selección de variedades de olivo mejoradas adaptadas a condiciones de producción superintensiva. Comunicación. III Congreso de Mejora Genética de Plantas. Actas de Horticultura 45:183
- De la Rosa R., James C., Tobutt K.R. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleacea. Primer note. Mol. Ecol. Notes. 2: 265-267
- De la Rosa, R., Kiran, A.I., Barranco, D., León, L. 2006. Seedling vigour as a preselection criterion for short juvenile period in olive breeding. Australian Journal Agricultural Research 57:477-481.
- De la Rosa, R., León, L., Guerrero, N., Rallo, L. and Barranco, D. 2007. Australian Journal of Agricultural Research 58: 392-395.
- Díaz, A., De la Rosa, R., Martín, A. and Rallo, P. 2006. Development characterization and inheritance of new microsatellites in olive *Olea europaea* L. and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. Tree Genetics and Genome 2:165-175.
- Fereres, E. 1984. Variability in adaptative mechanisms to water deficits in annual and perennial crops plants. Bulletin Société Botanique de France. Actualités Botaniques 131:17-32.
- García-Ortiz, A., Humanes, J., Pastor, M., Morales, J. and Fernández A. 2008. Poda. p.389-433. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). El Cultivo del Olivo. (6<sup>th</sup> ed.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Hackett, W.P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. Hort. Rew. 7:109-115.

- Hammami, S. 2009. Parámetros de arquitectura y de crecimiento vegetativo de utilidad en la selección de nuevos cultivares de olivo. Tesis de master. Universidad de Córdoba.
- Humanes, J., Ferreira-Llamas, J. and Bolaños-Borrero, P. 1967. Selección de nuevas variedades de olivo. *Port. Acta Biol./Serie A/X (1/2)*: 185-194.
- Iñiguez, A., Paz, S. and Illa, F.J. 2001. Las variedades de olivo cultivadas en la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura, Peixa i Alimentació. Valencia.
- Lavee, S., Avidan, N., Haskal, A. and Ogradovich, A. 1996. Acortamiento del periodo juvenil en los plantones de olivo obtenidos de semillas. Un instrumento para la revalorización de la mejora genética. *Olivae* 60: 33-41.
- León, L., Rallo, L and Garrido, A. 2003. Análisis de aceituna intacta mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS): una herramienta de utilidad en programas de mejora de olivo. *Grasas y Aceites* 54: 41-47
- León, L., Garrido-Varo, A. and Downey, G. 2004a. Parent and harvest year effects on near-infrared reflectance spectroscopic analysis of olive (*Olea europaea* L.) fruit traits. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4957-4962.
- León, L., Martín, L.M. and Rallo, L. 2004b. Phenotypic correlations among agronomic traits in olive progenies. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129(2): 271-276.
- León, L., Martín, L.M. and Rallo, L. 2004c. Repeatability and minimum selection time for fatty acid composition in olive progenies. *HortScience* 39(3): 477-480.
- León, L., Rallo, L, Del Río, C. and Martín, L.M. 2004d. Variability and early selection on the seedling stage for agronomic traits in progenies from olive crosses. *Plant Breeding* 123: 73-78.
- León, L., Uceda, M., Jiménez, A., Martín, L.M. and Rallo, L. 2004e. Variability of fatty acid composition in olive (*Olea europaea*, L) progenies. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2(3): 353-359.
- León L., Santos-Antunes F., Martín L.M, Garrido A. and Rallo L. 2005. Obtención de nuevas variedades por cruzamientos. p. 407-420. In: L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C Del Río, A. Martín, J.Tous and I.Trujillo. (eds.). *Variedades de Olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa. Madrid
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Parrilla-Araujo, S. and Jiménez-Díaz, R.M. 2003. Simultaneous detection of the defoliating and non defoliating pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant. Dis.* 87:1487-1494
- Moreno-Alías, I. 2009. La Juvenilidad en un Programa de Mejora de Olivo. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba
- Moral, J., Viruega, J.R., Sánchez, M.I., Oliveira, R., Pastor, M. and Trapero, A. 2006 Influencia de las plantaciones superintensivas sobre las enfermedades del olivo. I Jornadas Grupo Olivicultura de la SECH. Córdoba. p. 36
- Muñoz-Díez, M.C. 2008. Prospección, diversidad genética y conservación de ejemplares monumentales y poblaciones silvestres de olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Navarro, C. and Parra, M.A. 2008. Plantación. p. 189-238. In D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). *El Cultivo del Olivo*. (6<sup>th</sup> ed.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Natividade, J.V. 1956. Juvenildade en *Olea europaea* L. *Agronomia Lusitanica* 19: 145-159.
- Pastor, M (ed.). 2005. *Cultivo del olivo con riego localizado*. Junta de Andalucía and Mundi- Prensa. Madrid.
- Rallo, L. 1986. En torno al olivar. Lección inaugural de Curso. Universidad de Córdoba
- Rallo, L. 1995. Selección y mejora genética del olivo en España. *Olivae* 59: 46-53
- Rallo, L. and Barranco, D. 2006. La mejora genética del olivo en España. p. 473-494. In: Llácer, G., Díez, M.J., Carrillo, J.M and, Badenes, M.L. (eds.). *Mejora genética de la calidad en las plantas*. SECH-SEG.

## Valencia

- Rallo, L., Barranco, D., De la Rosa, R. and León, L. 2008. 'Chiquitita' olive. *HortScience* 43:529-531
- Rallo, P., Dorado, G. and Martín, A. 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 984-989
- Rallo, P., Rodicio, A., Jiménez, R. and Suárez, M.P. 2006. Parámetros morfológicos y primera floración en progenies de olivo para aceituna de mesa. Congreso de Mejora Genética de Plantas. *Actas de Horticultura* 45:181
- Rallo, P., Rocio-Jiménez, A., Ordovás, J. and Suárez, M.P. 2008. Possible early selection of short juvenile period olive plants based on seedlings traits. *Australian Journal Agricultural Research* 59: 933-940
- Rejano, L. and Garrido, A. 2008. El aderezo de las aceitunas. p.729-776. In D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). *El Cultivo del Olivo*. (6<sup>th</sup> Edn.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Rugini, E. 1990. In vitro culture of the olive: An overview of the present scientific status. *Acta Hort.* 286: 93-96.
- Santos-Antunes, A.F. 1999. Acortamiento del periodo juvenil en olivo mediante técnicas de forzado y elección de genitores. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Santos-Antunes AF, León L, De la Rosa R, Alvarado J, Mohedo A, Trujillo I. and Rallo, L. 2005. The length of the juvenile period of olive seedlings as influenced by vigor and the choose of genitors. *HortScience* 40:1213-1215
- Tous, J. and Romero, A. 1993. Variedades de olivo. Fundación "La Caixa". Barcelona.
- Tous, J., Del Río, C., Caballero, J.M., Rallo, L. (eds.). 2005a. Libro II: Variabilidad y Selección. p. 233-404. In: L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Martín, J. Tous and I. Trujillo. (eds.). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Tous, J., Romero, A., Plana, J, Suarez, M. P., López Rivares, P. and Ordovás, J. 2005b. Selección clonal en variedades. p. 395-404. In: L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Martín, J. Tous and I. Trujillo (eds.). Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa. Madrid
- Tous, J., Romero, A. and Hermoso, J.F. 2006. The hedgerow system for olive growing. *Olea* 26: 20-26.
- Trapero, A. and Blanco, M.A. 2008. Enfermedades. p. 595-656. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.). *El Cultivo del Olivo*. (6<sup>th</sup> ed.). Mundi-Prensa and Junta de Andalucía. Madrid.
- Trujillo I, Morales, A., Valpuesta, V., Botella, M.A., Belaj, A., Rallo, P., Martín, A. and Dorado, G. 2005. Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. p. 431-450. In: L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Martín, J. Tous and I. Trujillo. (eds.). Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa. Madrid

Figure 1. Traditional low density (<100 trees/ha) rainfed orchards (A) are trained to maintain the canopy close to the ground (B and C) to enhance manual harvesting (D). Fig. 1D by courtesy of the family d'Abrunhosa).





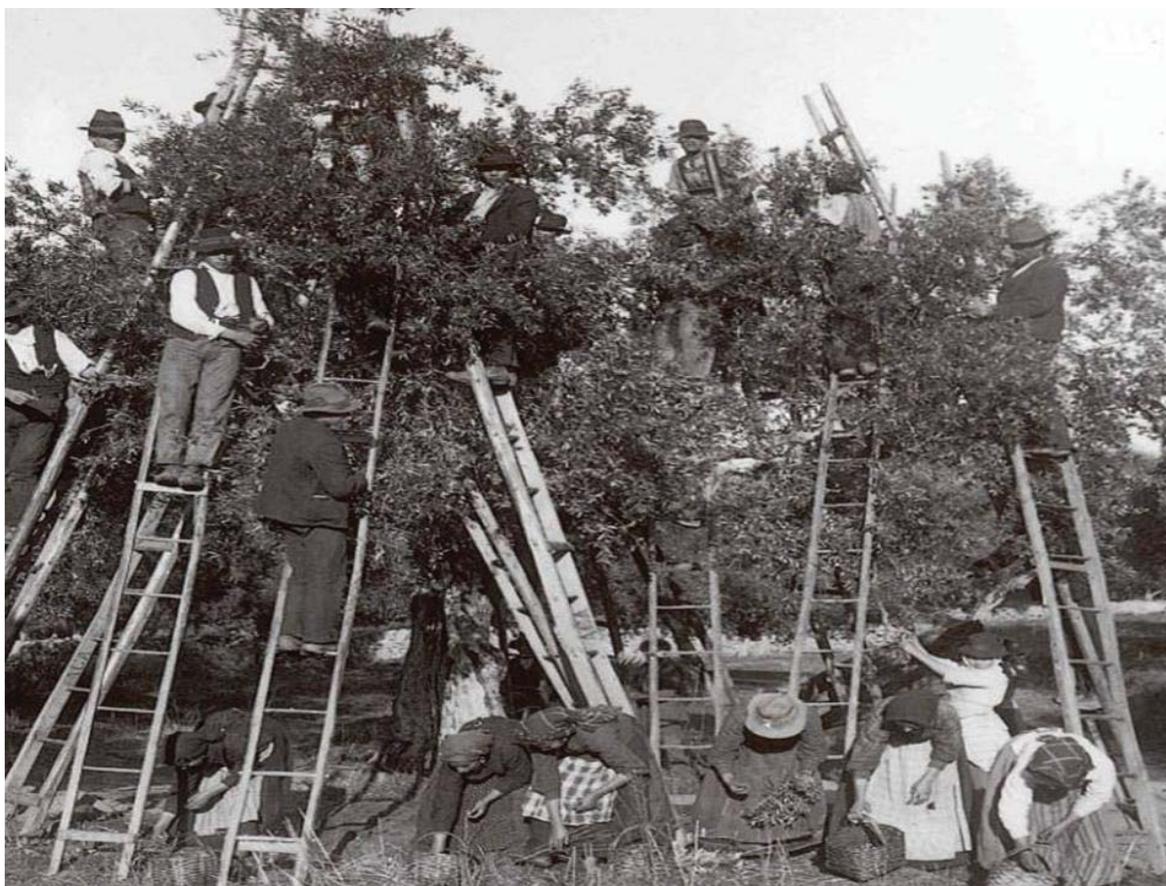
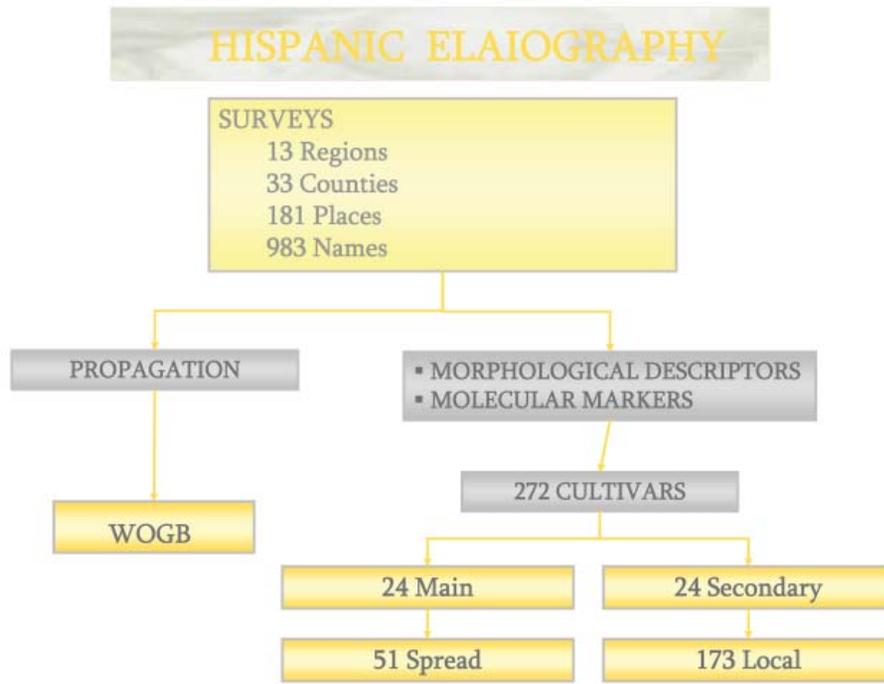


Figure2. Intensive irrigated (250-450 trees/ha) (A) and superintensive (>1,500 trees/ha) (B) have been designed for early and high yield and mechanical harvesting (C and D).





Figure3. The exploration of genetic resources (A) and their identification by morphological and molecular markers (B) have allowed the catalogue (C) of the Spanish cultivars. Currently an isolated repository (D) and field collections (E and F) insure the permanent conservation and evaluation of the cultivars in the World Olive Germplasm Bank of Córdoba

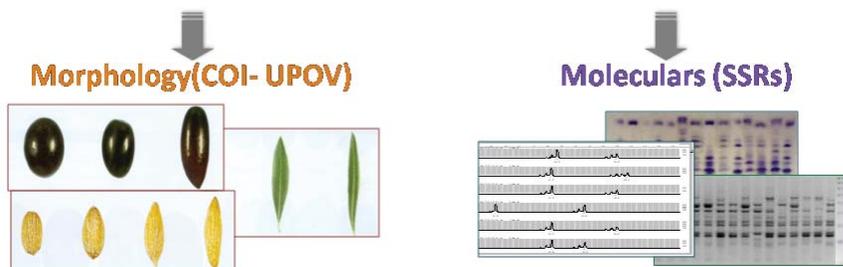


**CATALOGING**

**DIFICULTIES FOR IDENTIFICATION**

- Diversity of cultivars
- Generic denominations
  - Homonyms
  - Sinonyms

**Discriminant Methods**



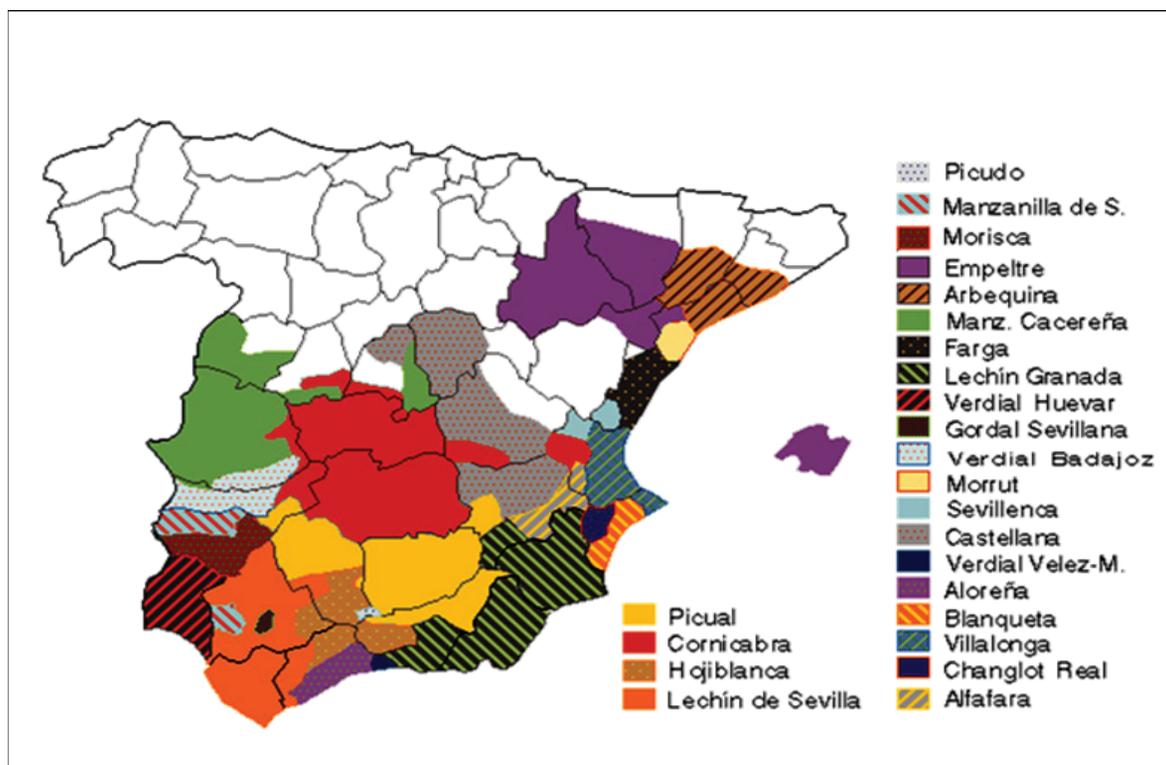
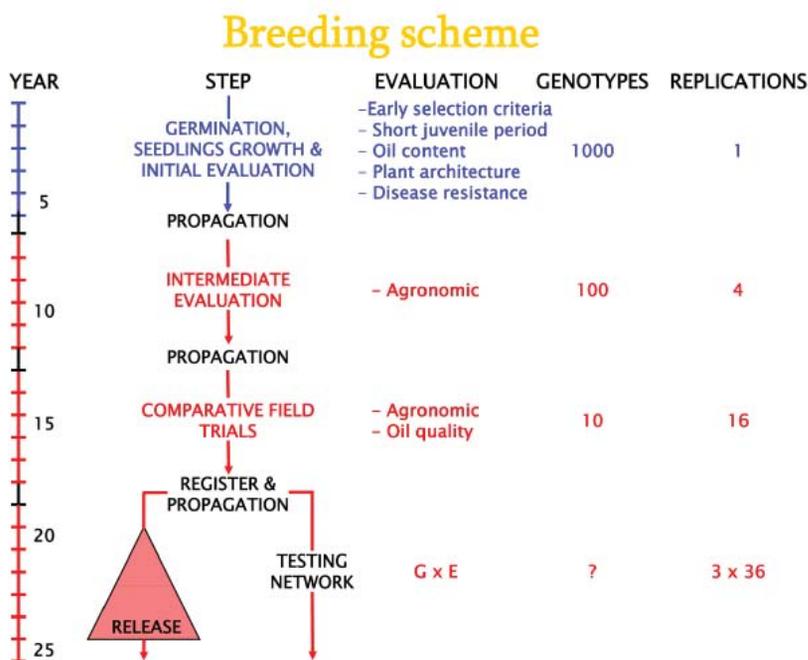
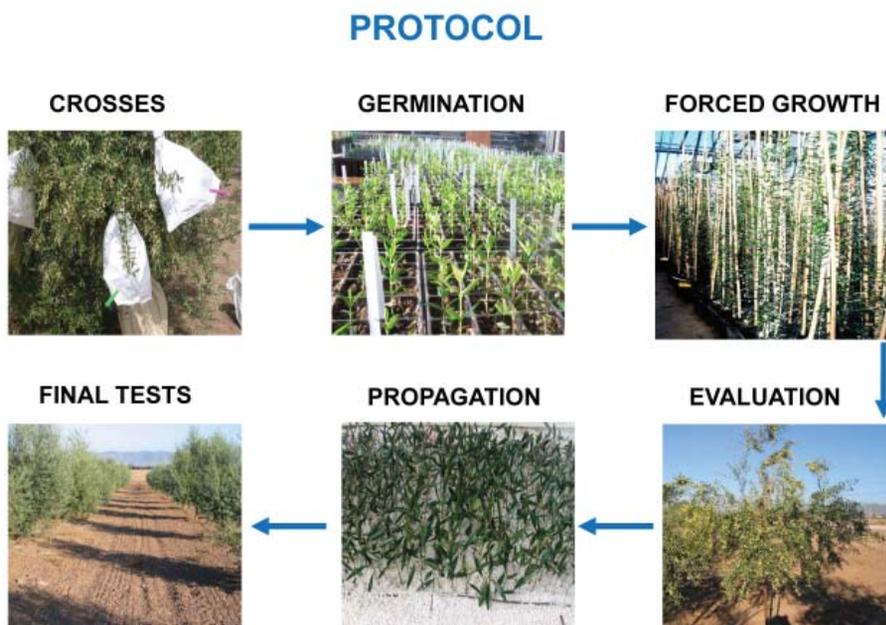


Figure4. Some cross-breeding programs are currently in progress in Spain. The protocol (A) and the calendar (B) of the Joint UCO-IFAPA Program led to release a new cultivar: 'Sikitita' selected for superintensive plantations (C) by its early bearing, low vigor and habit of growth. In (D), 'Sikitita' is on the left in comparison to 'Arbequina' (center) and 'Frantoio' (right).









# Caratterizzazione e valutazione del germoplasma di olivo in Campania

## C. Di Vaio\* e S. Nocerino

Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale  
Università degli Studi di Napoli Federico II  
Via Università 100, 80055 - Portici, Italy  
\*Email: divaio@unna.it

### Riassunto

L'olivicoltura campana, sia per le sue condizioni pedo-climatiche che per l'ampio patrimonio varietale, è in grado di produrre oli di spiccata tipicità. L'obiettivo del lavoro è stato di caratterizzare 20 cultivar appartenenti al patrimonio genetico campano, valutandone gli aspetti vegetativi e produttivi e le caratteristiche qualitative degli oli. Lo studio è stato condotto, negli anni 2003-2009, a Eboli (SA) presso una collezione varietale. Su 6 piante per cultivar sono stati condotti i seguenti rilievi: entrata in produzione, area della sezione del tronco, evoluzione della maturazione, contenuto in olio delle drupe. Sugli oli monovarietali, ottenuti mediante microestrattore, sono state condotte le seguenti analisi: composizione acidica, numero di perossidi, contenuto in polifenoli e profilo aromatico. Dalle analisi condotte sono emersi gruppi di cultivar affini, mentre altre si sono ben distinte dalle altre, mostrando un alto livello di diversità e tipicità.

**Parole chiave:** olivo, olio, gemoplasma, Campania.

### Characterization and Evaluation of Olive Germplasm in Campania

The olive cultivar from Campania region, thanks to its pedo-climatic conditions and to its large varietal heritage, is able to produce tipicity oils, each one significantly different from the other. The aim of this study was to characterize 20 cultivars belonging to genetic heritage of the Campania region, evaluating the vegetative and productive aspects and qualitative characteristics of oils. The study was conducted from 2003 to 2009, in Eboli (SA - Italy) into a collection varietal. On 6 plants per variety the following observations were carried out: entry into production, trunk cross section area, ripening, drupe oil content. The following analyses were carried out on the monovarietal oils, obtained by micro-extractor: acid composition, peroxides, polyphenol content and aromatic profile. Groups of similar cultivars emerged from the analysis, while other cultivars resulted well separated from each other, showing a high level of diversity and specificity.

**Keyword:** olive, oil, germplasm, Campania.

### Introduzione

Le cultivar autoctone di olivo rappresentano la strategia di punta per la valorizzazione commerciale degli oli extravergini italiani. La Campania, grazie alla sua eterogeneità orografica e bioclimatica, vanta un ricco patrimonio genetico di olivo, che ben si è adattato nel corso dei millenni ai differenti

agro-ecosistemi. Negli ultimi anni, pochi sono gli studi sul patrimonio genetico dell'olivo in Campania (Di Vaio, 2006; Pugliano, 2000; Sacchi et al., 1999). In tale contesto, l'obiettivo del presente lavoro è di completare la caratterizzazione bio-agronomica delle cultivar di olivo, in particolare di quelle fra le più diffuse del patrimonio genetico campano, valutandone comparativamente gli aspetti morfologici, vegetativi e produttivi.

L'indagine si è protratta per oltre otto anni e si è basata, oltre che sulla classica descrizione morfologica di tutti gli organi della pianta e delle principali fasi fenologiche (fioritura e maturazione), su osservazioni agronomiche di alcuni dei principali aspetti biologici ed agronomici (produttività, predisposizione all'alternanza, vigoria, biologia fiorale, ecc), nonché di alcune caratteristiche del materiale di propagazione. La valutazione delle cultivar è stata eseguita nell'ambito di un campo di conservazione di tipo *ex situ*, quindi, in condizioni di massima omogeneità di suolo, clima e delle tecniche di coltivazione.

## Materiali e Metodi

Lo studio è stato realizzato presso l'Azienda Agricola Sperimentale "Improsta" della Regione Campania, situata a Eboli (SA), dove nel 2001 è stato costituito un campo di conservazione del germoplasma di olivo della Campania. Nel campo sono presenti 20 cultivar autoctone: 4 della provincia di Avellino (Ravece, Ogliarola campana, Ritonnella e Ruveia), 5 della provincia di Benevento (Ortice, Ortolana, Pampagliosa, Femminella e Racioppella), 4 della provincia di Caserta (Asprinia, Caiazzana, Tenacella e Tonda) e 7 della provincia di Salerno (Biancolilla, Carpellese, Cornia, Oliva Bianca, Pisciotana, Rotondella e Salella). L'impianto è situato ad un'altitudine di pochi metri sul livello del mare, ha una giacitura pianeggiante e una tessitura franco-argillosa-limoso. Le piante sono allevate ad asse centrale e presentano un sesto d'impianto di 6 x 5 m (333 piante/Ha). L'impianto è condotto secondo le ordinarie tecniche colturali adottate per l'olivo in Campania. Tutte le osservazioni bio-agronomiche sono state condotte su 9 piante per cultivar, suddivise in tre blocchi da tre, selezionando quelle più rappresentative dell'oliveto, uniformi per sviluppo vegetativo ed attività produttiva e in ottimo stato sanitario, scartando quelle ai bordi del campo. I rilievi bio-agronomici sono stati effettuati annualmente a partire dal 2003 e si sono protratti fino al 2010. La caratterizzazione bio-morfologica delle 20 cultivar è stata condotta utilizzando la scheda U.P.O.V. con rilievi che si sono ripetuti nel triennio 2008-10.

## Risultati e Conclusioni

Alla fine del sesto anno dall'impianto, la produzione cumulata per pianta (Fig.1) indica chiaramente una più precoce entrata in fruttificazione della cultivar Carpellese (42.51 kg/pt) e Biancolilla (39.19 kg/pt) della provincia di Salerno, Ortolana (38.28 kg/pt) e Racioppella (37.73 kg/pt) per quella di Benevento. Le cultivar Rotondella (6.01 kg/pt), Ortice (8.20 kg/pt), Ritonnella (8.49 kg/pt) e Cornia (9.42 kg/pt), viceversa, sono risultate le cultivar più tardive nell'entrata in produzione e quindi caratterizzate da una minore produttività.

Per quanto concerne il comportamento vegetativo espresso mediante l'area della sezione del tronco (Fig.2), l'Asprinia (168.82 cm<sup>2</sup>) è risultata la più vigorosa, seguita dalla Carpellese (163.51 cm<sup>2</sup>), Pisciotana (116.18 cm<sup>2</sup>) e Tenacella (116.18 cm<sup>2</sup>). Le cultivar caratterizzate da una vigoria più contenuta sono state la Pampagliosa (37.32 cm<sup>2</sup>), l'Ortice (47.96 cm<sup>2</sup>), Racioppella (47.98 cm<sup>2</sup>) e la Ruveia (48.26 cm<sup>2</sup>).

Mettendo in relazione la produzione con la vigoria è stato possibile valutare le cultivar in termini di efficienza produttiva (kg/cm<sup>2</sup>). Sotto questo aspetto la Racioppella (0.71 kg/cm<sup>2</sup>), l'Oliva Bianca (0.59

kg/cm<sup>2</sup>) e la Pampagliosa (0.52 kg/cm<sup>2</sup>) si sono dimostrate le più efficienti, mentre l'Asprinia (0.04 kg/cm<sup>2</sup>), la Rotondella (0.07 kg/cm<sup>2</sup>) e la Cornia (0.09 kg/cm<sup>2</sup>) hanno mostrato un comportamento produttivo meno efficiente.

Per quanto riguarda le dimensioni del frutto (Fig.3), l'Ortolana (5.25 g), Ravece (4.56 g), Ortice (3.94 g) e Oliva Bianca (3.42 g) sono risultate le cultivar con un peso medio della drupa maggiore, mentre la Tenacella (1.19 g), Pisciotana (1.61 g) e Carpellese (2.06 g) si caratterizzano per una dimensione delle drupe molto inferiore.

Come si evidenzia in figura 4, l'epoca di fioritura presenta marcate differenze fra le cultivar studiate ed ha avuto inizio con una variabilità di circa 6-7 giorni tra i diversi genotipi. L'Ortice e la Ritonnella sono tra le cultivar più precoci a fiorire, mentre l'Oliva bianca e la Rotondella sono fra quelle più tardive.

Molto più diversificata è, invece, risultata la fenologia dell'invasatura (Fig.5). Le cultivar che hanno presentato una maturazione più precoce sono state Cornia Salella, Rotondella Ruveia e Caiazzana, mentre Biancolilla, Carpellese, Racioppella Pampagliosa e Tonda spiccano per una maturazione più tardiva.

L'indice di fertilità delle 20 cultivar campane di olivo, dato dal rapporto tra la percentuale di allegazione da autoimpollinazione e quella da impollinazione libera (Fig. 6) è risultato nettamente superiore in Racioppella (0.81), mentre tutte le altre cultivar hanno presentato un indice prossimo allo zero, indicando una scarsa autoimpollinazione. Di conseguenza tutte le cultivar sono tutte da ritenersi autosterili ad eccezione della Racioppella.

L'accumulo della sostanza grassa nelle drupe (Fig.7) è oscillato da un massimo di resa per le cultivar Carpellese (21.84% in peso fresco), Oliva Bianca (21.25% p.f.) e Pisciotana (21.04% p.f.) a un minimo fatto registrare dalle cultivar Cornia (12.53% p.f.) e Caiazzana (13.65% p.f.). Inoltre, come evidenziano le figure 8 e 9, la cultivar Salella si caratterizza per un anticipo dell'epoca di maturazione che alla data dell'1 ottobre era superiore a 5, e per l'incremento della cascola, che al rilievo del 15 ottobre era ben al di sopra del 50% dei frutti. Tale comportamento è molto diverso con quello della cultivar Pisciotana, che mostra, nello stesso periodo di rilevazione, fenomeni di cascola compresi tra 0-10%, raggiungendo valori massimi inferiori al 20% solo alla terza decade di dicembre. Un trend di maturazione differente si registra anche tra le cultivar del beneventano Ortolana e Racioppella: la prima mostra un anticipo dell'epoca di maturazione, che inizia alla data dell'8 novembre accompagnata da fenomeni di cascola più accentuati (alla data dell'ultimo rilievo è maggiore del 25%); la seconda, invece, è nettamente più tardiva nella invasatura delle drupe (Jaén pari a circa 4 al 20 dicembre) ma mostra fenomeni di cascola più contenuti (inferiore al 10% al 20 dicembre). I risultati sull'evoluzione della maturazione fortemente differenziati tra i genotipi, ottenuti nella medesima area, consentono una valutazione del comportamento varietale fornendo utili indicazioni per un appropriata scelta della cultivar e consentendo una previsione dell'epoca ottimale di raccolta.

L'analisi delle componenti principali (PCA, Fig.10) di tutti i parametri vegetativi e produttivi evidenzia una chiara separazione delle cultivar oggetto di studio, consentendo di raggruppare le cultivar con performance piuttosto simili. Di conseguenza, è possibile distinguere un primo gruppo costituito dalle cultivar Ogliarola campana, Tonda, Biancolilla, Ruveia e Oliva bianca che ben si caratterizza per un'elevata produttività, a cui si contrappone un secondo gruppo, costituito dalle cv. Ritonnella, Cornia e Rotondella, con una bassa produttività. Un terzo gruppo di cultivar, Pisciotana, Salella e Tonacella, si identifica per un'attività vegetativa superiore a tutte le altre. E' possibile, infine, definire un quarto gruppo costituito da Ortice, Pampagliosa, Ortolana e Femminella, che si distingue per un più alto peso medio delle drupe.

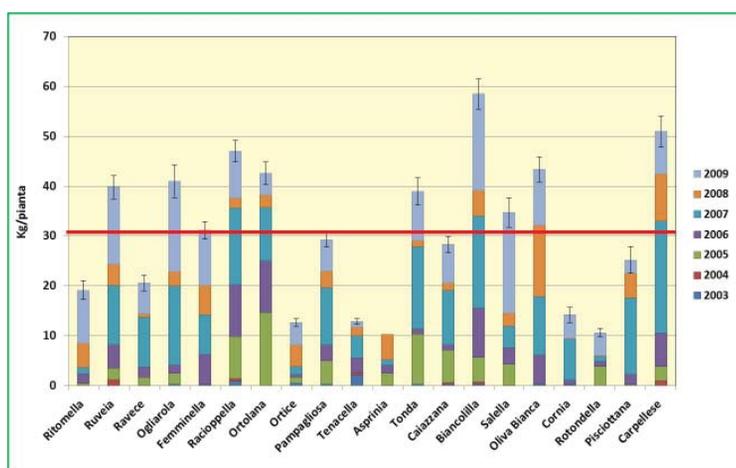
Nella tabella 1 è riportato un prospetto riassuntivo dei principali caratteri delle cultivar oggetto di studio. E' da sottolineare che la raccolta di tali informazioni è stata realizzata su cultivar coltivate tutte nelle stesse condizioni, soggette agli stessi fattori pedologici e climatici nonché sottoposte alle stesse pratiche agronomiche.

## Bibliografia

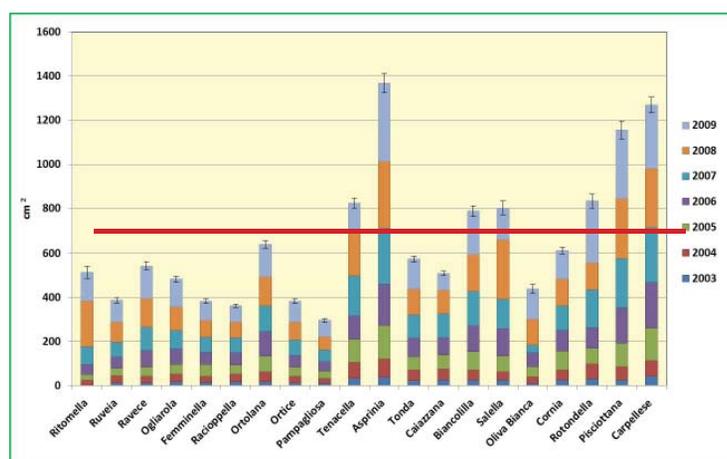
DI VAIO C., 2006. *Le cultivar di olivo autoctone della Campania: salvaguardia, valorizzazione e caratterizzazione*. Atti dell'Accademia dei Georgofili, VIII (3): 238-246.

PUGLIANO G., 2000. *La risorsa genetica dell'olivo in Campania*. STAPA - CEPICA, Regione Campania.

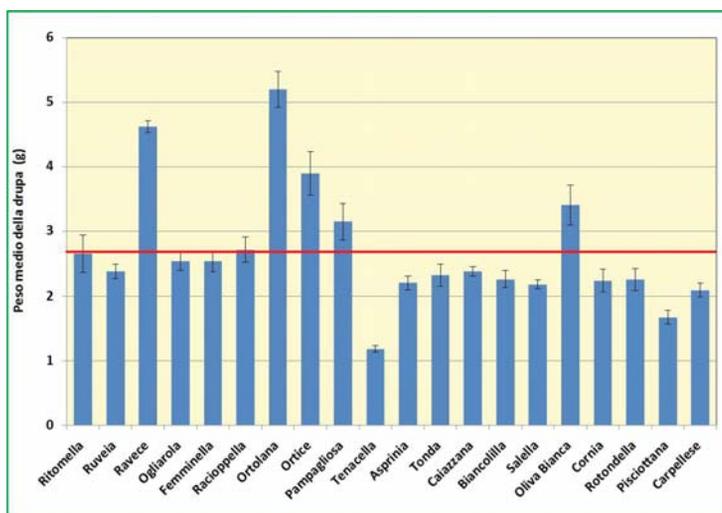
SACCHI R., AMBROSINO M. L., DELLA MEDAGLIA D., PADUANO A., SPAGNA MUSSO S., 1999. *Gli oli della Campania*. Regione Campania.



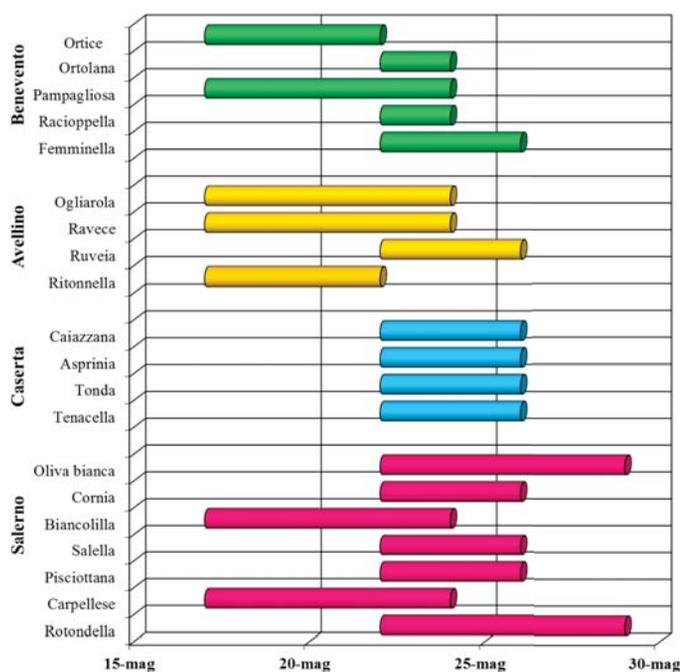
**Figura 1:** Produzioni annue e cumulate (kg/pianta) dei primi 7 anni dall'impianto (media  $\pm$  errore standard).



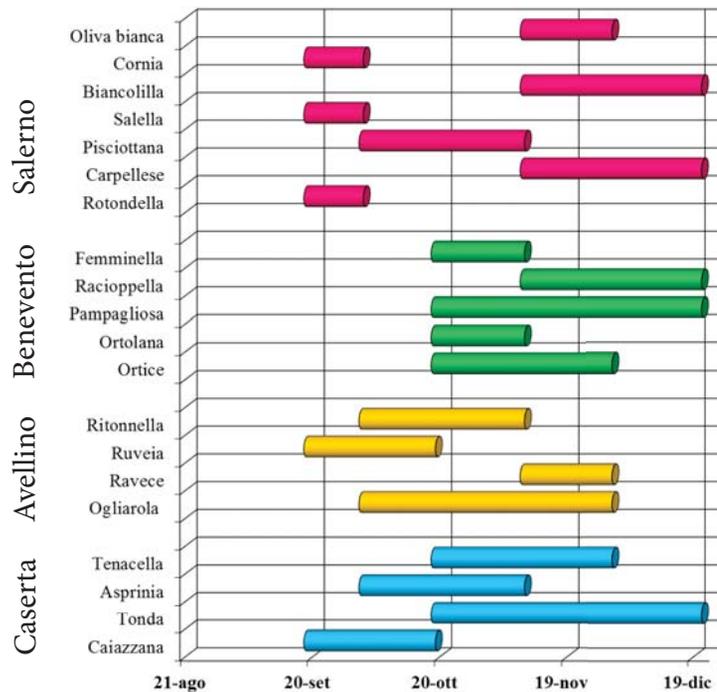
**Figura 2:** Incrementi dell'area della sezione del tronco (cm<sup>2</sup>) dei primi 7 anni dall'impianto (media  $\pm$  errore standard).



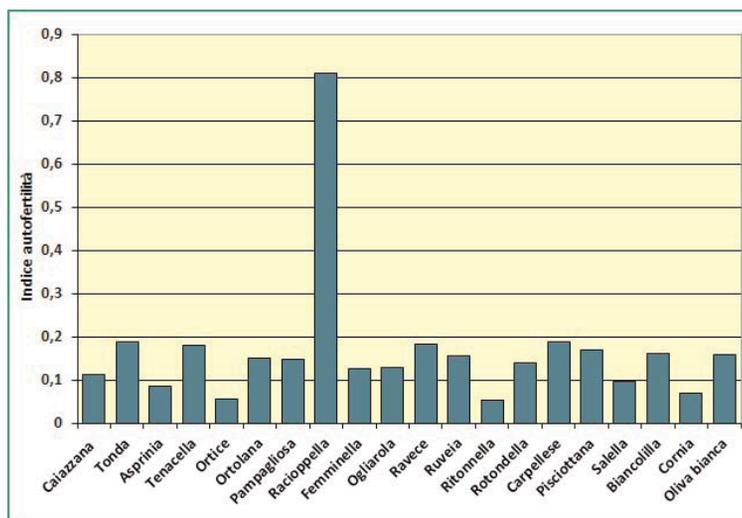
**Figura 3:** Peso medio delle drupe delle 20 cultivar di olivo del germoplasma autoctono campano (media  $\pm$  errore standard).



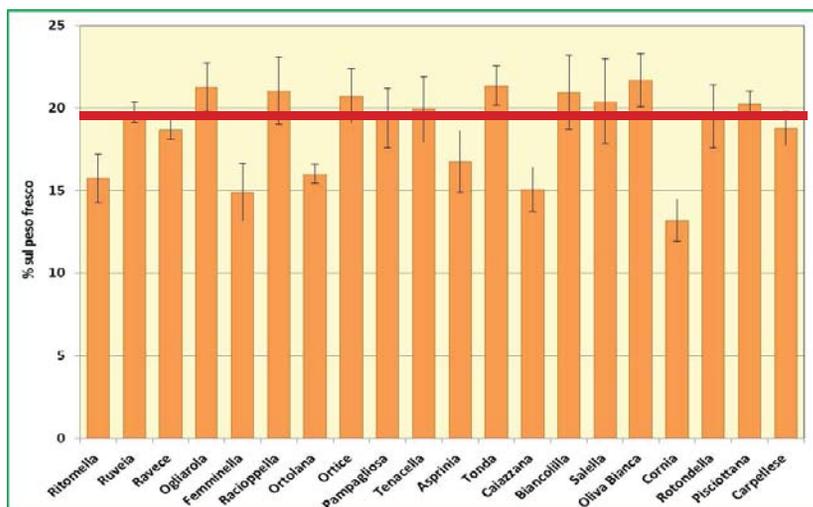
**Figura 4:** Fenogramma della fioritura delle 20 cultivar di olivo del germoplasma autoctono campano. Gli istogrammi indicano i giorni che intercorrono tra l'inizio e la piena fioritura (valori medi del periodo 2009-2010).



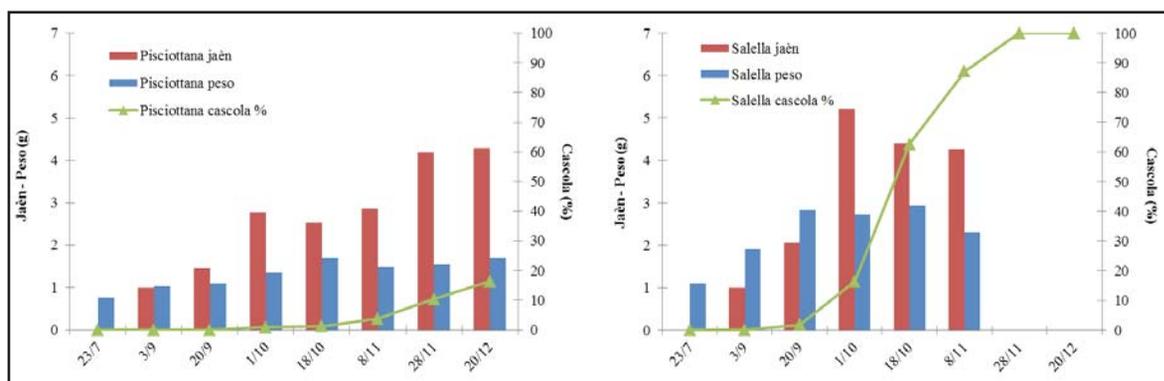
**Figura 5:** Fenogramma dell'invasiatura delle 20 cultivar di olivo del germoplasma autoctono campano, valutata mediante l'indice di Jaen. Gli istogrammi rappresentano i giorni che intercorrono tra l'inizio e la piena invasiatura (valori medi del periodo 2009-2010).



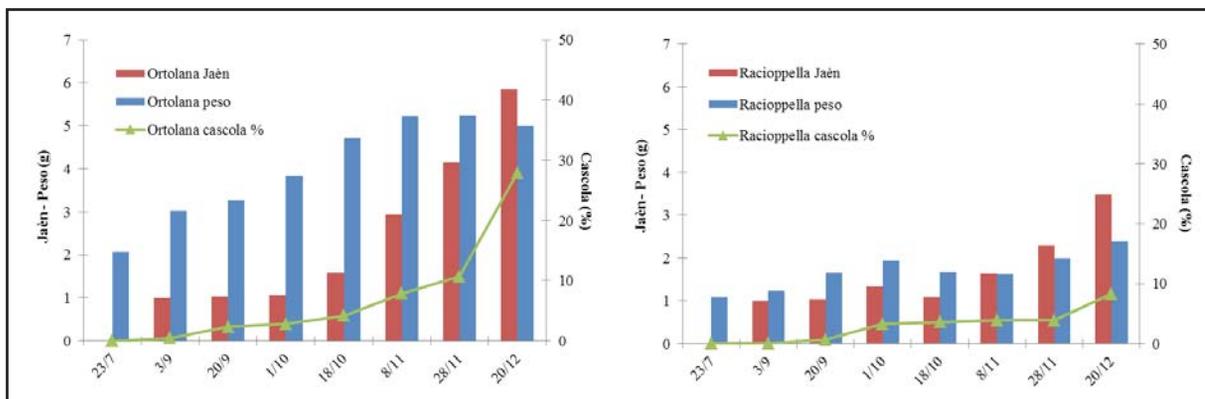
**Figura 6:** Indice di fertilità delle 20 cultivar di olivo del germoplasma autoctono campano, dato dal rapporto tra la percentuale di allegazione ottenuta da autoimpollinazione e quella da impollinazione libera (valori medi del periodo 2009-2010).



**Figura 7:** Contenuto in olio delle drupe alla raccolta delle 20 cultivar di olivo del germoplasma autoctono campano (media  $\pm$  errore standard).

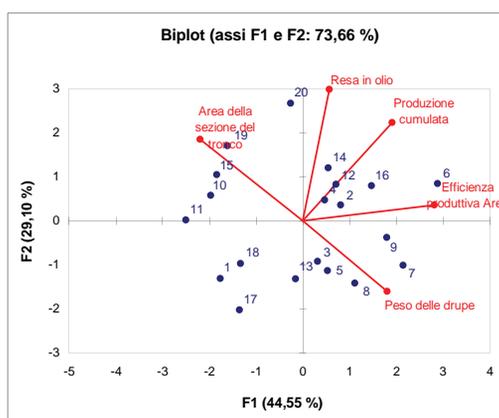


**Figura 8:** Evoluzione della cascola dei frutti (%), del peso delle drupe e della colorazione dell'epicarpo (Indice di Jaen 0-7) durante la maturazione delle cv. Pisciottana e Salella (media  $\pm$  errore standard).



**Figura 9:** Evoluzione della cascola dei frutti (%), del peso delle drupe e della colorazione dell'epicarpo (Indice di Jaen 0-7) durante la maturazione delle cv. Ortolana e Racioppella (media  $\pm$  errore standard).

- |              |    |
|--------------|----|
| Ritonnella   | 1  |
| Ruveia       | 2  |
| Ravece       | 3  |
| Ogliarola    | 4  |
| Femminella   | 5  |
| Racioppella  | 6  |
| Ortolana     | 7  |
| Ortice       | 8  |
| Pampagliosa  | 9  |
| Tenacella    | 10 |
| Asprinia     | 11 |
| Tonda        | 12 |
| Caiazzana    | 13 |
| Biancolilla  | 14 |
| Salella      | 15 |
| Oliva Bianca | 16 |
| Cornia       | 17 |
| Rotondella   | 18 |
| Pisciottana  | 19 |
| Carpellese   | 20 |



**Figura 10:** Analisi PCA (*Principal Component Analysis*) delle variabili bio-agronomiche relative alle cultivar oggetto di studio.

**Tabella 1:** Riepilogo delle principali caratteristiche bio-agronomiche delle 20 cultivar di olivo del germoplasma autoctono campano.

Varietà		Produzione pianta	Vigoria pianta	Produttività kg/cm <sup>2</sup>	Peso drupa	Resa in olio	Numero fiori/mignola	Epoca fioritura	Epoca invaiaitura	Autofertilità
Avellino	Ritonella	-	-	+	=	-	=	precoce	media	autosterile
	Ruveia	+	-	=	=	+	+	media	precoce	autosterile
	Ravece	-	-	-	+	=	=	media	tardiva	autosterile
	Ogliarola campana	+	-	=	=	+	=	media	media	autosterile
Benevento	Femminella	=	-	=	=	-	=	media	media	autosterile
	Racioppella	+	-	+	=	+	-	media	tardiva	autofertile
	Ortolana	+	=	=	+	-	+	precoce	media	autosterile
	Ortice	-	-	-	+	+	=	precoce	media	autosterile
Caserta	Pampagliosa	=	-	+	+	=	-	precoce	tardiva	autosterile
	Tenacella	-	=	-	-	+	+	media	media	autosterile
	Asprinia	-	+	-	=	-	=	media	media	autosterile
	Tonda	+	=	=	=	+	+	media	media	autosterile
Salerno	Caiazzana	=	-	=	=	-	=	media	precoce	autosterile
	Biancolilla	+	=	=	=	+	-	media	tardiva	autosterile
	Salella	=	=	=	=	+	=	media	precoce	autosterile
	Oliva Bianca	+	-	+	+	+	=	tardiva	media	autosterile
	Cornia	-	=	-	=	-	-	media	precoce	autosterile
	Rotondella	-	=	-	=	=	+	tardiva	precoce	autosterile
	Pisciottana	=	+	-	-	+	+	media	media	autosterile
Carpellese	+	+	-	=	=	-	media	tardiva	autosterile	

+ valore superiore alla media delle 20 cultivar; = valore prossimo alla media delle 20 cultivar;  
- valore inferiore alla media delle 20 cultivar.



# OLEA: il progetto per la genomica e il miglioramento genetico dell'olivo

R. Muleo\*, L. Baldoni\*\*, S. Zelasco\*\*\*

\* Università degli Studi della Tuscia - DAFNE, Viterbo

\*\*CNR - Istituto di Genetica Vegetale, Perugia

\*\*\* CRA-OLI - Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria olearia, Rende (CS)

## Riassunto

Nel progetto OLEA, finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali (DM. 27011/7643/10 del 30/11/2010), si svolgono attività di ricerca nell'ambito della genomica, miglioramento genetico e fisiologia dello sviluppo e della produzione dell'olivo (*Olea europaea* L.). Le attività di ricerca, articolate in 9 *work package*, impegnano 14 unità di ricerca su tutto il territorio nazionale, con competenze nei settori della genetica, genomica, breeding, fisiologia, biochimica e bioinformatica. I principali obiettivi sono: il sequenziamento del genoma della specie e l'identificazione dei trascrittomi di organi quali fiore, frutto, foglia e radice in differenti stadi fisiologici e dello sviluppo, per individuare i geni coinvolti nei processi biologici che influenzano la produzione e l'adattamento ai fattori ambientali. Al sequenziamento del genoma conseguiranno importanti ricadute per quanto riguarda l'annotazione dei geni e l'identificazione di nuovi marcatori. OLEA fornirà strumenti molecolari per attuare la valutazione funzionale delle varietà e di nuovi genotipi in selezione con un approccio multidisciplinare ed integrato. Nell'ambito del Progetto è prevista la costruzione di mappe genetiche su progenie da incrocio da impiegare sia per l'assemblaggio e l'allineamento del genoma che per l'individuazione di regioni QTL (Quantitative Trait Loci) responsabili di caratteri legati all'architettura della chioma, alla precocità di entrata in produzione, alla capacità di radicazione e alla resistenza ai patogeni. Lo studio quali-quantitativo di importanti metaboliti secondari nel frutto e in altri tessuti potrà chiarire le vie metaboliche e i meccanismi di regolazione dell'espressione genica che sottendono la sintesi di questi composti. I nuovi marcatori prodotti potranno trovare impiego nella caratterizzazione del germoplasma, nella produzione di mappe genetiche e negli studi di associazione. Gli studi in corso produrranno conoscenze che aiuteranno a comprendere meglio la biologia della pianta, a migliorare l'efficienza del *breeding*, a orientare le tecniche colturali e la scelta varietale, valorizzando le risorse locali e la qualità globale del prodotto olio, fornendo strumenti che potranno essere impiegati per il miglioramento della qualità e per la tutela dell'olio italiano.

## Introduzione

L'obiettivo del progetto OLEA è lo studio della genomica e miglioramento genetico dell'olivo. Esso è strutturato in 10 *work package* (Figura 1). Il progetto persegue finalità di grande rilevanza per l'olivicoltura a livello nazionale e internazionale, quali quelle di:

- chiarire le basi genetiche e la struttura del genoma della specie *Olea europaea* L.;
- generare strumenti molecolari da impiegare nella valutazione funzionale delle varietà e di nuovi genotipi in selezione;
- produrre informazioni su aspetti biologici cardine della produzione (fertilità, aborto fiorale,

allegazione, resistenza agli insetti e ai patogeni, tolleranza al freddo, salinità, siccità e ad altri stress ambientali, accumulo di olio, sintesi di metaboliti secondari, ecc.);

- fornire conoscenze sulla regolazione dello sviluppo, dell'architettura della chioma e del sistema radicale, dei ritmi di accrescimento e del vigore della pianta;
- sviluppare strumenti molecolari e biochimici utili per la tracciabilità, la qualità e la sicurezza dell'olio di oliva.

Le conoscenze generate dalle attività di ricerca permetteranno di conseguire anche altri obiettivi di interesse per le regioni olivicole italiane. Il progetto OLEA, infatti, riconosce come propri gli obiettivi del Piano Olivicolo Nazionale, condividendone le politiche regionali di tipicità e qualità degli oli di oliva, al fine di valorizzare la molteplicità delle olivicolture presenti nelle diverse regioni e la multifunzionalità della coltura. Il progetto OLEA ha tra i suoi obiettivi anche quelli di produrre e selezionare nuovi portinnesti da impiegare nel controllo della vigoria e dello sviluppo delle varietà autoctone, di indurre resistenza alla verticillosi, tolleranza alla salinità, al freddo, alla siccità e ai terreni anomali.

- Le Unità di Ricerca (UR) coinvolte sono 15, appartenenti a diverse istituzioni di ricerca e universitarie (Tabella 1). L'insieme delle UR rappresenta la ricerca più avanzata in Italia e a livello internazionale sia nell'ambito prettamente olivicolo che per i settori della genomica strutturale e funzionale e della bioinformatica.

## Il sequenziamento del genoma

Questa attività è coordinata dall'IGA di Udine (UR IGA), con la collaborazione della Fondazione Edmund Mach (UR IASMA) e dell'Università di Pisa - DBPA (UR UNIPD-DBPA).

L'elevato livello di eterozigosi e la dimensione del genoma dell'olivo ( $2n = 2x = 46$ ), stimata in un range compreso tra 2,90 pg/2C e 3,07 pg/2C, con un numero di basi 1C = 1.400-1.500 Mbp, rendono il sequenziamento del genoma piuttosto complicato e difficile. Il genotipo scelto per il sequenziamento è la cv. Leccino e la strategia perseguita associa alle tecnologie *Next Generation Sequencing* (NGS) la combinazione di approcci diversi di assemblaggio delle *reads*. L'approccio *Whole Genome Shotgun* (WGS) prevede il sequenziamento con Illumina e Roche-454 ed il successivo assemblaggio delle *reads*, delle *paired end reads* e delle *mate pairs*, fino a raggiungere una copertura del genoma di almeno 40 genomi equivalenti (Muleo et al., 2012). Un approccio *BAC pooling* è utilizzato per consentire l'assemblaggio della sequenza, riducendo il problema rappresentato dall'elevata eterozigosi. L'approccio WGS offre il vantaggio di un copertura più completa e omogenea dell'intero genoma. Le sequenze generate dal WGS e dal *pool* di BAC saranno assemblate utilizzando algoritmi appropriati. L'assemblaggio sarà infine ancorato alla mappa genetica.

Le attività di sequenziamento del genoma potranno venire integrate dai risultati ottenuti dalle attività svolte nel WP3 dall'ENEA di Trisaia (UR ENEA), che prevede il sequenziamento ad alta densità dei geni espressi sotto forma di EST (*Expressed Sequence Tags*) e da quelle di mappatura genetica.

## L'analisi bioinformatica e la gestione dei dati

Le attività del WP5 relative alla piattaforma bioinformatica, coordinate dall'Università di Padova - CRIBI (UR UNIPD-CRIBI), sono finalizzate ad analizzare i dati della sequenza genomica per la predizione della struttura dei geni, per la loro annotazione, per consentire l'organizzazione e l'accesso ai dati, anche attraverso la realizzazione di un portale web ([www.oleagenome.org](http://www.oleagenome.org)) con

un'area informativa ad accesso pubblico e un'area privata per lo scambio dei dati e dell'informazione tra le unità di ricerca impegnate nel progetto.

La predizione genica identifica i geni presenti nella sequenza genoma e permette di comprendere la storia evolutiva e la biologia della specie. L'annotazione funzionale assegna ai geni predetti una funzione biologica o un ruolo metabolico, ed è eseguita con un processo di similarità di sequenza inter-specie, assumendo che regioni altamente conservate in specie diverse mantengano le stesse funzioni.

I dati genomici ottenuti nella fase di predizione e annotazione saranno raccolti in opportuni database per il loro successivo utilizzo da parte degli utenti finali tramite opportune interfacce e pagine web. L'area privata del sito del progetto contiene tra l'altro i dati dell'assemblaggio genomico effettuato dai gruppi coinvolti nel sequenziamento.

### Mappatura genetica e breeding

Una progenie di 180 individui (F1), generata da un incrocio intervarietale, realizzata dal CNR - Istituto di Genetica Vegetale di Perugia (UR CNR-IGV), è impiegata per la costruzione di una mappa genetica ed analisi QTL per individuare geni e/o regioni cromosomiche coinvolte nella vigoria e portamento della pianta, capacità di radicazione, precocità di ingresso in produzione e resistenza ai patogeni. Le piante sono allevate in campo ed hanno cominciato ad uscire dalla fase giovanile e a fruttificare al 3° anno dall'impianto. Sono in corso rilievi sui parametri della crescita (dimensioni del tronco e della chioma), sul portamento (angolo di inserzione delle branche e dei rami), sulla densità della chioma (numero complessivo di branche e di rami), sul grado di evoluzione verso la fase matura (numero di mignole, altezza e lunghezza complessiva dei rami a fiore), sulla fruttificazione (numero e dimensioni dei frutti, resa in olio). Sugli individui è in corso l'analisi molecolare per la costruzione di una mappa che contribuirà all'allineamento delle sequenze genomiche e all'associazione dei tratti quantitativi legati ai caratteri menzionati.

Programmi di incroci intervarietali sono stati avviati dall'UR UNITUS e dalla UR CNR-IGV per generare genotipi con ridotta vigoria e alta qualità dell'olio, e per lo studio dell'architettura della chioma. Inoltre, presso l'UR UNITUS è stato effettuato un incrocio tra Leccino *dwarf* x Leccino M3 per generare portinnesti in grado di ridurre la vigoria delle principali cultivar. Un'altra popolazione F1 da incrocio Leccino x Frantoio, composta da 90 piante è stata prodotta e sottoposta a selezione da parte della UR dell'Università di Bari - DIBCA (UR UNIBA).

### Studio della biologia florale

Nello studio della biologia florale sono coinvolti l'Università di Padova - DAFNAE (UR UNIPD-DAFNAE), l'Università della Tuscia - DAFNE (UR UNITUS) e l'UR CNR-IGV. L'olivo è una specie parzialmente compatibile, con una frequenza alta di aborto ovarico ed una conseguente bassa allegazione. Gli obiettivi della ricerca sono molteplici e includono quelli l'analisi delle basi genetiche dell'induzione e dello sviluppo del fiore, dell'auto- e inter-incompatibilità e dell'allegazione. In merito all'auto-incompatibilità le indagini hanno riguardato l'identificazione di componenti del sistema di auto-incompatibilità sporofitico (SSI), controllato dai determinanti femminili SRK (*S-locus receptor kinase*) e SLG (*S-locus glycoprotein*), espressi nello stigma, e da un determinante maschile SCR (*S-locus cysteine-rich protein*), espresso nel polline. Sono state effettuate analisi citologiche su un vasto pool di granuli e tubetti pollinici di una varietà auto-compatibile e di altre auto-incompatibili, per evidenziare il grado di penetrazione dei tubetti pollinici nello stigma. Le analisi bioinformatiche dei

domini proteici e degli allineamenti delle sequenze nucleotidiche hanno permesso la selezione di sequenze putative per i tre geni SLG, SRK e SCR. Sono stati effettuati studi di espressione genica su campioni estratti da fiori di varietà auto-compatibili ed auto-incompatibili in diverse fasi del processo di fecondazione. Le informazioni acquisite consentiranno di stabilire i gruppi di auto-incompatibilità ed inter-compatibilità in olivo e di classificare le varietà. Queste informazioni potranno fornire indicazioni di fondamentale importanza per la scelta varietale nei nuovi impianti.

Due librerie sottrattive ottenute presso l'UR UNITUS da campioni della cv. Leccino a diversi stadi di sviluppo del fiore antecedenti l'antesi sono state costruite per l'identificazione di un ampio repertorio di geni coinvolti nella regolazione dello sviluppo degli organi del fiore, consentendo di ottenere oltre 1.000 ESTs. L'annotazione dei *contig* e dei *singleton* identificati con i tre principali vocabolari di ontologia genica, ha evidenziato la presenza di geni correlati con il metabolismo dei carboidrati, con quello energetico e fotosintetico, e con i sistemi di regolazione post-traduzionale. L'analisi trascrizionale di alcuni di questi geni è stata poi approfondita utilizzando la qRT-PCR su campioni raccolti in un intervallo di tempo più ampio, considerando, oltre alla cultivar Leccino, anche Dolce Agogia, che è caratterizzata da una elevata incidenza del fenomeno dell'aborto dell'ovario. Per quanto riguarda il metabolismo dei carboidrati è stata evidenziata una correlazione inversa tra il livello dei trascritti della saccarosio sintasi e la presenza di fiori ermafroditi, i quali sono caratterizzati da numerosi granuli di amido, abbondanti in Leccino ma scarsi in Dolce Agogia. È stato trovato un alto livello di trascritti dei geni codificanti gli enzimi idrolitici,  $\beta$ -glucosidasi e mannosidasi, indicando un rapido turnover dei polisaccaridi di membrana. Questo risultato è atteso nei tessuti degli organi del fiore che sono in continuo accrescimento e cambiamento funzionale; inoltre, l'azione di questi enzimi libera zuccheri semplici utilizzabili per la produzione di energia o possono influire sul potenziale osmotico delle cellule, determinando l'aumento di turgore che si realizza al momento della fioritura. Interessante è risultato il profilo trascrizionale di una ATPasi mitocondriale espressa a livelli elevati soprattutto nei campioni di Leccino, che potrebbe sostenere lo sviluppo di un numero elevato di fiori perfetti caratteristici di questa cultivar, in accordo con le osservazioni effettuate precedentemente con esperimenti di ibridazione *in situ*. L'espressione del gene che codifica per la subunità piccola della RuBisCO è down-regolata durante lo sviluppo del fiore, confermando che il fiore è un organo essenzialmente eterotrofo e deve importare i carboidrati per il suo sviluppo. Diversi trascritti che codificano per proteine del complesso ubiquitina/proteosoma 26S sono stati trovati diversamente espressi, indicando che questo complesso, che interviene nei meccanismi di regolazione post-traduzionale, ha un ruolo chiave nei diversi stadi dello sviluppo e identità degli organi fiorali, soggetti a stimoli ormonali, fotomorfogenici, ritmi circadiani e vernalizzazione. Il profilo di espressione del gene codificante la E3 ubiquitina ligasi è risultato maggiormente espresso nella cultivar Dolce Agogia, ma down-regolato durante il decorso dello sviluppo del fiore.

Il repertorio di trascritti è stato significativamente implementato attraverso la costruzione di librerie *shotgun* con la tecnica del pirosequenziamento 454 Roche da campioni di Leccino, Frantoio e Dolce Agogia dalla unità operativa dell'UR ENEA in collaborazione con le UR UNITUS, UNIPD-DAFNAE e CNR-IGV. Il sequenziamento ha prodotto oltre 450.000 *reads* ed è stato generato un database con oltre 100.000 geni espressi dei quali 56.000 sono stati annotati. Per una caratterizzazione estesa dei profili di espressione genica è stato progettato, ed è al momento in corso di produzione, un *microarray* ad alta densità. L'analisi delle librerie ottenute evidenzia la presenza di sequenze con elevata similarità per numerosi fattori di regolazione trascrizionale (MADS-box e MYBs) il cui ruolo verrà valutato nello sviluppo del lavoro.

## Studi sulla tolleranza agli stress biotici e abiotici

### *Studi di tolleranza a *Bactrocera oleae**

*Bactrocera oleae* è il principale predatore delle drupe dell'olivo, il progetto OLEA si pone l'obiettivo di chiarire i meccanismi molecolari che intercorrono nel rapporto drupa-predatore durante l'attacco di quest'ultimo per comprendere e definire la resistenza della pianta. L'UR UNINA ha costruito una libreria sottrattiva di cDNA da drupe della cv. Moraiolo sane e attaccate dalla mosca per identificare geni preferenzialmente espressi a seguito dell'attacco. Gli unigenes identificati sono stati successivamente annotati. Tra le sequenze annotate sono state individuate delle EST omologhe a quelle descritte in altre specie vegetali, che sono coinvolte nella difesa della pianta da stress biotici, quali chitinasi, glucanasi ed inibitori di proteasi. L'analisi bioinformatica, quindi, ha permesso la selezione dei trascritti putativamente coinvolti nella risposta molecolare di difesa delle piante agli stress biotici. In drupe attaccate e non attaccate dal predatore, l'analisi quantitativa mediante qRT-PCR dell'espressione di alcuni trascritti individuati ha confermato la sovra-espressione in seguito all'attacco della drupa (Corrado et al., 2012).

È stata in seguito costruita una libreria di trascritti ad alta densità, basata sulla tecnologia 454 (Roche) utilizzando drupe danneggiate e non danneggiate delle cv. Ortice e Ruveia (UR ENEA, UNINA e CNR-IGV). Il sequenziamento ha prodotto quasi 700.000 *reads*, costituendo un repertorio completo di circa 88.000 geni. I geni espressi sono stati annotati ed è stata effettuata la classificazione funzionale.

### *Studi di tolleranza a *Verticillium dahliae**

L'obiettivo di questa ricerca è quello di comprendere le basi genetiche della risposta all'infezione di patotipi di *Verticillium dahliae* in olivo. Gli studi impiegano approcci ultrastrutturali, metabolomici e molecolari e sono condotti dal CRA - Centro per la Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia di Rende (UR CRA-OLI) sulle cv. Arbequina, Arbosana, Frantoio, Ottobratica, Sant Agostino e Urano, sottoposti all'infezione con 4 ceppi non defoglianti (ND) e 1 ceppo defogliante (D) di *V. dahliae*. Le infezioni sono state condotte con la tecnica della ferita praticata su piante allevate in vaso, tenute in osservazione per circa un anno, e con la tecnica della talea autoradicata. Le piante delle cv. Frantoio e Urano sono risultate tolleranti ai 5 ceppi del patogeno, mentre quelle delle altre cultivar sono risultate suscettibili ad almeno un ceppo. Talee autoradicate delle cv. Leccino e Dolce Agogia sono state inoculate per immersione dell'apparato radicale nella sospensione del ceppo defogliante di *V. dahliae*. Dal tessuto infetto sono state preparate librerie cDNA da sottoporre ad RNAseq. Tessuti delle talee radicate delle due cultivar in prova sono stati campionati per un'analisi preliminare dei biofenoli presenti in fusto, con la tecnica LC-MS/MS utilizzando come interfaccia la ionizzazione elettrospray (ESI) e per la spettrometria di massa lo strumento API 4000 QTRAP (AB Sciex Instrument). Negli estratti sono state identificate le varie forme tautomeriche dell'oleuropeina aglicone, il verbascoside, l'estere eterosidico di acido caffeico e l'idrossitirosolo. I risultati indicano che nelle talee di olivo sono presenti composti antiossidanti ad alto potere bioattivo. Inoltre, su campioni di fusto non infetti è stata messa a punto la tecnica per l'analisi ultrastrutturale condotta al microscopio elettronico a scansione (Philips XL 20 SEM). Non è stata osservata la presenza di gel e gomme sotto forma di granuli.

### *Studi sulla tolleranza al freddo*

L'olivo è considerato una specie poco resistente al freddo, anche se sono noti ecotipi che vivono ai margini degli areali idonei per la coltura. Il CRA - Centro di Ricerca per la Genomica e la Postgenomica Animale e Vegetale di Fiorenzuola D'Arda (UR CRA-GPG) conduce studi sulla risposta adattativa della specie al freddo al fine di individuare i geni implicati in questo tipo di risposta. Le sequenze geniche individuate saranno impiegate come strumenti molecolari nello screening sistematico

del germoplasma. L'approccio metodologico impiegato è quello del sequenziamento massivo del trascrittoma con la piattaforma GAIx Illumina di campioni estratti da piante esposte a stress da freddo di cultivar putativamente divergenti nella tolleranza al freddo. Sono stati oggetto di indagine i trascritti isolati sia durante l'acclimatamento al freddo (hardening), determinato esponendo le piante a temperature decrescenti fino a quelle di congelamento (5h a -3°C), sia durante il successivo recupero alla temperatura di 15/13°C. Dal sequenziamento del trascrittoma delle piante esposte allo stress sono stati ottenuti complessivamente circa 200 milioni di reads, della lunghezza media di circa 110 basi. I risultati confermano che anche in olivo sono presenti i fattori genetici regolanti la resistenza al freddo.

## Sviluppo di nuovi marcatori

L'informazione scaturita dal sequenziamento del genoma e dei trascrittomi, associata a quella prodotta dall'applicazione di nuove tecnologie di Next Generation e a sistemi quali quelli di Eco-TILLING e High Resolution Melting (HRM) (Muleo et al., 2009), consentiranno lo sviluppo di nuovi marcatori molecolari utili sia alla identificazione varietale sia per la costituzione di mappe genetiche. In questa prima parte di attività del progetto sono stati esaminati i geni codificanti il fitocromo A, la lupeol sintasi, la cicloartenol sintasi e la glicosil trasferasi, individuando complessivamente 38 nuovi SNPs, e l'insieme di SNP sviluppati è stato valutato su 23 cultivar di olivo. Per questi SNP la cv. Dolce Agogia risulta essere sempre omozigote, mentre Leccino è sempre eterozigote ad eccezione dello SNP della lupeol sintasi per il quale è omozigote. Il lavoro sta proseguendo sempre con lo stesso approccio su altri cinque geni. Gli SNP individuati sono stati utilizzati con successo per la genotizzazione di cultivar diffuse nel centro Italia.

Presso la UR CNR-IGV sono stati identificati 40 nuovi marcatori plastidiali (Mariotti et al., 2010) che sono stati impiegati per l'analisi di 185 varietà di olivo e diverse popolazioni di olivo selvatico e sottospecie affini all'olivo coltivato raccolti in tutto il bacino del Mediterraneo. Lo studio ha consentito di identificare 10 diversi clorotipi diffusi tra le varietà coltivate e altri 32 nelle forme affini e di stabilire l'origine filogenetica delle principali varietà italiane. I marcatori plastidiali SNP sono stati analizzati dalla UR UNITUS mediante analisi HRM, attraverso un approccio innovativo basato sullo studio delle cultivar raggruppate 4 per volta in modo da ridurre il numero di analisi effettuate. Inoltre sono stati individuati almeno due nuovi SNP e nuovi alleli per SNP caratterizzati precedentemente.

Sono stati identificati (UR CNR-IGV) polimorfismi sulle sequenze genomiche dei geni candidati per i determinanti maschili (SCR) e femminili (SRK e SLG) dell'auto-incompatibilità sporofitica. L'analisi in una popolazione da incrocio ha messo in evidenza che i 3 loci segregano in maniera indipendente.

L'UR UNIBA impiega la tecnologia dell'Eco TILLING per identificare e caratterizzare varianti alleliche naturali di geni funzionali. L'attività di ricerca ha riguardato lo studio del gene *fad7* in olivo, che codifica l'enzima  $\omega 3$  acido grasso desaturasi, responsabile della sintesi di acidi 16:3 e 18:3, ed inoltre è coinvolto in risposte di adattamento e tolleranza agli stress da freddo, alterando la consistenza delle membrane cellulari di diverse specie oleaginose. In olivo sono state identificate due sequenze EST corrispondenti ad un'isoforma plastidiale e ad una citosolica legata al reticolo endoplasmatico. Analisi bioinformatiche e diversi multi-allineamenti hanno confermato l'elevata omologia di sequenza delle due EST con le isoforme dell'enzima FAD7 ed hanno permesso di ipotizzare la sua struttura genica. L'analisi è stata estesa ad un set di cultivar con un diverso contenuto in acido linolenico (18:3) e una diversa tolleranza alle basse temperature, ed i risultati hanno evidenziato un differente livello di conservazione. Attraverso questa analisi è stato possibile ottenere una prima stima della percentuale di eterozigosi del gene tra le otto cultivar e la sua conservazione strutturale. In collaborazione con la

UR CRA-OLI sono stati condotti studi per individuare i varianti allelici di questo gene in 96 cultivar, rappresentative della variabilità genetica esistente in olivo. I varianti allelici individuati sono stati correlati ai dati fenotipici rilevati in precedenza (Sabetta et al., 2013).

È stata sviluppata una batteria di marcatori nucleari e plastidiali da impiegare per l'analisi molecolare degli oli di oliva (UR CNR-IGV) (Baldoni et al., 2012; Rossi et al., 2012). Sono in corso di identificazione nuovi marcatori SNP e SSR varietà-specifici, più idonei per la rilevazione della composizione varietale degli oli.

## Studi del metabolismo del frutto

L'obiettivo dello studio è quello di individuare la variabilità dei metaboliti nella drupa delle cultivar e degli olivi selvatici, al fine di comporre un profilo di composti, anche di interesse salutistico, da impiegare nell'identificazione e ottimizzazione della qualità organolettica delle varietà regionali di maggior pregio. Le indagini riguardano anche le attività enzimatiche della sintesi e della degradazione dei composti fenolici nel frutto e nell'olio vergine di oliva, e includono la valutazione dell'effetto dei fattori ambientali e colturali (ad esempio diversi regimi idrici) sul contenuto e composizione dei metaboliti secondari. Vengono valutati i meccanismi di regolazione di importanti processi metabolici legati alla qualità nel corso della maturazione, l'identificazione e caratterizzazione di geni coinvolti in importanti processi del metabolismo secondario, lo studio della cascola fisiologica (su genotipi con diversa attitudine) ed indotta (da specifici stress) dei frutticini, l'analisi dei trascritti e la valutazione del ruolo dei fattori ormonali nella modulazione del processo di abscissione.

La Scuola Superiore di Studi Universitari e Perfezionamento S. Anna di Pisa (UR SSSA) ha svolto un'indagine riguardante il metabolismo dei flavonoidi e l'analisi di espressione di alcuni geni coinvolti nella loro biosintesi nel corso dello sviluppo delle drupe, e in un secondo lavoro è stato preso in considerazione lo studio della risposta a stress idrici attraverso analisi metabolomiche delle drupe utilizzando il GC MS-TOF in collaborazione con il Genome Center della University of California (Davis). Al momento è stata individuata una serie di EST che putativamente codificano per gli enzimi polifenolossidasi,  $\beta$ -glucosidasi e perossidasi. L'analisi delle librerie ottenute ha evidenziato la presenza di sequenze con elevata similarità a fattori di regolazione trascrizionale (MADS-box e MYBs) il cui ruolo è accreditato, dai lavori condotti in altre specie e presenti in letteratura, nella regolazione dello sviluppo del frutto e della sintesi di diversi metaboliti secondari. Per quanto riguarda il metabolismo secondario dei frutti, sono stati identificati trascritti candidati per il metabolismo di diverse classi di composti, quali gli isoprenoidi, i secoiridoidi, i monoterpeni, i lignani e i verbascoside. In drupe di varietà ad alto e basso contenuto di polifenoli a diversi stadi di sviluppo, le analisi dei trascritti hanno mostrato la coerenza tra il profilo quantitativo dell'espressione e il contenuto dei corrispondenti composti. Per quanto riguarda l'approccio di metabolomica, sono state allestite analisi su materiale prelevato in prove di stress idrico in campo ed in vaso. Per la prova in vaso, tra i circa 250 metaboliti analizzati, sono stati individuati diversi composti differenzialmente regolati, responsabili delle proprietà antiossidanti dell'olio di oliva (diversi acidi fenolici, acido vanillico,  $\beta$ -sitosterolo). Cambiamenti significativi sono stati osservati per diversi acidi grassi che potrebbero influire sulla viscosità del prodotto. I risultati dello studio hanno mostrato che lo stress idrico modifica il contenuto di diversi metaboliti. La caratterizzazione funzionale di alcuni metaboliti differenzialmente regolati sarà effettuata mediante il confronto dello spettro di massa con quello noto di metaboliti del database BinBase del Genome Center (Metabolomics Facility, UC Davis, CA, USA). Nello studio in campo, 48 metaboliti su un totale di oltre 400 analizzati hanno mostrato variazioni significative in condizioni di stress idrico. Questi risultati dimostrano la possibilità di utilizzare le

tecniche metabolomiche affiancate a quelle trascrittomiche in un'ottica di "Systems Biology" per la caratterizzazione delle diverse varietà in relazione a diverse condizioni e tecniche agronomiche e caratteristiche climatiche dei siti di coltivazione.

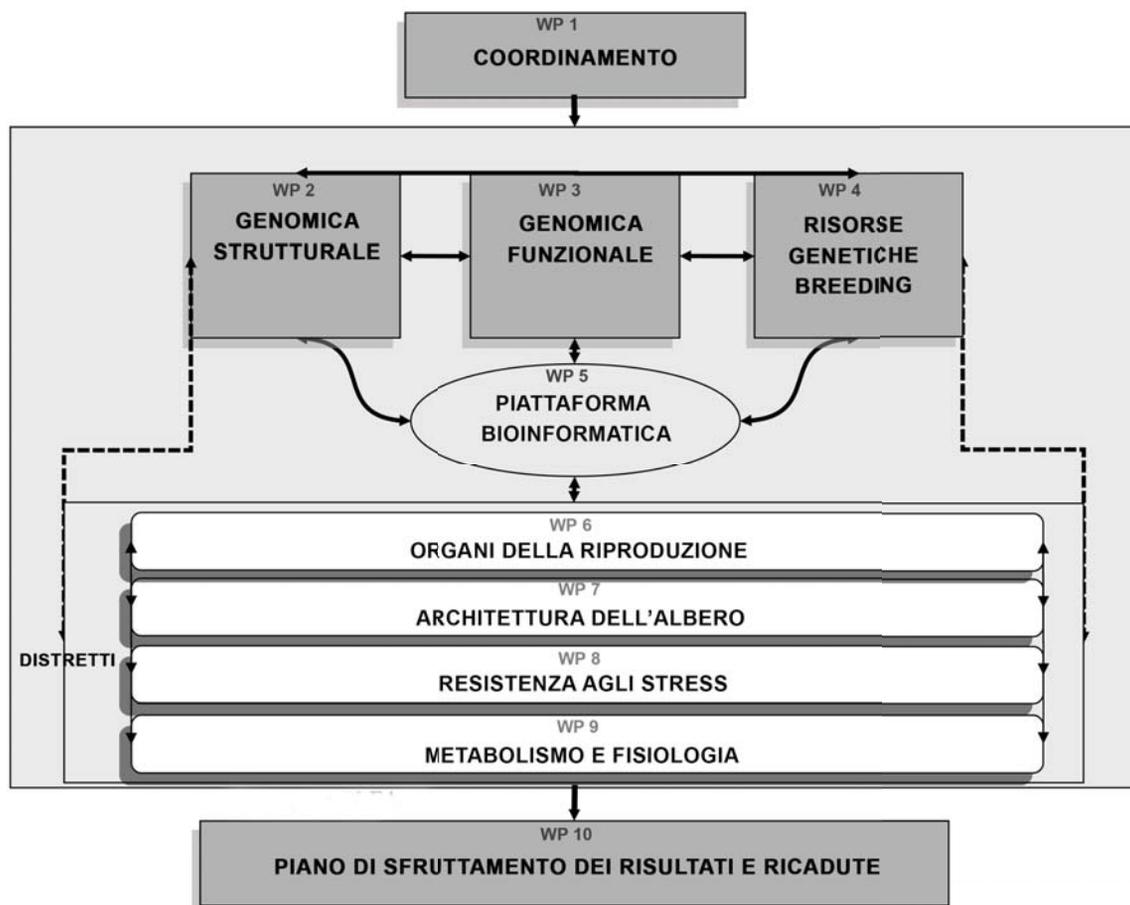
L'Università di Pisa - DCDS (UR UNIPI), in collaborazione con l'Università di Perugia - DSSEA (UR UNIPG) ha il compito di valutare gli effetti di differenti regimi idrici sul contenuto in metaboliti secondari delle olive e dell'olio di oliva. A tale scopo sono stati prelevati campioni di foglie e frutti da alberi in piena produzione, sottoposti a diversi livelli di stress idrico. Il materiale vegetale per lo studio metabolico e molecolare è stato prelevato da olivi irrigati in modo da soddisfare interamente o parzialmente il fabbisogno idrico dell'albero durante il periodo di sviluppo vegetativo. Campioni di frutti sono stati impiegati per l'estrazione di olio da destinare alle successive analisi. Un altro set di campioni è stato impiegato per lo studio dell'espressione genica per qRT-PCR su geni candidati per il contenuto in polifenoli del frutto (UR CNR-IGV). Lo stesso materiale è stato fornito alla UR UNITUS per l'analisi dell'attività enzimatiche del catabolismo della frazione fenolica del frutto: polifenolossidasi, perossidasi,  $\beta$ -glucosidasi e metilesterasi. Le analisi hanno evidenziato una maggiore attività nelle drupe delle piante irrigate indipendentemente della cultivar analizzata. Il CNR-IGV ha studiato i trascritti coinvolti nella sintesi dei secoiridoidi e di altri composti terpenici e fenolici caratteristici dei frutti di olivo e dei loro precursori attraverso la ricerca di geni candidati derivanti dalla collezione di EST di frutto (Alagna et al., 2012).

## Bibliografia

- Muleo R, Colao MC, Miano D, Cirilli M, Intrieri MC, et al. (2009) Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome* 52: 252-260.
- Alagna F., Mariotti R., Panara F., Urbani S., Veneziani G., Esposto S., Taticchi A., Rosati A., Rao R., Perrotta G., Servili M., Baldoni L., 2012. Phenolic compounds as secondary metabolites of olive: transcriptional and biochemical profiling along fruit development. *BMC Plant Biol.* 12:162.
- Baldoni L., Cultrera N.G.M., Mariotti R., 2012. DNA tracking for the authentication of edible plant oils. In: *Food Authentication Using Bio-organic Molecules*. Ed. Stefano Sforza, DEStech Publications, Inc.
- Corrado G., Alagna F., Rocco M., Renzone G., Varricchio P., Coppola V., Coppola M., Garonna A., Baldoni L., Scaloni A., Rao R., 2012. Molecular interactions between the olive and the fruit fly *Bactrocera oleae*. *BMC Plant Biol.*, 12:86.
- Imperato A., Corrado G., Alagna F., Varricchio P., Baldoni L., Rao R., 2012. Olive molecular response to attack of *Bactrocera oleae*: identification of up-regulated genes in infested olive fruits. *Acta Hort.* 929:125-128.
- Mariotti R., Cultrera N.G.M., Muñoz Díez C., Baldoni L., Rubini A., 2010. Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives (*Olea europaea* L.) through plastome sequence comparison. *BMC Plant Biol.* 10:211.
- Muleo R., Morgante M., Velasco R., Cavallini A., Perrotta G., Baldoni L. (2012). Olive Tree Genomic. In: *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. Innocenzo Muzzalupo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0883-2, InTech.
- Rossi S., Calabretta A., Tedeschi T., Sforza S., Arcioni S., Baldoni L., Corradini R., Marchelli R., 2012. Selective recognition of DNA from olive leaves and olive oil by PNA and modified-PNA microarrays. *Artif. DNA PNA & XNA*, 3(2):1-10.
- Sabetta W., Blanco A., Zelasco S., Lombardo L., Perri E., Mangini G., Montemurro C., 2013. *Fad7* gene identification and fatty acids phenotypic variation in an olive collection by EcoTILLING and sequencing approaches. *Plant Phys. Biochem.*, 69:1-8.

**Tabella 1.** Elenco delle Unità di Ricerca (UR) coinvolte nel Progetto OLEA.

<b>UR</b>	<b>Ente/Università</b>
UNITUS-DAFNE	Università degli Studi di Viterbo - Dipartimento di scienze e tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Viterbo
CNR-IGV	Consiglio Nazionale per le Ricerche - Istituto di Genetica Vegetale, Unità Operativa di Supporto di Perugia
IGA	Istituto di Genomica Applicata, Udine
IASMA	Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario di San Michele all'Adige (IASMA), San Michele all'Adige (TN)
ENEA	Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente (ENEA) - Unità Tecnica Trisaia, UTTRI-Biotec Trisaia, Rotondella (MT)
UNIPD-CRIBI	Università degli Studi di Padova - Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative
CRA-OLI	Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Centro per la Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (CS)
CRA-GPG	Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per la Genomica e la Postgenomica Animale e Vegetale, Fiorenzuola D'Arda
UNIPD-DAFNE	Università degli Studi di Padova - Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti risorse Naturali Ambiente
UNINA	Università degli Studi di Napoli Federico II - Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Napoli
SSSA	Scuola Superiore di Studi Universitari e Perfezionamento S. Anna, Pisa
UNIBA	Università degli studi di Bari - Dipartimento Biologia e Chimica Agro-Forestale ed Ambientale e Dipartimento Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata (DPPMA)
UNIPG	Università degli Studi di Perugia - Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti, Perugia
UNIPI-DiSAAA	Università degli Studi di Pisa - Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali, Pisa



**Figura I.** Diagramma delle attività del progetto OLEA.

# Nuove teorie sulla crescita vegetativa e sulla formazione del fiore in olivo coltivato (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*)

## New theories about the vegetative growth and flowering in cultivated oliv tree

(*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*)

E. Marone\*, P. Fiorino\*\* and A. Ottanelli\*\*

\* Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università degli Studi di Teramo - Italy

\*\* DISPAA - Dipartimento di Scienze delle Produzioni agroalimentari e dell' Ambiente - Università degli Studi di Firenze - Italy

### Riassunto

L'intensificazione della coltivazione dell'olivo pone all'attenzione, accanto agli studi sulle qualità del prodotto, anche l'innovazione delle conoscenze e delle applicazioni nei due settori "gestione della capacità produttiva delle piante" e "gestione della chioma"; le attuali pratiche olivicole, basate ancora su conoscenze empiriche, legate alla tradizione, devono adeguarsi e svilupparsi tenendo conto che la scelta del materiale vegetale e gli interventi di potatura devono essere correlati alla conoscenza dei fenomeni che regolano la crescita nella specie ed i meccanismi di fioritura nelle singole cultivar. In riferimento alla gestione della produzione, vengono riportati i dati sulle diverse velocità con cui le cultivar saggiate entrano in produzione. Il fenomeno dell'"aging", cioè di quel processo che deve subire un meristema in accrescimento prima di acquisire la capacità di depositare gemme a fiore, risulta procedere con velocità legate alla matrice genetica (cultivar) determinando differenze importanti nell'entrata in produzione che, nelle condizioni sperimentali descritte, risulta di due cicli vegetativi per "Arbequina" e "Koroneiki", per arrivare fino a quattro cicli per la cv Frantoio.

In riferimento alla gestione della chioma, viene indicata la differente specializzazione delle gemme presenti nello stesso nodo al momento della sua formazione. In un nodo alla base di ogni foglia coesistono una gemma principale la cui funzione a maturità del ramo risulta essere principalmente riproduttiva, ed una o più sottogemme a funzione prevalentemente vegetativa, destinate a ricreare l'architettura della pianta e nuova vegetazione in grado di occupare lo spazio. Gli apici dei nuovi germogli provenienti da sottogemme danno inizio ad un nuovo ciclo di "aging" che nel tempo determinerà le produzioni successive.

La risposta all'asportazione di tratti più o meno lunghi (cimatura e spuntatura) dei nuovi germogli determina la schiusura più o meno rapida di gemme principali immediatamente sotto il punto di intervento (acrotonia), con lo sviluppo di rami del tipo rami anticipati e quindi in possesso del livello di "aging" portato dalle gemme che li hanno generati.

L'uso della potatura per ottenere nuova vegetazione da gemme latenti o nuova vegetazione produttiva da gemme principali attraverso cimature estive rende possibile una gestione della chioma innovativa, attraverso l'applicazione della potatura verde anche in olivo.

**Parole chiave:** aging, gemma principale laterale, sottogemma, potatura

## Abstract

The intensive olive orchards draw the attention to innovation and applications of knowledge in the two main sectors "fruit and canopy management"; the current agronomical practices, linked to tradition, must evolve, taking into account that the choice of plant material and pruning must be related to the knowledge of the phenomena that regulate growth in the species and the mechanisms of flowering in each cultivar.

On the management of production, data on the different speed at which the tested cultivars start to flowering after planting are reported. Starting from the primordia of an accessory bud, the apical meristem became "mature" growing in the time with important differences between the cultivars, acquiring only in the second year of growth for 'Arbequina' and 'Koroneiki' (early bearing cultivars) the capability to produce principal lateral buds able to develop in the inflorescences: with 'Frantoio' the "aging" of two years is not enough to move the principal lateral buds to develop inflorescences: this cultivar start to flower only after four years of growth.

On the management of the canopy, it is shown the different fate of buds at the same node at the time of its formation. At the base of each leaf two different types of lateral buds are present: the main lateral bud, characterized by a reproductive function, and one or more small accessory buds specialized for develop new vegetative branches reiterating the cycle. The apical meristem of new shoots (suckers) from accessory buds give rise to a new cycle of "aging" for the next production.

Tipping or cutting the distal part of the branches determines the sprouting of the nearest to cut distal principal buds (acrotony), with new shoots formation (feathers) having the same "age" of the forming apical meristem.

The use of pruning to obtain new vegetative shoots from latent secondary buds or bearing vegetation from mature principal lateral buds by summer topping at different level makes it possible an innovative canopy management, through the application of green pruning in olive trees.

**Keywords:** aging, principal axillary bud, accessory bud, pruning

## Introduzione

Negli ultimi anni le tecnologie e le tecniche di coltivazione applicate alle piante di olivo hanno impresso un forte impulso alla coltivazione ed alla produttività di questa specie e quindi anche alla ricerca nel settore. Tuttavia l'applicazione conveniente delle diverse tecnologie e nei diversi ambienti necessita di opportuni approfondimenti dei meccanismi di risposta della pianta.

Per l'olivo le informazioni riguardanti la crescita ed il tipo di ramificazioni, la formazione del fiore, la formazione dell'olio nel frutto, sono derivate dalla tradizione, da prove empiriche, o anche dalla trasposizione di una serie di acquisizioni ottenute da specie molto distanti, botanicamente e per esigenze ambientali, che hanno portato a considerare scontati alcuni meccanismi e modelli senza sottoporli ad una attenta verifica quando applicati all'olivo.

E' parso opportuno, quindi, concentrare le ricerche nei seguenti settori, per le evidenti carenze conoscitive che essi denunciano:

- 1) Meccanismi di fioritura (conoscenze indispensabili per la gestione delle quantità di prodotto);
- 2) Crescita, ramificazione e funzione delle gemme (conoscenze indispensabili per la gestione della chioma);
- 3) Relazioni tra le caratteristiche dei principali componenti chimici di un olio di una specifica cultivar e le condizioni climatiche (conoscenze indispensabili per la gestione delle caratteristiche qualitative fondamentali del prodotto olio).

Sui principi che regolano la formazione dei trigliceridi individuati dagli A.A. (Lombardo et al., 2008) arrivano conferme "globali", avvalorando la teoria che le diverse cultivar di olivo siano ancora "primitive", poco selezionate, caratterizzate da elevata variabilità nelle risposte ambientali e di crescita.

In particolare, con l'intensificazione della coltivazione nelle sue diverse applicazioni in densità

di piantagione e forme di allevamento, in volume ed a siepe, è evidente la necessità di una maggior diffusione delle nuove conoscenze di base che stanno radicalmente cambiando la comprensione dei meccanismi di fioritura e crescita in olivo, e le tecniche per la corretta gestione della chioma e della fruttificazione.

## Materiali e metodi

### Prove sul controllo della fioritura

Le prove sono state condotte nell'arco di un quadriennio (2006 - 2010), presso il Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura (oggi DISPAA - Dipartimento di Scienze delle Produzioni agroalimentari e dell'Ambiente), con piantine in contenitore allevate in ombrario ed in fertirrigazione.

Sono stati organizzati due cicli di sperimentazione: nel primo ciclo (2006-2007) si è lavorato con piantine autoradicate di 1 anno di età delle cv Arbequina, Koroneiki, Frantoio, e piante di 3 anni della cv Coratina; in questo primo ciclo si è saggiato l'effetto dell'intensità della radiazione luminosa confrontando tra loro piante allevate in ombrario (50% di ombreggiamento) con piante allevate in condizioni di luce naturale addizionata di definite lunghezze d'onda mediante lampade a vapori di sodio ad alta pressione (Master SON-T PIA Agro) e lampade ad alogenuri metallici (Master HPI-T Plus).

Nel secondo ciclo (2007-2010) si sono utilizzate piante in vaso (1 l) delle cv Arbequina, Koroneiki, Frantoio autoradicate nell'anno precedente, e si sono confrontati i dati di fioritura ottenuti nell'arco di un triennio, in condizioni di luce naturale, ombreggiamento al 50% e luce naturale addizionata mediante le sorgenti luminose precedentemente indicate.

### Prove sulla crescita e ramificazione

In "Arbequina", "Koroneiki", "Frantoio" e "Coratina", su piante in crescita al secondo anno di età si sono misurate le risposte delle diverse gemme (gemma principale laterale, GPI, e sottogemma laterale, SGI) a diversi livelli di potatura sui rami (cimatura, spuntatura); in "Arbequina", inoltre, si sono valutate le risposte delle gemme presenti su spezzoni di ramo bi o trinodali. Quest'ultima prova è stata condotta in serra di nebulizzazione nell'anno 2010. A parte, su un ridotto numero di piante, per le stesse varietà, sono state condotte prove di curvatura e piegatura su rami di 1 anno di età.

## Risultati

### Prove sul controllo della fioritura

Confermando i risultati ottenuti nel primo anno di prove (Fiorino e Marone, 2010), appare evidente che, a parità di condizioni ambientali, l'inizio della fioritura per le diverse cultivar è determinato dall'"aging" del meristema apicale, originariamente sempre vegetativo; questo stato di maturità è raggiunto precocemente dai meristemi di "Arbequina" e "Koroneiki", che consentono la fioritura di gemme generate sulla vegetazione del II anno, e successivamente dalla "Coratina" (con la comparsa solo di sporadici fiori al II anno, ed una abbondante fioritura al III), mentre si deve attendere il IV anno per verificare la comparsa di qualche fiore in piante di "Frantoio" (Tab. 1). Si deve sottolineare che queste prove sono state condotte in ambienti controllati, facendo riferimento principalmente al numero di cicli vegetativi che sono stati necessari per raggiungere nell'ambiente mediterraneo la maturità sufficiente a promuovere la fioritura, e quindi diversi dalle molteplici realtà operative; tuttavia, i dati di entrata in produzione che si ricavano dalle nuove piantagioni nell'area Mediterranea rispondono alle previsioni identificate dal modello.

Meno evidenti sono le indicazioni che scaturiscono dai dati relativi all'influenza dell'intensità luminosa sul processo di fioritura; appare comunque chiaro che l'ombreggiamento non modifica la percentuale di gemme a fiore schiuse sugli assi principali, mentre sembra esistere una grande variabilità di risposte sugli assi secondari, e lo studio e la valutazione statistica dei dati sono ancora in corso (Tab. 2).

Questo fa ritenere che in condizioni di campo l'effetto dell'ombreggiamento reciproco non determini direttamente un calo produttivo, ma agisca attraverso altri meccanismi che tendono a modificare la struttura della chioma influenzando il sistema di ramificazioni.

Secondo la "teoria dell'aging" (Fiorino e Marone, 2010, l.c.), ogni meristema vegetativo schiudendo dà luogo a dei germogli il cui meristema apicale più o meno rapidamente si trasforma in meristema a funzione definita, cioè in grado di deporre, nelle crescite successive, gemme laterali a fiore, fino a completare l'evoluzione trasformandosi anche il meristema apicale in una gemma a fiore; in olivo sono segnalate, non infrequentemente, mignole al termine dei rami (Fig. 1).

La teoria dell'aging allarga l'arco possibile di formazione delle gemme a fiore all'intera annata di crescita dei meristemi apicali maturi.

### Prove sulla crescita e ramificazione

In olivo ogni nodo è composto da due complessi gemmari in posizione opposta, ognuno dei quali comprende una gemma principale alla base superiore della quale sono inserite una o più sottogemme, variamente denominate (gemme latenti, gemme soprannumerarie, gemme sepolte) (Fig 2).

Il meristema apicale in olivo è a crescita continua, e produce la maggior parte della vegetazione del ramo - branca; ogni nodo è composto da una coppia di foglie alla cui ascella sono inseriti due tipi di gemme: la GPI, a funzione prevalentemente a fiore, e la SGI, a funzione vegetativa. L'arco vitale della GPI, se pure raramente, può superare l'anno, ed essa può permanere sino a 18 - 24 mesi dalla sua formazione, mentre la SGI rimane latente sino a che eventi straordinari (quali una gelata che determina la morte del meristema apicale ed il danneggiamento delle foglie dell'anno) non ne richiama la schiusura, sin dal primo anno di formazione. Questa particolare struttura, se la ramificazione si sviluppa si comporta come un "focus" vegetativo continuo, dal quale possono generarsi in determinate situazioni (luce, posizione dominante, etc.), apici meristemati vegetativi a funzione architettonica. Il nuovo germoglio reitera il ciclo di crescita - maturità del meristema apicale.

Le gemme principali laterali (GPI), sul ramo intatto maturo, danno origine ad infiorescenze o rami anticipati, il cui stadio di invecchiamento è determinato da quello dell'apice meristemato principale.

Cimature leggere, effettuate in fasi precoci della crescita del germoglio (mese di giugno), determinano la immediata schiusura delle coppie di gemme distali che danno origine a dei meristemi apicali di sostituzione, mentre interventi tardivi (fine agosto) non determinano una risposta immediata delle GPI; la risposta si manifesta nella successiva ripresa vegetativa, con un maggior numero di gemme principali (GPI) che schiudono per dare origine ad assi vegetativi simili ai rami anticipati ed a funzione definita (dati non pubblicati).

Le prove condotte su espunti di 2 nodi hanno messo in evidenza che sono principalmente le gemme del nodo distale a determinare la successiva crescita vegetativa, cui le sottogemme partecipano solo in modesta misura (Tab. 3); come era da attendersi, vi sono delle differenze nelle risposte delle diverse cultivar in prova, ma le maggiori differenze sulla percentuale di gemme schiuse nell'arco del tempo di osservazione, sono evidenti quando si lavora con le gemme principali (GPI) di oltre 1 anno di età, in cui compare una maggiore attività delle SGI.

Prove condotte con espunti di 3 nodi, variamente posizionati e defogliati (Tab. 4) hanno messo in evidenza che sono le GPI del nodo distale a produrre la maggiore quantità di germogli, mentre il nodo intermedio contribuisce in modo modesto alla creazione della nuova vegetazione, e questo indipendentemente dalla posizione dell'espunto, dritto, capovolto, orizzontale.

Sono evidenti i riflessi di queste informazioni sulle tecniche di potatura, per le quali si intravedono importanti modifiche soprattutto a livello di potatura estiva effettuata meccanicamente.

### L'importanza pratica delle acquisizioni teoriche

In olivo la crescita dell'apice porta con il progredire del tempo alla formazione di rami con gemme destinate a diventare infiorescenze in assenza di specifici blocchi del processo. Questo può avvenire soltanto dopo che il meristema apicale, indifferenziato al momento della schiusura, è sviluppato per un periodo di tempo o una quantità di crescita sufficientemente lunghi da determinare un cambiamento di funzione (crescita definita).

Questo obbliga a vedere in una nuova ottica fenomeni quali l'alternanza di produzione, ed impone nuovi criteri per adeguare le tecniche di potatura. A questo proposito i risultati indicano che

è possibile utilizzare in olivo la potatura estiva o potatura verde, intesa come intervento sui rami dell'anno, per contenere la vegetazione, soprattutto per allevamenti a siepe, proprio sfruttando la capacità di germogliamento delle GPI rispetto alle SGI, che determinerebbero un radicale ringiovanimento della parete fruttificante.

Differenze di illuminazione non sono in grado di influenzare direttamente la formazione delle infiorescenze, essendo il meccanismo determinato, ma possono cambiare la struttura della pianta, attraverso la schiusura privilegiata di gemme che risultano dominanti per posizione sul ramo di 1 anno o di 2 anni (modello pero).

Negli interventi di potatura meccanica che vengono utilizzati per il contenimento delle chiome in altezza ed in larghezza, si deve considerare che è possibile intervenire in epoche diverse con intensità diversa, e provocando anche risposte molto diverse da parte delle piante; una potatura molto intensa e profonda porta ad un ringiovanimento della parte di pianta potata, con l'emissione di germogli che, provenendo da gemme latenti, hanno bisogno di ripercorrere l'intero ciclo di maturazione (aging) del meristema apicale, che impiegherà due o più anni, a seconda della cultivar, per tornare nella fase riproduttiva; con potature più o meno leggere, che interessano solo parte della vegetazione dell'anno, la risposta sarà un rinnovo della vegetazione matura che dovrebbe mantenere la stessa capacità di fioritura della zona asportata; infine, una cimatura (potatura estiva) di pareti fruttificanti mature, dovrebbe tradursi in una maggior produzione di rami anticipati "a frutto", e quindi ridurre la lunghezza dell'asse principale in crescita del germoglio aumentando la quantità di gemme a fiore disponibili nella primavera successiva.

## Bibliografia

Lombardo, N., Marone, E., Alessandrino, M., Godino, G., Madeo, A., Fiorino, P. 2008. Influence of growing season temperatures in the fatty acids (FAs) of triacylglycerols (TAGs) composition in Italian cultivars of *Olea europaea*. Adv. Hort. Sci. 22(1): 49-53.

Fiorino, P. and Marone, E. 2010. The fate of lateral buds in the olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *europaea*). A first report. Adv. Hort. Sci. 24(1): 29-34.

## Tabelle

Tabella 1 - Andamento della fioritura in piante autoradicate di cultivar diverse								
	Cultivar							
	Arbequina		Koroneiki		Coratina*		Frantoio	
	AP <sup>x</sup>	AS <sup>y</sup>	AP	AS	AP	AS	AP	AS
Gemme a fiore (%) sulla vegetazione del I anno (da gemma latente)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gemme a fiore (%) sulla vegetazione del II anno (dal germogliamento)	14.9	12.0	12.6	1.5	1.2	0.0	0.0	0.0
Gemme a fiore (%) sulla vegetazione del IV anno (dal germogliamento)	18.8	20.9	50.6	87.3	39.9	42.9	0.0	3.7

\* Per la cv Coratina l'epoca di taleggio non è definita

<sup>x</sup> = AP = Leader

<sup>y</sup> = AS = Assi secondari da rami anticipati

Tabella 2 - Influenza dell'intensità luminosa sui processi di fioritura al II anno di crescita in due diverse prove

II anno di crescita		Cultivar			
		Arbequina		Koroneiki	
		AP <sup>x</sup>	AS <sup>y</sup>	AP	AS
2007	Ombreggiamento	16.4	13.7	27.1	11.7
	Luce naturale	–	–	–	–
	Luce naturale + lampade	14.5	22.5	52.5	23.3
2008	Ombreggiamento	12.7	76.5	28.0	6.4
	Luce naturale	14.9	12.0	12.6	1.5
	Luce naturale + lampade	15.5	13.9	13.2	0.4

<sup>x</sup> = AP = Leader

<sup>y</sup> = AS = Assi secondari da rami anticipati

Tabella 3 - Percentuale di schiusura delle diverse tipologie di gemme in talee binodali provenienti da tratti di ramo dell'anno e di un anno

		Cultivar					
		Arbequina		Coratina		Koroneiki	
		AP <sup>x</sup>	AS <sup>y</sup>	AP	AS	AP	AS
Ramo dell'anno	Nodo distale	48.1	3.8	47.2	5.6	29.2	0.0
	Nodo basale	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1
Ramo di un anno	Nodo distale	10.9	60.9	35.7	2.4	47.5	2.5
	Nodo basale	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

<sup>x</sup> = AP = Leader

<sup>y</sup> = AS = Assi secondari da rami anticipati

Tabella 4 - Percentuale di schiusura delle diverse tipologie di gemme in talee di 3 nodi della vegetazione dell'anno della cv Arbequina

		Gemme principali (%) su totale gemme	Gemme secondarie (%) su totale gemme
Talee verticali; nodo basale defogliato e piantato nel substrato	Distale	20.0	0.0
	Centrale	2.5	0.0
	Prossimale	2.5	0.0
Talee orizzontali defogliate a nodi alterni	Distale	10.0	0.0
	Centrale	0.0	0.0
	Prossimale	0.0	0.0
Talee verticali a polarità invertita; nodo apicale defogliato e piantato nel substrato	Distale	32.5	2.5
	Centrale	30.0	5.0
	Prossimale	2.5	0.0



Fig. 1 - Mignola in posizione apicale in "Koroneiki"

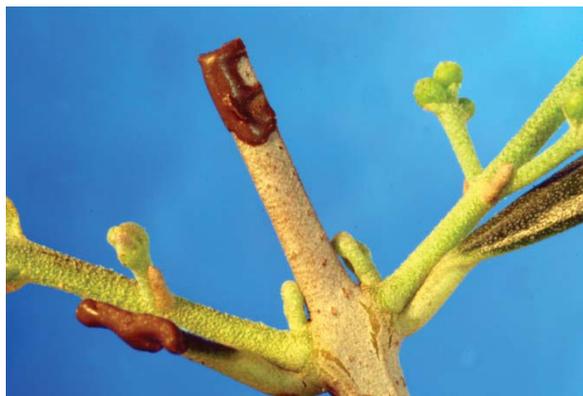


Fig. 2 - Complesso gemmario del nodo di olivo con evidenti sottogemme che si sviluppano all'inserzione della mignola (originata dalla gemma principale laterale)

# Caratterizzazione molecolare di varietà campane di olivo e studio della risposta della drupa alla mosca dell'olivo

F. Alagna (1), D. Scarano (2), P. Varricchio (2),  
L. Baldoni (1), G. Corrado (2) and R. Rao (2)

(1) Istituto di Genetica Vegetale, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via della Madonna Alta 130, Perugia, 06128, Italy

(2) Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università 100, Portici, Napoli, 80055, Italy

## Riassunto

La conoscenza della diversità molecolare delle varietà di olivo è essenziale per la loro descrizione e rappresenta un aspetto di notevole importanza economica per la protezione di oli DOP monovarietali. Il presente lavoro descrive la caratterizzazione della diversità molecolare nelle principali accessioni campane. Inoltre si riportano i risultati della caratterizzazione di sequenze di olivo indotte dalla infestazione della drupa da parte delle larve di *Bactrocera oleae*.

## Abstract

The knowledge of the molecular diversity of the olive varieties is essential for their description and it represents an aspect of considerable economic impact for the protection of monovarietal PDO olive oil. The present work describes the characterization of molecular diversity of the major accessions in the Campania region. Additionally, we report the results of characterization of sequences of olive induced by the infestation of the drupe by larvae of *Bactrocera oleae*.

**Keywords:** *Olea europea*, *Bactrocera oleae*, SSR, SSH-PCR.

## Introduzione

L'olivo (*Olea europea* L.) è una delle più antiche coltivazioni nei paesi del Bacino del Mediterraneo, dove rappresenta una preziosa risorsa per l'economia locale, sia per la produzione di olio che di olive da tavola. Il panorama varietale di olivo è molto ampio, a causa della limitata erosione genetica che caratterizza il germoplasma di olivo coltivato, conseguenza della longevità della pianta e della lenta introduzione di nuovi genotipi. Le varietà di olivo sono caratterizzate da una significativa variabilità sia per quanto riguarda i tratti morfologici, come la dimensione dei frutti ed il contenuto in olio, che i caratteri agronomici come la risposta a stress biotici e abiotici (Rotondi et al. 2003). Ad esempio, le cultivar di olivo si differenziano per il grado di suscettibilità alla mosca dell'olivo, il suo principale stress biotico nel mondo (Daane et al. 2010), ma i fattori alla base di questo tratto sono ancora controversi (Loscalzo et al. 1994; Scarpato et al. 1996). Una forte tolleranza, definita principalmente

in base alla gravità della infestazione, è stata riportata in alcune varietà coltivate (Daane et al. 2010). Tuttavia, anche le cosiddette cultivar "resistenti" possono subire notevoli attacchi sotto pressione intensa infestazione (Iannotta et al. 1999) e purtroppo vi sono scarse informazioni sui meccanismi molecolari che controllano tali aspetti. Più recentemente le analisi molecolari del DNA hanno indicato che anche dal punto di vista genetico, l'olivo è caratterizzato da una notevole diversità allelica. Tale diversità è dovuta a diversi fattori, quali la propagazione vegetativa, i meccanismi di auto incompatibilità, la longevità delle piante e la capacità di sopravvivere in assenza di cure colturali e di incrociarsi con forme selvatiche. La valutazione della variabilità genetica dell'olivo è uno strumento importante per la gestione e salvaguardia del germoplasma olivicolo. L'accertamento dell'identità genetica e l'identificazione delle varietà è stata in molti casi conseguita mediante l'uso di numerosi marcatori del DNA (RAPD, AFLP, SSR, SNP) (Cipriani et al. 2002; Corrado et al. 2009; Fabbri et al. 1995; Rao et al. 2009; Reale et al. 2006; Sefc et al. 2000). Il primo obiettivo della attività di ricerca è stato quindi la caratterizzazione molecolare delle varietà di olivo campano per l'identificazione di profili discriminanti utili anche ai fini della tracciabilità genetica in filiera.

L'attività di ricerca si è inoltre concentrata sulla caratterizzazione molecolare della risposta della drupa a seguito di infestazione di *B. oleae*. La nostra analisi trascrittomica ha come obiettivo quello di rivelare le basi molecolari e le relative vie di segnalazione indotte nell'interazione tra olivo e il suo più dannoso parassita biotico. Tale studio vuole fornire quindi il primo riferimento molecolare per lo screening della diversità genetica dell'olivo in relazione ad un carattere di grande interesse agronomico.

## Materiali e metodi

### Analisi SSR

Sono state analizzate le seguenti varietà di olivo: Asprinia, Biancolilla, Caiazzana, Carpellesse, Cornia, Minucciola, Ogliaiola, Olivo da olio, Ortice, Ortolana, Pampigliosa, Pisciotana, Racioppella, Ravece, Ritonnella, Rotondella, Ruveia, Salella, Tenacella e Tonda. Il DNA è stato estratto da foglie ed amplificato come riportato (Corrado et al. 2009). Sono stati impiegati i seguenti loci SSR: DCA3, DCA4, DCA5, DCA7, DCA9, DCA13, DCA14, DCA15, DCA16, DCA17, DCA18, GAPU45, GAPU71B, GAPU101, GAPU103, EMO90, EMO-L e UDO43 (Carriero et al. 2002; Cipriani et al. 2002; Sefc et al. 2000). Gli alleli SSR sono stati separati mediante elettroforesi capillare su ABI-Prism 3100-AVANT (Applied Biosystems). Dopo ispezione manuale dei dati, le dimensioni alleliche sono state arrotondate omogeneamente al più vicino numero intero sulla base della ripetizione del core. I profili allelici ottenuti per ciascun campione, sono stati analizzati mediante il software GenAlex 6 (Genetic Analysis), calcolando i diversi indici genetici. La distanza tra due individui è stata calcolata per ogni singolo locus e sommata per ottenere una matrice. Per un singolo locus in analisi, considerando l'I-esimo, J-esimo, K-esimo e L-esimo allele, una serie di distanze quadrate sono definite come segue:  $d^2_{(II, II)} = 0$ ,  $d^2_{(IJ, IJ)} = 0$ ,  $d^2_{(II, IJ)} = 1$ ,  $d^2_{(IJ, IK)} = 1$ ,  $d^2_{(IJ, KL)} = 2$ ,  $d^2_{(ii, jk)} = 3$ , e  $d^2_{(ii, jj)} = 4$ . La matrice delle distanze è stata impiegata per la costruzione di un dendrogramma con l'algoritmo UPGMA.

### Costruzione ed analisi di una libreria sottrattiva in olivo

Ai fini di identificare EST differenzialmente espresse, coinvolte nel meccanismo di interazione olivo-mosca è stata utilizzata la tecnica *suppression subtractive hybridization*, SSH (Diatchenko et al. 1996). Sono state costruite due librerie sottrattive da drupe contenenti la galleria larvale, provenienti

dalla varietà 'Moraiolo', caratterizzata da una bassa suscettibilità alla mosca. I trascritti sottratti e amplificati, sono stati clonati nel vettore plasmidico pCRII-TOPO® (TOPO TA Cloning, Invitrogen). Per verificare la presenza dell'inserto e valutarne la sua dimensione, il DNA plasmidico, purificato dalle colonie positive alla selezione *blue/white*, è stato digerito con l'enzima EcoRI e sequenziato mediante il metodo Sanger.

## Risultati e discussione

### Analisi SSR delle cultivar di olivo e diversità genetica

L'analisi molecolare dei 20 genotipi di olivo è stata eseguita con 18 marcatori SSR. Uno studio precedente condotta nell'ambito del progetto RIOM, ha permesso di selezionare i genotipi rappresentativi della varietà in esame in base ad una analisi con AFLP (Rao et al. 2009).

La tabella 1 riporta i principali indici genetici descrittivi della popolazione in esame, come valori mediati su tutti loci. I loci che hanno fornito il maggior numero di alleli (16) sono stati il DCA 9 e GAPU103, in cui si è osservata la maggiore eterozigosi. Il locus con meno alleli (5) è stato l'EMO-L che ha mostrato anche la più bassa eterozigosi attesa. Questo locus ha comunque mostrato un indice di fissazione prossimo allo zero (0.062). Il valore positivo più elevato per l'indice di fissazione è stato osservato per il locus DCA15. Per questo locus si sono trovati 7 alleli diversi, con una Eterozigosi osservata nella popolazione in esame molto bassa (0,150), suggerendo quindi una alta probabilità della presenza di un allele nullo. La figura 1 mostra le frequenze alleliche per locus. Il loci che hanno alleli con la più alta frequenza sono stati l'EMO-L, EMO-90 e DCA 13. Gli alleli con la frequenza più bassa (2.5%) sono invece molto più diffusi, essendo presenti in 10 loci.

Le distanze genetiche sono poi state impiegate per visualizzare le relazioni genetiche esistenti tra le varietà in esame (figura 2). E' possibile osservare come gli SSR impiegati riescono a discriminare tutte le varietà in esame. Inoltre non è possibile osservare una distribuzione delle varietà che sia concorde con la loro area di diffusione all'interno della regione, a sottolineare al grande variabilità che esiste in Campania ma anche all'interno delle diverse aree olivicole.

### Interazione pianta-mosca

Per studiare l'interazione tra l'olivo e la *B. oleae*, abbiamo condotto una indagine trascrittomiche della risposta molecolare della drupa. Le identificazioni di geni coinvolti nella risposta dei frutti è stata eseguita utilizzando una tecnica di ibridazione sottrattiva e PCR soppressiva. La libreria di cDNA è stata ottenuta utilizzando RNA da frutti con la galleria di alimentazione delle larve (tester) e da frutti intatti (driver). Dopo selezione blu/bianco e la restrizione del DNA plasmidico, sono state identificate 590 colonie ricombinanti su 1.180. I plasmidi ricombinanti con un inserto superiore a 200 bp sono stati sequenziati ed i cloni con basso contenuto informativo (sequenze ripetute, con *stretch* omopolimerici, etc.) sono stati scartati. La lunghezza media delle 197 sequenze di olivo selezionate in questo modo è stata di 303 bp, da un minimo di 69 bp a un massimo di 766 bp. Per ottenere sequenze uniche (unigeni), abbiamo effettuato un *assembly* utilizzando il programma CAP3, che ha individuato 87 singleton ed ha raggruppato le restanti 111 sequenze in 33 contigs, composti da 2 a 22 EST sovrapposte. Il dataset degli unigeni non ridondanti, a seguito di un traduzione *in silico*, è stato confrontato con i database disponibili per trovare somiglianze con sequenze note. Solo tre cloni sono stati abbinati a sequenze di olivo già disponibili. Solo match con valori di *e* inferiori a 10e-03 sono stati usati per assegnare una funzione putativa ai trascritti. Complessivamente, il 39,2% dei unigeni putativamente codificano per le proteine con una significativa somiglianza con proteine annotate

in altri organismi. I restanti 73 unigeni (60,8%) sono stati considerati funzionalmente come non identificati. Unigeni con BlastX valore  $e$  superiore a  $10e^{-3}$  sono stati poi confrontati con i database di nucleotidi. Cinquantadue sequenze hanno rivelato una similarità significativa ( $e$ -value inferiore a  $10e^{-3}$ ). In particolare, 29 EST sono stati annotati scegliendo come banche di sequenze espresse in NCBI. Una somiglianza significativa per altri 23 cloni è stata trovata analizzando le sequenze trascritte alla banca dati OLEA EST db. L'analisi bioinformatica degli EST non-ridondanti ha indicato che diversi processi molecolari sono alterati. Tra esso i principali sono la risposta allo stress, il metabolismo dei fitormoni, il controllo della trascrizione ed il metabolismo primario. Inoltre, una parte considerevole delle EST non è stato classificato. La distribuzione delle sequenze in funzione della loro annotazione funzionale è riportata in figura 3.

## Conclusioni

I marcatori molecolari usati hanno mostrato un buon potere discriminante, fornendo un cospicuo numero di alleli. L'elevata variabilità genetica riscontrata per i campioni analizzati è stata usata per attribuire a ciascuna varietà un profilo unico identificativo. Inoltre, lo studio delle interazioni pianta- mosca ha permesso l'identificazione di nuove EST di olivo che possono essere considerate le prime sequenze putativamente associate a risposte di difesa della pianta di olivo a seguito dell'infestazione della mosca. L'identificazione di trascritti coinvolti nella difesa alla mosca, offre una linea di riferimento rispetto al quale effettuare uno screening delle risorse genomiche di olivo caratterizzate in questa attività. Questi dati, aprono la strada a ulteriori saggi molecolari e biologici per consentire lo sviluppo di strategie razionali che consentano di migliorare la tolleranza dell'olivo al suo maggiore stress biotico.

## Letteratura citata

- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F. and Giorio, G. 2002 Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104:301-307.
- Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A. and Testolin, R. 2002 Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 104:223-228.
- Corrado, G., La Mura, M., Ambrosino, O., Pugliano, G., Varricchio, P. and Rao, R. 2009 Relationships of Campanian olive cultivars: comparative analysis of molecular and phenotypic data. *Genome* 52:692-700.
- Daane, K.M. and Johnson, M.W. 2010 Olive Fruit Fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology* 55:151-169.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. 1996 Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6025-6030.
- Fabrizi, A., Hormaza, J.I. and Polito, V.S. 1995 Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea-Europaea* L) Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120:538-542.
- Iannotta, N., Perri, I., Tocci, C. and Zaffina, F. 1999 The behaviour of different olive cultivars following attacks by *Bactrocera oleae* (Gmel.). *Acta Horticulturae*:545-548.

- LoScalzo, R., Scarpati, M.L., Verzegnassi, B. and Vita, G. 1994 *Olea europaea* chemicals repellent to *Dacus oleae* females. *Journal of Chemical Ecology* 20:1813-1823.
- Rao, R., La Mura, M., Corrado, G., Ambrosino, O., Foroni, I., Perri, E. and Pugliano, G. 2009 Molecular diversity and genetic relationships of southern Italian olive cultivars as depicted by AFLP and morphological traits. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 84:261-266.
- Reale, S., Doveri, S., Diaz, A., Angiolillo, A., Lucentini, L., Pilla, F., Martin, A., Donini, P. and Lee, D. 2006 SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* 49:1193-1205.
- Rotondi, A., Magli, M., Ricciolini, C. and Baldoni, L. 2003 Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica* 132:129-137.
- Scarpati, M.L., LoScalzo, R., Vita, G. and Gambacorta, A. 1996 Chemotropic behavior of female olive fly (*Bactrocera oleae* gmel) on *Olea europaea* L. *Journal of Chemical Ecology* 22:1027-1036.
- Sefc, K.M., Lopes, S., Mendonca, D., Dos Santos, M.R., Machado, M.L.D. and Machado, A.D. 2000 Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology* 9:1171-1173.

Tabella 1: principali indici genetici medi delle varietà campani.

N		Na		Ne		I		Ho		He		uHe		F	
Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
19,556	0,202	9,222	0,778	5,622	0,631	1,849	0,093	0,748	0,059	0,789	0,020	0,810	0,021	0,055	0,070

Legenda:

Na = Numero di differenti alleli;

Ne = Numero di alleli effettivi =  $1 / (\text{Somma } p_i^2)$ ;

I = Indice di Shannon =  $-1 * \text{Somma } (p_i * \ln(p_i))$ ;

Ho = eterozigosi osservata = Numero di Eterozigiti/N,

He = Eterozigosità Attesa =  $1 - \text{Somma } p_i^2$ ,

UHE = Eterozigosità attesa "unbiased" =  $(2N / (2N-1)) * He$ ,

F = Indice di Fissazione =  $(He - Ho) / He = 1 - (Ho / He)$ , dove  $p_i$  è la frequenza dell'allele esima per la popolazione e  $\text{somma } p_i^2$  è la somma delle frequenze alleliche popolazione quadrati.

N rappresenta il numero di campioni.

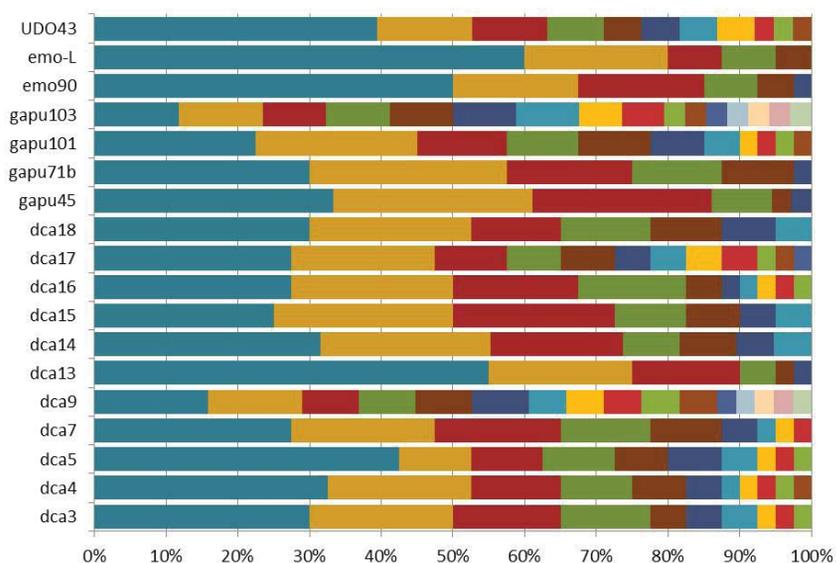


Figura 1: frequenze alleliche per locus nella popolazione analizzata.

Per ciascun locus, indicato sulla sinistra, la lunghezza dei segmenti colorati rappresenta la frequenza di ogni allele. Le frequenze sono riportate in ordine crescente.

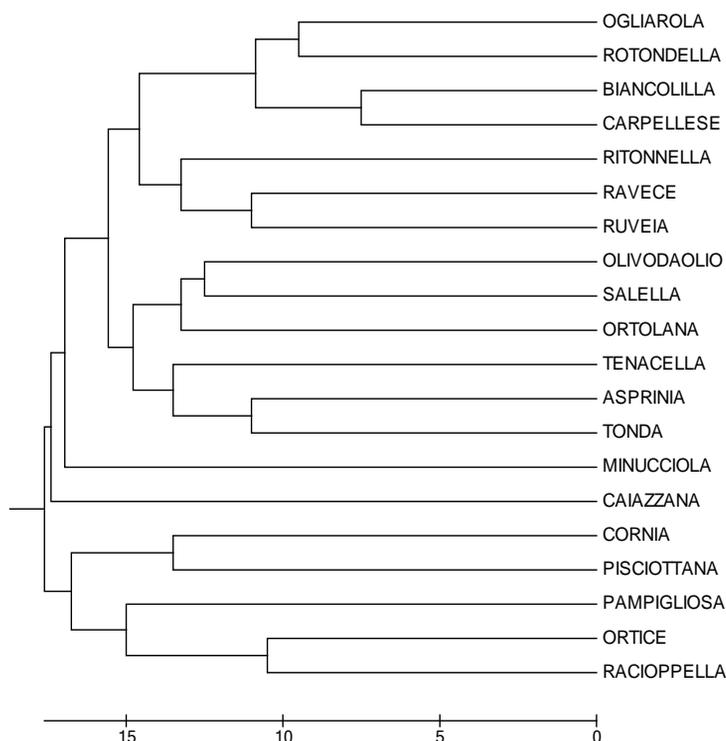


Figura 2: le relazioni tra le varietà sono state dedotte con il metodo UPGMA sulla base delle distanze genetiche. L'albero è in scala, con la lunghezza dei rami nella stessa unità di quelle delle distanze utilizzate per inferire il dendrogramma.

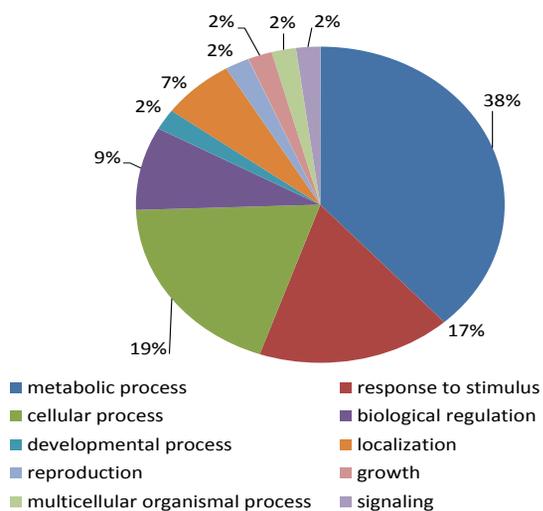


Figura 3: distribuzione delle sequenze identificate secondo il loro coinvolgimento in diversi processi cellulari, secondo il vocabolario di Gene Ontology ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)).

# Production of Nuclear Stock olive plants for certification programs

G. Loconsole<sup>1</sup>, M. Saponari<sup>2</sup>, G. Bottalico<sup>1</sup>,  
F. Faggioli<sup>3</sup>, G. Albanese<sup>4</sup> and V. Savino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro.

<sup>2</sup> Istituto di Virologia Vegetale del CNR – Unità Organizzativa di Supporto di Bari

<sup>3</sup> CRA-Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma, Italy

<sup>4</sup> Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari e Forestali, Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria

## Abstract

Olive is worldwide affected by several systemic pathogens, including viruses which spread by insect vectors. These pathogens are often present in multiple infections, do not apparently cause heavy loss in quality and yield and are largely harboured in symptomless plants. However, they are a threat for the sanitary improvement of the crop and hinder the correct management of national and international certification programmes and exchange of planting material. The application of sensitive diagnostic tools (mainly based on molecular techniques) greatly improved, in last decade, the process of selection of virus-free material (nuclear stock), which coupled with the new EU phytosanitary Directives implemented the entire certification program. The requirements for the correct management of nuclear stock and mother plants in the repositories and nurseries, established in these directives re-enforce the guarantee for the high quality standards of the certified propagating material.

## Introduction

Like other vegetatively propagated crops, olive is affected by a number of pathogens (viruses, fungi, bacteria and phytoplasma) with a variable economic incidence on yield and quality of the production (Martelli, 1981), that persist in the budwood and can be transmitted and disseminated with it.

Regarding viruses, in Italy and in Mediterranean Basin the sanitary status for olive industry is critical: to date, 15 viruses have been described (Table 1) and the infection rate in olive crops is very high. It is peculiar, for such a long-lasting crop, that some of these viruses were isolated from symptomless trees and/or reported only in one or a very limited number of trees. Several olive viruses are poliphagous and worldwide spread, like the three nepoviruses *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) (Savino et al., 1979) and *Cherry leafroll virus* (CLRV) (Savino and Gallitelli, 1981); or like *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Savino and Gallitelli, 1983), *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Triolo et al., 1996) and the agent of tobacco necrosis (TNV) (Felix and Clara, 2002).

The others, named after olive, are reported only in olive: *Olive ringspot virus* (OLRV) (Savino et al., 1983), *Olive latent virus 2* (OLV-2) (Savino et al., 1984), *Olive latent virus 3* (OLV-3) (Alabdullah et al., 2010), *Olive vein yellowing associated virus* (OVYaV) (Faggioli and Barba, 1995), *Olive yellow mottling and decline-associated virus* (OYMDaV) (Savino et al., 1996), *Olive semilatifolius virus* (OSLV) (Materazzi et al., 1996), *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) (Sabanadzovic et al. 1999) and

*Olive latent virus 1* (OLV-1) Gallitelli and Savino, 1985). Since OLV-1 was isolated also from citrus (Martelli et al., 1996), a doubt can be cast that also other olive viruses may have a larger host range. For the increasing number of virus infections detected in olive worldwide, this crop can play a role as reservoir and vehicle of several viruses, even on a long distance range, since most of them are harboured in a latent condition but are able to be spread by highly efficient vectors.

As mentioned, only in a few cases these viruses are associated to a specific disease, for example in bumpy fruit disorder or leaf yellowing complex. Most usually they were isolated or detected from symptomless plants. Although their weight on olive production is unknown, dismissing viral problems as negligible may not be wise, because some experiments suggest that virus entities are possibly implicated in the aetiology of some virus-like diseases. While the virus species found in olive have been, at a variable extent, characterized for their serological and molecular properties, accurate studies on their epidemiology are still missing, thus transmission behaviour and natural vectors are speculative.

### Sanitary selection and sanitation programs

Pathogens associated with olive propagative material may be systemic (viruses and phytoplasmas and probably *P. savastanoi* pv. *savastanoi*) or associated with the vascular system (*V. dahliae*) and they are unlikely to be eliminated during the vegetative propagation of an infected source.

To avoid disease and/or pathogen dissemination through vegetative propagation, possible remedies include mainly preventive strategies based on the use and propagation of "healthy" mother plants. In fact, in order to attain sanitary improvements of any crop, a system of preventive, protective and often of sanitation measures has to be established and implemented, encompassing a complex series of interventions currently referred to as "phytosanitary selection and certification".

In the framework of a phytosanitary and clonal improvement program, the main activities include: (i) field surveys for the selection of olive trees with no apparent disease symptoms and fulfilling the pomological traits of the cultivar; (ii) samples collection for laboratory tests, both for pathogen detection and DNA marker analysis; (iii) molecular tests (RT-PCR, dot blot hybridization and dsRNA analysis) for the detection of viruses included in the certification program; (iv) genetic characterisation using SSR markers; (v) sanitation by heat therapy, meristem tip culture and micrografting in case of no healthy trees being detected for one or more cultivars; (vi) propagation of the candidate nuclear stocks under conditions that ensure freedom from re-infections, usually in insect-proof greenhouses.

Field surveys should be carried out in the main olive-growing areas for the specific cultivar undergoing the clonal and sanitary selection program. Usually mature trees are selected (i.e. 25-year-old) based on visual inspection during spring and autumn. Samples for virus testing consist of 10-15 cuttings collected from 1- to 2-year-old twigs or young leaves for DNA extraction and SSR marker analysis.

Despite limited information being available on the application and effectiveness of sanitation protocols on olive plants, *in vivo* and *in vitro* heat therapy, *in vitro* shoot tip culture and micrografting have all been applied in attempts to regenerate OLYaV- and CLRV-free material and some successful results have been obtained (Bottalico et al., 2004). For *in vivo* heat therapy, plants can be grown at 38°C for 3 to 12 months. During heat therapy, 2 to 2.5 cm long shoot tips are excised no earlier than three months from the beginning of the treatment. After surface-sterilization in 0,05% mercuric hydrochloride for 10 min, the shoot tips are placed *in vitro* in petri dishes on different media according to the cultivar [OM (Rugini, 1984); MSM media (Leva et al., 1995)] and grown at 24°C with

a 16 h photoperiod. Regenerated explants are subcultured 3 or 4 times every four weeks using the proliferation medium reported by Rugini (1984), prior to transplanting in jiffy pots. For *in vitro* heat therapy, 2 to 3 cm long *in vitro* plantlets are exposed for 1 to 3 weeks to 38°C. After heat treatment and subcultures, the surviving plantlets are transplanted in jiffy pots.

For shoot tip culture, apices are excised from well-established *in vitro* cultures maintained on OM or MSM media. Regenerated apices are subcultured on the same media prior to being transplanted in jiffy pots.

Olive seedlings for micrografting are recovered from seeds soaked for a few seconds in 70% alcohol before the endocarp removal. Kernels are then soaked for 10 min in 0.05% mercuric hydrochloride solution, rinsed three times in sterile water, and placed on wet sterilized paper in petri dishes at 25° in the dark. After 2-3 months, the regenerated seedlings are cut, leaving about 1.0 cm of the epicotyl. Shoot apices, excised from *in vitro* grown plantlets, are then grafted on the top of decapitated seedlings. After grafting, plants are cultured in rooting medium (Rugini, 1984). Generally less than 70% of the grafts are successful, and only 10% of the plants survive after transplantation in the soil.

Although phytoplasma diseases may be cured by treatment with certain classes of antibiotics and by heat water therapy, such approaches have not been applied to olive plants in order to obtain sanitation from these pathogens. This is because olive trees affected by phytoplasmas are very rare, and during a phytosanitary selection, phytoplasma-free plants can be easily found. Since their transmission by leaf-hopper vectors is ascertained for other crops, growing nuclear stock plants in insect-proof greenhouses ensures also freedom of infection from phytoplasmas.

The detection of *V. dahliae*-free plants must be carried out with great care. A visual diagnosis is in fact insufficient in guaranteeing the absence of this fungus and have recommended the use of new and sensitive diagnostic tools that are now available.

In order to prevent infections by *P. savastanoi* pv. *savastanoi* selected materials must be free from symptoms of the disease, and before propagation material is harvested, mother plants must be sprayed with a copper-based treatment to reduce risk of infections by the epiphytic bacterial population.

The candidate nuclear-stock material obtained through the field selection and/or sanitation treatments describe above can enter the certification program upon official approval, and genetically and sanitary certified propagative material will be available to growers.

Demand for olive products is constantly increasing in local and foreign markets, stimulating the expansion of olive crops and encouraging the exchange of olive germplasm at an international level. The activation of a selection and certification program is thus crucial to guarantee the quality of the propagative material and reduce risks for pathogen dissemination.

## Phytosanitary certification program

The production of healthy, high-quality olive products depend to a large extent on the quality of the plant material used for olive cultivation. In general, the production of “healthy” plants for planting occurs through defined certification procedures by which a particular cultivated selection, whose health status and trueness to type have been officially attested, is propagated following specific requirements. In a typical certification scheme, the certified material is descended by a defined number of propagation steps from individual plants, found to be free from pathogens and pests, maintained and propagated under rigorous conditions that exclude recontamination.

To this end, appropriate regulations are necessary to ensure the production, marketing and movement of certified plant propagation material with high standards and free from harmful

pathogens. Over the past twenty years, through globalisation and the expansion of several crops in new areas, concerns were raised about new disease emergencies transmitted by infected propagating material. In an attempt to limit the potential impact of the spread of pests and pathogens through the movement of infected plants, specific laws have been issued at regional, national and European levels.

The Council Directive 2008/90/EEC of 29 September 2008 (recast version of Directive 92/34/EEC) on the marketing of fruit plant (including olive) propagating material and fruit plants intended for fruit production established a harmonized Community regime which ensures that growers throughout the Community receive propagating material and fruit plants which are healthy and of good quality. This applies to fruit plant propagating material and fruit plants of genera and species listed in Directive Annex I, which may only be marketed if they are either CAC (*Conformitas Agraria Communitatis*), Pre-basic, Basic or Certified material.

To be classified as such, material must comply with the criteria of quality, plant health, testing methods and procedures, propagation systems and varietal aspects and must have been recognised following official inspections. In addition, propagating material or fruit plants may, in most circumstances, only be marketed by accredited suppliers, whose production methods and facilities meet the requirements of the Directive. Propagating material and fruit plants from Countries outside of the European Union (EU) may only be marketed within the Community if they offer the same guarantees as materials produced in the Community complying with Council Directive 92/34/EEC. Each EU Member State adopts its own enforcement and implementation policies using the EU Directive as a guide.

In Italy, it is compulsory that the production and marketing of olive propagating material fulfils the requirements established by the Italian Decree amended on 14/04/1997 in compliance with the aforementioned EU Directive. According to this law, assessment of true to type and certification of sanitary status of olive propagating materials are compulsory and plants are certified as CAC. In this kind of certification plants must be free from *Euzophera pinguis*, *Meloidogine spp.*, *S. oleae*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *V. dahliae* and all known viruses (15 to date). However, several aspects concerning for example the procedures for inspections and controls are not well defined, leading to misinterpretations and heterogeneous application of the law in the different Italian regions by the regional Phytosanitary Services. Besides this compulsory system, which relies on the propagation of olive mother plants identified by the single nurseryman and found free from the target pathogens, a voluntary certification system has been activated since 1987 at the national level by the Ministry of Agriculture. During the last 10 years, the legislation has been revised, and in late 2006 the revision process was completed with the publication of 2 decrees concerning the revised organisation of the system (DM 24/7/2003, DM 4/5/2006) and 4 decrees concerning the updated official technical operations for the certification of pomes, stone fruit, olive and strawberry (DM 20/11/06).

The DM 20/11/06 provides detailed guidance on the production of olive trees and rootstocks. Plant material produced according to this certification scheme is derived from nuclear-stock plants (also identified as Primary source) officially recognised and registered in the database of certified accessions by the Ministry of Agriculture (Table 2). The material deriving from the first multiplication of the nuclear-stock material enters in the certification process as Pre-basic material. Once the nuclear-stock has been registered, the breeders or Institutions or Research Centres responsible for its production and selection must keep the material under conditions that minimise recontamination risks.

The main outlines of the Italian certification scheme (Table 3 and Figure 1) are the following:

- a) **Registration of nuclear-stock material:** Breeders or researchers that intend to introduce a new accession for a specific variety in the certification system must provide detailed information about the trueness to type and sanitary controls performed by filling the official forms defined

in the DM 20/11/06. The evaluation and eligibility of the registration request is carried out by a technical certification committee authorised by the Ministry of Agriculture.

- b) Maintenance and propagation of Pre-basic material:** Pre-basic olive material derives directly from the propagation of the nuclear-stock; the Pre-basic plants must be maintained in insect-proof green-houses (at the Conservation for Premultiplication Repository) with at least two replications. The plants are grown in *V. dahliae* and *X. diversicaudatum* -free soil mixture and periodically tested for viruses using molecular tools (10% of the plants each year, starting from the 5<sup>th</sup> year). Molecular tests should be also performed if, after visual inspection, plants show symptoms of *V. dahliae* or phytoplasmas. Cuttings and seeds collected from the Pre-basic material is used to produce, in the same facilities, the Basic plants for the establishment of the Premultiplication Repository.
- c) Maintenance and propagation of Basic material:** Basic olive planting material is the propagation material that is obtained from Pre-basic material, maintained in open field (Repository for the Premultiplication) in a variable replication number (2 minimum) depending on the importance of the cultivar. Premultiplication field plots must be tested and found free from *V. dahliae* and *X. diversicaudatum*, and have a 20 meters non-cultivated border. Basic plants must be periodically inspected and tested as defined for the Pre-basic material. Cuttings and seeds collected from the Basic material are used to produce the certified mother plants for the establishment of the Multiplication mother blocks.
- d) Maintenance and propagation of Certified material:** Certified mother plants obtained from the propagation of the Basic material represent the source for nursery certified olive plant production. Mother plants are grown in open fields in variable replication numbers depending on the market of the specific cultivar. Plants are visually inspected at least once a year, while each plant must undergo laboratory tests for virus detection at least once within a 30-year period.
- e) Certified nursery productions:** Production takes place in authorized nurseries that join the certification program. The nursery production must comply with the requirements established by the DM 20/11/06 in terms of: (i) soil mixture (free from *V. dahliae*, *X. diversicaudatum*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *Pratylenchus vulnus*), (ii) location of the certifiable olive blocks; (iii) maintenance of a farm business registry. The regional phytosanitary service, following visual inspections and examination of the documentation, is in charge of releasing the official certification (blue label) for every single plant or seedling.

In order to facilitate the certification and the availability of certified material for new olive cultivars or clones, the Premultiplication and the Multiplication blocks may be created directly using planting material deriving from the first multiplication of the nuclear-stock. In this way, the timeframe between the approval of a new accession in the system and the availability of certified plants in the nurseries is effectively reduced.

This certification program has been supported until now mainly by public funds that cover the costs for the management of the Conservation for the Premultiplication and Premultiplication repositories; starting in 2012 the program should shift to a self-sustaining system, in which taxes recovered on each released certification label will make up for the costs of the repository management.

As aforementioned, the Italian voluntary certification program involves several woody crop species. In most cases, the main reason prompting for the certification of such accessions is the presence of pathogens that can cause detrimental effects on the affected plants (i.e. quarantine pests for stone fruit or citrus). Contrastingly, in the case of olive plants, the main aspect that promoted the adoption of this program has been the high level of genetic and phenotypic variability within each cultivar, which could results in heterogeneous plants and misidentification of such cultivars.

The certification scheme adopted in Italy ensures trueness-to-type and uniformity, since the certified plants are obtained through subsequent clonal propagation steps from a single registered accession.

## Conclusion

As remarked, olive has always been considered a very resistant species to diseases caused by different pathogens; however, several pathogens, mainly systemic, can affect the trees and, in some case, invalidate the production. Recent advances in plant pathology and molecular biology, significantly contributed to the discover of new olive pathogens, to characterize their genome, biology and epidemiology.

Italy has been amongst the first Countries to adopt an effective certification system for the production of plant propagation material with high quality standards. After 10 years from its promulgation the Italian Regulation has been revised with the support of a technical committee, in order to improve the program and meet the quality standards amended in the late '90 by the EU, which are mandatory for all member States. In 2006 a revised national Regulation was issued (DM 20/11/2006), updating the list of pathogens that need to be checked and implementing the protocols for their identification. In the last 5 years several valuable virus-free and true-to-type primary sources, belonging to the most widespread or local Italian varieties, have been registered, propagated through the certification system, and made available to the growers. Although, the EU directives and the Italian regulations concerning the production of olive propagation material have been critically revised and implemented, it is necessary to continuously update the list of the pathogens and the diagnostic protocols, including the latest tools for genetic and phytosanitary assessment. It should be considered for example that some specific olive viruses such as OLV-1, OLV-2 and OLRV are rare, infections are symptomless on olive plants, and there are no evidences about their threat to other crops. OLYaV is currently included in the list of the harmful pathogen for the Italian phytosanitary regulation, but even if OLYaV-infected trees are widespread, there are very few plants showing symptoms of yellowing, and more importantly the association of this virus with the OLY disease has not been clearly demonstrated. Regarding CMV and TNV, although these viruses are polyphagous and very damaging to other crops, they in olive are rare (CMV) or present only in a restricted geographical area (TNV- Portugal). On the basis of these data, the list of the viruses to be included in the phytosanitary certification program could be restricted to the following: SLRSV, CLRV (both are associated to manifest diseases either in olive plants or in other crops), ArMV (one of the harmful pathogens for *Fragaria*, *Rubus* and other crops) and perhaps TNV. Whereas, it is important to ensure that the certified olive material is free from phytoplasmas, *V. dahliae* and *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

Long distance movement of plant propagation material and the expansion of olive crops in new areas impose the use of common and harmonized certification procedures which are crucial to restrict the spread of harmful pathogens and pests.

## Literature cited

- Bottalico, G., Saponari, M., Campanale, A., Mondelli, G., Gallucci, C., Serino, E., Savino, V., Martelli, G.P. 2004. Sanitation of virus-infected olive trees. *Journal of Plant Pathology*, 86, 31
- Faggioli, F. and Barba, M., 1995. An elongated virus isolated from olive *Olea europaea* L.. *Acta Horticulturae*, 386: 593-599.
- Felix, M.R.F and Clara, M.I.E., 2002. Two necrovirus with properties of Olive latent virus 1 and of

- Tobacco necrosis virus from olive in Portugal. Proc. 4<sup>th</sup> International Symposium on olive growing, Bari, 2000. Acta Hort. 586: 725-728.
- Gallitelli, D. and Savino, V. 1985. Olive latent virus 1. A single-RNA spherical virus isolated from olive in Apulia (southern Italy). *Annals of Applied Biology*, 106: 295-303.
- Leva, A.R., Petrucelli, R., Muleo, R., Goretti, R., Bartolini, G. 1995. Influenza di fattori trofici, regolativi e condizioni del mezzo nutritivi sulla coltura in vitro di diverse cultivar di olivo. In *Proceeding: L'olivicoltura mediterranea: stato e prospettive della ricerca*. Rende (CS, Italy), 1995: 239-248.
- Martelli G.P. 1981. Virus diseases of olive: do they exist?. *Informatore Fitopatologico*, 31:97-100.
- Martelli, G. P., Yilmaz, M. A., Savino, V., Baloglu, S., Grieco, F., Güldür, M. A., Greco, N., La Fortezza, R. 1996. Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a seemingly new necrovirus. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 527-536.
- Materazzi, A., Toni, S., Panattoni, A., Osti, M., Triolo, E. 1996. Alcune evidenze sulla presenza di un nuovo virus isodiametrico in *Olea europaea* L. *Atti Convegno Annuale della Società Italiana di Patologia Vegetale*, Udine 1996, 57-59.
- Rugini, E. 1984. In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientiae Horticulturae*, 24: 123-134.
- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., La Notte, P., Savino, V., Scarito, G., Martelli G.P. 1999. Partial molecular characterisation and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, 81, 37-45.
- Savino, V., Barba, M., Gallitelli, D. 1979. Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 18:135-142.
- Savino, V. and Gallitelli, D. 1981. Cherry leafroll virus in olive. *Phytopathologia Mediterranea*, 20: 202-204.
- Savino, V. and Gallitelli D. 1983. Isolation of cucumber mosaic virus from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 22:76-77.
- Savino, V., Gallitelli, D., Barba, M. 1983. Olive latent rigspot virus, a newly recognized virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology*, 103: 243-249.
- Savino, V., Piazzolla, P., Di Franco, A., Martelli, G.P. 1984. Olive latent virus 2, a newly recognized virus with differently shaped particles. *Proceeding of the VI Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, Cairo 1984, 24-26.
- Savino, V., Sabanadzovic, S., Scarito, G., Laviola, C., Martelli, G. P. 1996. Two olive yellows of possible viral origin in Sicily. *Informatore Fitopatologico* 46(5): 55-59.
- Triolo, E., Materazzi, A. and Toni, S. 1996. An isolate of tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea* L. *Advances in Horticultural Science*, 10:39-45.

Table 1. List of olive viruses.

Acronym	Virus species	Genus	Geographical distribution
OLV 1	<i>Olive latent virus 1</i>	<i>Necrovirus</i>	Italy, Jordan, Portugal, Egypt, USA, Lebanon, Syria, Turkey, Tunisia
OLV 2	<i>Olive latent virus 2</i>	<i>Oleavirus</i>	Italy, Syria, Croatia, Lebanon, Tunisia
OLV 3	<i>Olive latent virus 3</i>	<i>Marafivirus</i>	Greece, Italy, Lebanon, Malta, Portugal, Syria, Tunisia, Turkey
OLRSV	<i>Olive latent ringspot virus</i>	<i>Nepovirus</i>	Italy, Portugal, Syria, Tunisia
OYVaV	<i>Olive vein yellowing associated virus</i>	<i>Potexvirus</i>	Italy
OYMDaV	<i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i>	Unclassified	Italy
OLYaV	<i>Olive leaf yellowing associated virus</i>	<i>Closteroviridae</i> , unassigned species	Albania, Croatia, Egypt, Italy, Israel, Lebanon, Spain, Syria, Tunisia, USA
OSLV	<i>Olive semilatifolius virus</i>	Unclassified	Italy
OMMV	<i>Olive mild mosaic virus</i>	<i>Necrovirus</i>	Portugal
SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	<i>Secoviridae</i> , unassigned species	Croatia, Egypt, Italy, Lebanon, Portugal, Spain, Syria, Tunisia, Turkey, USA
CLRV	<i>Cherry leafroll virus</i>	<i>Nepovirus</i>	Croatia, Egypt, Italy, Lebanon, Portugal, Spain, Syria, Tunisia, Turkey, USA
ArMV	<i>Arabis mosaic virus</i>	<i>Nepovirus</i>	Egypt, Italy, Lebanon, Portugal, Syria, Turkey, USA
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	Croatia, Italy, Portugal, Spain, Syria, Tunisia, Turkey, USA
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Italy
TNV	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Necrovirus</i>	Portugal

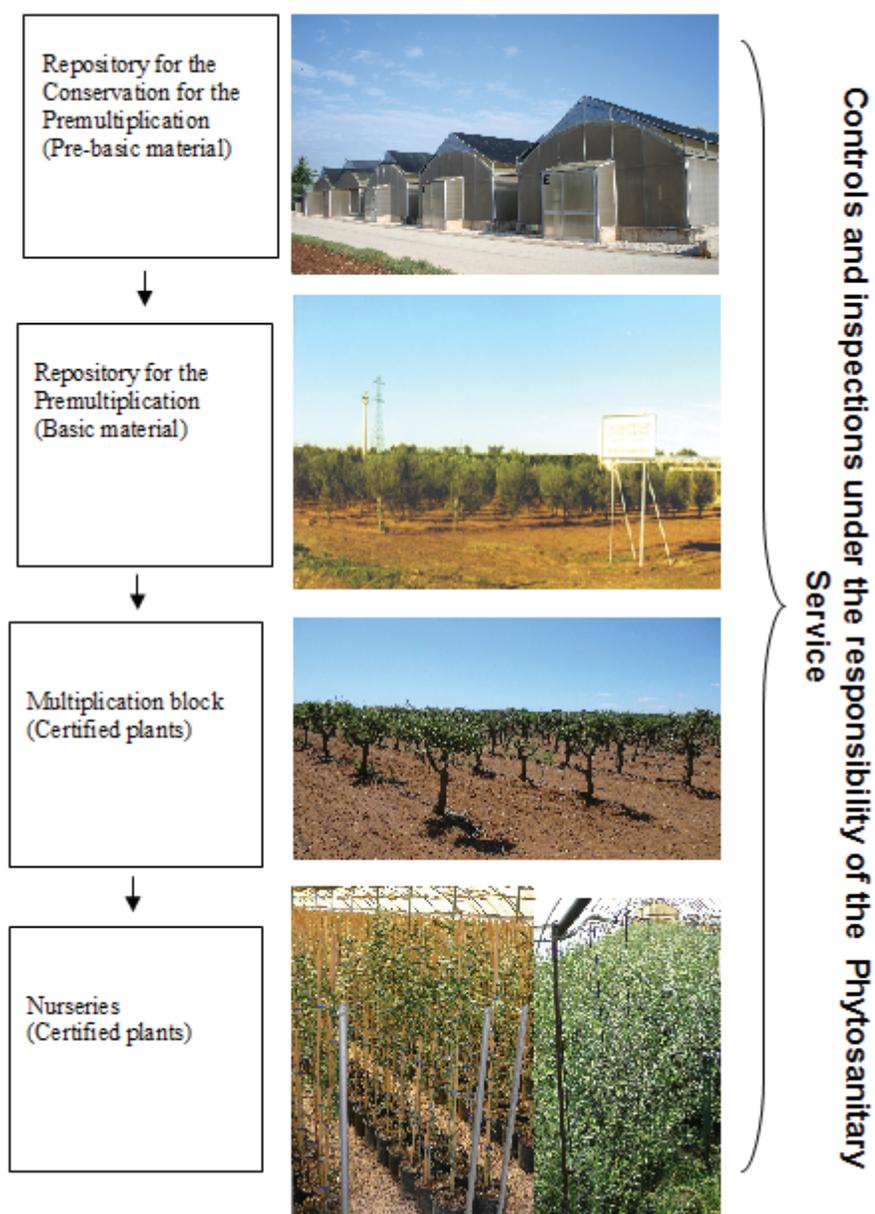
Table 2. Pathogens and pests that must be absent in order to register “virus-free” or “virus-tested” primary sources (nuclear stock) according to Italian law (DM 20/11/2006)

Harmful organisms	Sanitary status		
	Acronym	Virus-free (VF)	Virus-tested (VT)
<b>VIRUSES:</b>			
Arabis mosaic	ArMV	X	X
Cherry leafroll	CLRV	X	X
Strawberry latent ringspot	SLRSV	X	X
Cucumber mosaic	CMV	X	
Olive latent 1	OLV-1	X	X
Olive latent 2	OLV-2	X	
Olive leaf yellowing associated	OLYaV	X	X
Tobacco necrosis	TNV	X	
<b>PHYTOPLASMAS</b>		X	X
<b>FUNGI:</b>			
<i>Verticillium dahliae</i>		X	X
<b>BACTERIA:</b>			
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>		X	X

Table 3. Organization of the Certification program for olive propagating material

Steps	Plant category	Facilities	Current active Repository for olive certified material in Italy	Controls and certification released by
Selection of Nuclear-stock	Nuclear-stock	Screen-houses	Several Research Centers	Regional Phytosanitary Services
Conservation for Premultiplication	Pre-basic	Screen-houses	- CRA-PAV Rome - University of Bari - Azienda Agricola Sperimentale “Improsta”	
Premultiplication	Basic	Open field	- CRA-PAV Rome - CRSA Basile Caramia, Bari - Azienda sperimentale di Santa Paolina, Follonica - CAV Tebano	
Multiplication	Certified	Open field	Consorzio Vivaistico Pugliese	
		Nurseries	--	

Figure 1. Outline of the general certification steps and facilities



# Olive (& drupes) Tri Acyl Glycerols adaptation to the temperature of growth: the databases.

G. Bongi and C. Ranocchia

CNR ISAFoM PG

Via Madonna Alta 128 06128 Perugia ITALY

guido.bongi@cnr.it, claudio.ranocchia@cnr.it

## Abstract

The oils extracted from seeds and mesocarp differ in their sensitivity to temperature and a good correlation was found between the ratio of oleic to the sum of linoleic and palmitic fatty acids of storage lipids, (IQ), and both oil oxidative stability and condensation temperature of flesh oil. Seed oil increases IQ if higher temperatures occur at grain filling stage, but the response of fleshes is complex and reverted. A contrast analysis using the same genotypes in two different locations with small variation in total heat but asynchronous in their maxima, reveals that the first period of fruit enlargement after fruit set in summer determines the oil composition when oil content is very low. The length of this sensitive period is between 3 to 4 weeks and affects final fruit composition in late autumn, irrespective of maturation temperature.

**Keywords:** Drupes, oil quality, climatic adaptation, Tri Acyl Glycerols

Tri Acyl Glycerols in short TAGs, are the main source of human fat diet and can be originated in different biota; high healthy value compete to vegetable TAGs with high oleic acid content, eventually rich in minor components of nutraucetic value; several minor components are however labile. Drupes flesh are the main source of pressure oils and this condition would preserve components active in heart attack prevention or with nutraucetic value, provided the extraction temperature is maintained near the ambient and the process is made on freshly picked fruits. Main drupe species are *Elaeis* spp. the oil palm, *Persea americana* the avocado, and *Olea europea* the olive: oil drupes thrive from Equator to Mediterranean north border. Oil from Palm requires steam treatment of fruits and is not a virgin oil source although being dominant in amount, use, heat resistant vitamins, and revenue. Recently Palm drupes were proved to be a good molecular model for oil accumulation (Chapman and Ohlrogge, 2011). *Persea* oil covers a niche market with no significance but can be a reference for olive oil adaptation in subtropical locations, where olive cultivation is unfeasible for lack of chilling (Gaydou et al., 1987). Palm cultivation is done near the Equator and its seasonal variation in TAGs is probably due to drought cycles or to higher temperatures under clear sky, but the Acyl composition is too distant from other dicot drupes to allow the same framework, even if fatty acid synthase activation can be the same.

Quality of oil depends on intrinsic and subjective evaluations, but a short bench-life and high condensation temperature are objective aspects that degrade the value of an oil. Incidentally an high

Linoleic and Palmitic relative proportion to Oleate in TAGs is responsible for these characters and occurs in reactive compensation when temperature of growth increases above a limit (Lombardo et al., 2008; Bonghi, 2011). For any given Oleate decrease, the variation is reflected better by the sum of Palmitic and Linoleic moieties than considering one of them (Bonghi 2011). This is probably the main adaptation in *Persea* and *Olea* for an effect of location on oil composition. These differences appear for discrete variations in heat sum due to more than 5 degrees in latitude or than 15% in Growing Degree Days over 0°C (here briefly GDD); GDD is measured in Days after Pit Hardening (DAPH) time units; screening variables other than temperature gave scarce evidence of effect in 16 published or lab archives of our consultants (Bonghi, 2011). Cool or warm condition of growth were applied in a number of location essays, but in places not too far apart, like in altitude trials. Altitude variation in olive origins are frequently reported in literature (i.e. 'sierra' and 'campiña' oils in Spanish literature or 'collina' and 'pianura' in Italy for 'hill' and 'plane' respectively, Rial and Falqué, 2003) but in the majority of cases conditions are too close each other to exert any effect. The risk of frost during winter above 900 m in Mediterranean, makes unfeasible severe chilling treatments and at moderate gaps in altitude, seldom a GDD variation over 15% is found, if the reference scale is drawn relative to maturation index.

In all these cases in *Olea* and *Persea* TAGs, the Oleic ratio to the sum of Palmitic and Linoleic here defined as Index of potential Quality or IQ, declines accordingly to the heat sum during maturation, and this evidence is antithetic to seed oil sensitivity, even in their own kernels. In seed and kernel oils a lesser Linoleic to Oleic ratio in TAGs is present if temperature during seed maturation is increased but Palmitic moiety is not causally linked to changes. In olive flesh oil there are a set of TAGs composition relative indexes for un-saturation, or Oleic proportion used in quality marketing, but Stearic or Linolenic moieties are not affected in the same way. These indexes resulted less accurate of IQ, in the regression to growing temperature (Bonghi, 2011), possibly because they lack both the information of a compensative variation in Palmitic moiety. A reason for this can only being hypothetical, but it was already partly observed *in vitro* and in tissues (Hernández et al., 2008). IQ was offering a stable solution to predicting cv. fitness once known a GDD. Reason for this adaptation are rather obscure being the TAGs an open reserve pool. The accumulation is regulated by fatty acid synthases and desaturases but enzyme turnover and multifunction activators are an evident variator in model plants (Millar et al., 2000).

Tissue specificity plays a major effect. Fleshes oil lacks oleosin. Oleosin membrane bound oleosomes (i.e. small oil bodies with membranes) can be found only in kernels of drupes and in all seed reserves but are absent in their fruit flesh. A fundamental question is the pattern of sensitivity during fruit cycle. These drupes follow a double sigmoid growth curve in fresh weight and their cycle is so extended that it difficult to pick up a critical time in an interval of 4 to 7 months. The rates of oil formation and the maturity index do not determine thermal sensitivity of IQ below a critical limit of GDD. Drupes with the same oil content and maturation behaved differently if GDD was above a limit. Genetic variation is also present but we did not find any insensitive variant. Under strong heat flux IQ declines rapidly as maturation proceeds but this dependency on maturation is absent below a thermal limit (Fig.1). Some of Mediterranean olive orchard are quite hot but produce good oils and possibly different climatic stability or critical periods can be the reason for this variation. Experiments were done by conditioning attached fruits during the late sigmoid phase in the province of La Rioja in western Argentina, when the oil accumulation was active, but this lead to small if significant differences that however follow IQ drop but are very limited to exert a specific control (C. Rousseaux, pers. commun., 2010). The target phase and possibly a critical time are obscure and the only attempt available was trying to extract some information from archives.

Some database contains climatic information or a generic climate can be made available in areas with gridded records from remote sensing distributed series. One of major obstacles is the evidence of mixed genotypes in different places. TAGs composition varies also with the genotype. In Andalucía the very large 'Picual' area is mono-varietal and location trials were done recently in order to find the optimal production areas (Rial and Falqué, 2003). Interestingly this area is rather high in GDD but the IQ is over 4.9 in all case with an excellent oil. We lacked a proper set reference trials for meta-analysis of variances in quantitative terms, but a 'Picual' series in Sumalao of Catamarca in north Argentina (A.Matias, INTA Catamarca, pers. commun., 2002) offered a suggestive information. This can be refereed as heuristic or Serendip statistic but in our opinion offers a new interpretation and it is possibly worth of attention.

The heat sum in Catamarca was very close to Andalucía dataset (Rial and Falqué, 2003, Andalucía is the origin of this major cv.) with only 4.41% less GDD relative to Argentina but IQ dropped from 5.11 to 2.49 (-51%, Tab. 1) at approximately the same oil rate and maturation index. For the rest of datasets was difficult to identify discriminant conditions within similar GDD. One possible interpretation for Rial-Matias difference is that series GDD are asynchronous (Fig. 2).

The small heat sum difference in Rial-Matias series is often found in by-years in the same location and we might expect that in Andalucía this heat difference would have produced almost the same composition in TAGs. Actually the oils are completely different. Oil rate is maximal after 80 DAPH and before 100 but is absent in sensitive periods. The easiest interpretation is linked to the number of days over 30°C but in an early date of fruit development in between 0 and 30 days after pit hardening. If confirmed with substitution experiments like conditioning fruits and whole gene expression profiles, this might well result as a case of a transcriptional regulation of factors present during fruit formation that change function during oil accumulation or to enzyme critical turnover rates (O'Quin et al. 2010).

## Discussion

Several new perspectives are open but require specific trials. The activators of Wrinkled 1 (Wr1) transcription factor in Palm drupes differs from those identified on seeds (Chapman and Ohlrogge, 2011) and Wr1 is highly expressed more during oil accumulation. Oil Palm drupes accumulate oil instead of sugars in date palm, but the major expression difference between palms was at the level of same early fatty acid biosynthesis, like Pyruvate Dehydrogenase which is the source of acetyl Coa. Oil unsaturation and acetyl Coa carboxylase elongation between C16 and C18 as well fatty acid desaturases are only possible targets, but it is already known that delta 3 desaturases protein turnover is regulated by temperature in seeds (O'Quin et al. 2010). Wr1, Pyruvate Dehydrogenase and FAD transcription factors as well FAS protein turnover are all complex systems regulated by activators in promoter chains that are tissue specific and experimentally they change between seeds and fleshes, but unfortunately the pool composition of monocot flesh is very distant from Avocado and Olive final equilibrium. Specific experiments on gene expression profiles are required.

At application level a careful survey of late spring climate can lead to a better fitness of new plantations of olive, and cv. thermal sensitivity requires more attention under controlled conditions in order to define fitness of a place for the market.

## Acknowledgement

The activity has been made possible by project Agriscenari, a grant MIPAF after D.M. 8608/7303/2008.

## Literature cited

- Bongi, G. 2004. Modelli produttivi in olivicoltura. *Olivo ed olio Edagricole* vol. 9, pp. 8-15.
- Bongi, G. 2011 *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* , 113 S1, 1-46 9th Euro Fed Lipid Congress, Rotterdam
2011. Lecture abstracts 13. Possible Linkage between Temperature of Growth and Oil Composition by Climate Contrast Experiences.
- Chapman, K.D. and Ohlrogge J.B. 2011. Compartmentation of Triacylglycerol accumulation in Plants .*The J. of Biological Chemistry*, November 16, 2011, DOI 10.1074/jbc.R111.290072.
- Gaydou, E.M., Lowno, Y. and Ratovohery, J. 1987. Triglyceride and fatty acid compositions in the mesocarp of *Persea Americana* during fruit development. *Phytochemistry* 26, No. 6, pp. 1595-1597.
- Hernández, M.L., Guschina I.A., Martínez-Rivas J.M., Mancha, M., Harwood, J.L. 2008. The utilization and desaturation of oleate and linoleate during glycerolipid biosynthesis in olive (*Olea europaea* L.) callus cultures. *J Exp Bot*; 59:2425-35.
- Ivanov, S. 1927. Dependence of the chemical composition of oil containing plants on the climate *Oil and fat Ind.* 5, 29.
- Huang, A.H.C. 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 43, 177-200.
- Lombardo, N., Marone, E., Alessandrino, M., Godino, G., Madeo, A., Fiorino, P., 2008. Influence of growing season temperatures in the fatty acids (FAs) of triacylglycerols (TAGs) composition in Italian cultivars of *Olea europaea*. *Adv. Hort. Sci*, 22(1), 49-53.
- Millar, A., Smith, M.A., and Kunst, L., 2000. All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends in Plant Science* n°5 96-101.
- O'Quin, J.B., Bourassa, L., et al. 2010. Temperature sensitive post translational regulation of plant Omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, NO. 28, pp. 21781-21796.
- Rial, D.J., Falqué, E., 2003 Characteristics of olive fruits and extra-virgin olive oils obtained from olive trees growing in Appellation of Controlled Origin 'Sierra Mágina'. *Journal of the Science of Food and Agriculture J. Sci. Food Agric.* 83 9 912-919.
- Weselake, R.J., Taylor, D.C., et al. 2009. Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnology Advances* 27 866-878.

Table I: The Andalucía-Catamarca (A-C) contrast analysis on Picual oil, taken at the same Maturation index; GDD were obtained from field station and INGRID server at Columbia University. Heat were 2682 (A) and 2806 (C) GDD.

	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3		
	(7.5-20)	(0.3-3.5)	(0.5-5)	(55-83)	(3.5-21)	(0-1)	IQ	
Picual Cat.	16.32	2.05	2.69	68.22	9.97	0.72	<b>2.594903</b>	
Picual And.	9.9	nd	3.2	77.8	5	0.7	<b>5.221477</b>	

### TAGs during ripening, Spring Heatburst on/off

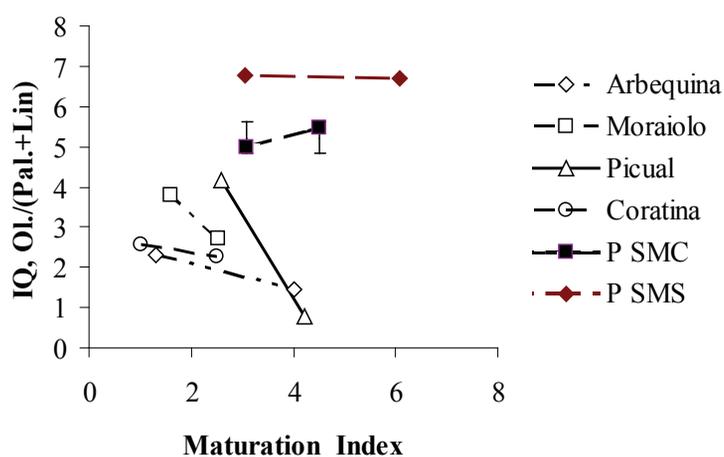


Fig. I. Variation in IQ, the ratio of oleic TAG to the sum of palmitic and linoleic was taken on different locations and cv. Open symbols depict Catamarca in North-east Argentina. Closed symbols represent Picual at two different altitudes in Andalucía. This last set lacked frequent heat bursts in the end of spring until mid-summer interval.

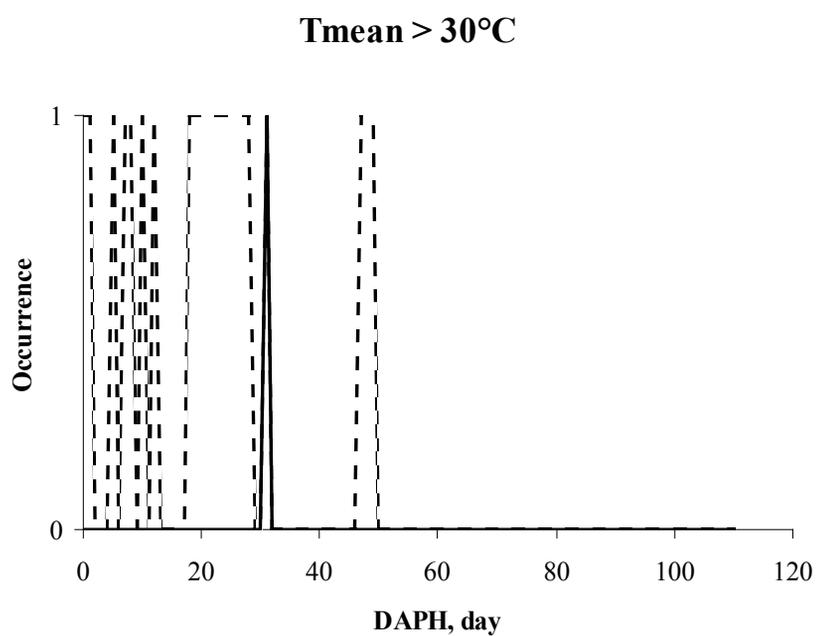


Fig.2. Discriminant analysis for Rial Matias series. The maximal separation was obtained selecting the n° of days over 30° C of daily mean temperature. Grey lines are for C series (Matias) and black lines for A one. This procedure defines the heat burst type.

# Olivicoltura sostenibile e gestione del suolo

N. Vignozzi<sup>1</sup>, A. Agnelli<sup>1</sup>, M. Platinetti<sup>1</sup>, S. Pellegrini<sup>1</sup>,  
S. Simoncini<sup>1</sup>, M. Pagliai<sup>1</sup>, C. Xiloyannis<sup>2</sup>, G. Celano<sup>2</sup>,  
A.M. Palese<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CRA-ABP - Firenze

<sup>2</sup>UNIBAS - DiCEM - Matera

## Riassunto

Si riportano i risultati di una ricerca volta a valutare gli effetti di due diverse modalità di gestione dell'oliveto, finalizzate alla conservazione o al reintegro della sostanza organica (s.o.) nel terreno. La prima basata sull'adozione di tecniche conservative alternative alle lavorazioni: un sistema di gestione sostenibile (inerbimento spontaneo, trinciatura del materiale di potatura, mulching) a confronto con quello convenzionale (lavorazioni superficiali, allontanamento del materiale di potatura). La seconda volta a valutare gli effetti di differenti apporti di s.o. proveniente da sottoprodotti della filiera olivicola: acque di vegetazione (AV) e due dosi diverse di compost da sansa olearia (CS1) (CS2). CS1 ha fornito i migliori risultati in termini di capacità di accumulo e di umificazione del C organico apportato. Nel sistema sostenibile si è osservato un aumento di C organico totale (TOC) nello strato superficiale (0-10 cm); la macroporosità, seppure non elevata, è omogeneamente distribuita lungo il profilo. Al contrario, in quello convenzionale le lavorazioni hanno provocato una generale diminuzione del tenore di s.o. e la formazione di uno strato compatto a circa 10 cm di profondità; ciò, unitamente alla formazione di croste superficiali, ha contribuito all'innescio di processi di erosione incanalata e conseguenze negative sulla formazione della riserva idrica.

**Parole chiave:** *Olea europaea*, sostanza organica, inerbimento, lavorazioni, reflui oleari, compost, erosione

## Abstract

*Trials were carried out to evaluate the effect of different management techniques for maintaining or restoring soil organic matter. Conventional System vs. Sustainable System, and different olive oil industry wastes used as fertilizers were tested. Compost from olive husk increased TOC and humic C content. In the Sustainable System soil organic matter content increased, macroporosity was homogeneously distributed along the profile. This favoured the vertical water movement down to the deeper horizons so increasing soil water storage and avoiding water erosion.*

## Introduzione

Secondo l'OCSE, perché l'agricoltura possa essere definita sostenibile occorrono tre requisiti: - produzione di reddito per l'agricoltore;

- garanzia di condizioni di qualità e di sicurezza per agricoltore e per consumatore;
- una durata indefinita delle risorse ambientali e della produttività del suolo.

Maggiore attenzione deve essere posta alla gestione del suolo e al suo impatto sulle produzioni e sull'ambiente. Recentemente si è sviluppato un valido approccio alla qualità ambientale nei settori della produzione agricola ed agro-alimentare, rappresentato da forme di assicurazione, quali la cosiddetta Dichiarazione Ambientale di Prodotto (DAP). La DAP è un documento stilato su base volontaria e, ove richiesto, verificato e validato da Organismi di parte terza, che contiene informazioni oggettive, sull'impatto ambientale del prodotto alimentare relativamente alla sua shelf life, costituendo un importante strumento che evidenzia e assicura le performance ambientali del prodotto, rendendolo più accettato dal consumatore attento all'ambiente. Nel settore olivicolo-oleario alcuni produttori si stanno muovendo in questa direzione; questo potrebbe essere un valido strumento per valorizzare le produzioni, conquistare nuove fasce di mercato in cui collocare il prodotto, conservare il territorio e tutelare il paesaggio.

Per quanto riguarda il suolo, l'obiettivo principale di una gestione sostenibile è quello di aumentare o mantenere adeguati livelli di sostanza organica (s.o.). Il ruolo fondamentale della s.o. per l'equilibrio dell'ecosistema suolo-pianta-atmosfera è ampiamente riconosciuto, tanto che a livello politico comunitario (Thematic Strategy for Soil Protection) la perdita di è stata inserita fra le principali minacce a carico del suolo; a livello nazionale il mantenimento di adeguati livelli di s.o. è fra gli obiettivi di protezione ambientale del Piano Strategico Nazionale e fra quelli previsti da alcuni PSR.

In molte zone olivicole, soprattutto dell'Italia meridionale, gli agricoltori adottano tecniche di aridocoltura, che affidano alle lavorazioni meccaniche il controllo delle infestanti e l'accumulo e la conservazione dell'acqua nel suolo. Questa pratica, pur molto diffusa, presenta diversi aspetti negativi che la connotano come tecnica "depauperatrice". Le lavorazioni del suolo, soprattutto in ambiente mediterraneo, sono infatti causa di diminuzione del contenuto di s.o. (Piovanelli et al., 2006).

Scopo del presente lavoro è valutare gli effetti di due modalità di gestione per mantenere o reintegrare s.o. al terreno: i) Adozione di tecniche di gestione conservative, alternative alle lavorazioni come per esempio l'inerbimento controllato; ii) Apporto di s.o. attraverso la restituzione dei sottoprodotti della filiera olivicola (compostati o tal quali).

## Materiali e metodi

In un oliveto situato in agro di Ferrandina (MT), costituito da piante mature di olivo a duplice attitudine (cv. Maiatica) allevate a vaso e con sesto d'impianto di circa 8x8 m, sono stati posti a confronto due sistemi di gestione: i) Aziendale: lavorazione a 10 cm con fresatrice, potatura intensa ogni due o più anni; materiale di potatura allontanato dal campo. ii) Sostenibile: inerbimento spontaneo, almeno 2 sfalci per anno, e materiale di potatura trinciato e lasciato in campo (mulching), potatura lieve annuale. Sul suolo (franco sabbioso - Typic Haploxerept - Soil Survey Staff, 2003) è stato determinato carbonio organico totale (TOC), estraibile (TEC) e umico (HC) secondo il Metodo Ufficiale SISS (Sequi e De Nobili, 2001). La misura della macroporosità e la caratterizzazione della struttura del suolo è stata eseguita attraverso l'analisi micromorfometrica di sezioni sottili di suolo ottenute da campioni indisturbati (Pagliai et al., 2004). La misura della conducibilità idraulica satura ( $K_{sat}$ ) è stata determinata in campo con il permeometro di Guelph (ASTM, 1990). Nel corso della sperimentazione sono state effettuate misure sistematiche dell'umidità del terreno mediante gessetti Bouyoucos collocati, sino ad una profondità di 200 cm, in aree pianeggianti e declivi (posizione alta, media e bassa del versante). I gessetti sono stati preventivamente tarati in laboratorio per la definizione della relazione descrittiva contenuto idrico volumetrico/valori di resistività.

In un oliveto situato in agro di Matera, costituito da piante allevate a vaso con sesto d'impianto regolare 10x10 m (cv. Cima di Taranto e Ghiannara), sono stati valutati gli effetti di differenti apporti

di s.o. proveniente da diversi sottoprodotti della filiera olivicola (Tab.1): i) spandimento di Acque di Vegetazione (AV); ii) distribuzione di Concime Organo-Minerale (Progres micro) (COM), utilizzato come controllo; iii) distribuzione di Compost da Sansa olearia in 2 quantità, una (CS2) il doppio dell'altra (CS1). Il suolo, a tessitura, è classificato come. La prova è iniziata nel 2006; nel 2007 e 2008, ad aprile e settembre, sono stati prelevati campioni nello strato superficiale (0-10 cm) del suolo (franco limoso argilloso - Vertic Calcixeroll - Soil Survey Staff, 2003) su cui è stato determinato il TOC e su quelli del settembre 2008 anche TEC e HC.

## Risultati e discussione

I risultati della ricerca condotta a Ferrandina confermano l'effetto positivo dell'inerbimento, rispetto alla lavorazione, sull'accumulo del carbonio nel suolo. Differenze significative si registrano soprattutto nello strato 0-10 cm (Fig. 1). Questi risultati sono confermati dall'analisi della porosità (Fig. 2). Nel suolo della gestione Aziendale/lavorata la macroporosità dello strato più superficiale risulta superiore a quella della Sostenibile/inerbita, ma nell'orizzonte sottostante i valori diminuiscono drasticamente, scendendo al di sotto del limite del 5% oltre il quale un suolo si definisce molto compatto (Pagliai, 1988). La macroporosità del suolo inerbito, seppure non molto elevata, risulta omogeneamente distribuita lungo tutto il profilo. Ciò ha importanti riflessi sui movimenti dell'acqua. I valori di  $K_{sat}$  misurati seguendo la metodologia standard per l'uso del permeometro di Guelph risultano più elevati nel lavorato. Le stesse misure ottenute limitando i movimenti laterali dell'acqua evidenziano una marcata diminuzione della  $K_{sat}$  nel lavorato. La conducibilità da media passa a molto-bassa (Rossi Pisa, 1997); la diminuzione registrata nell'inerbito non risulta significativa (Tab. 2). Nelle due gestioni il suolo ha quindi un diverso comportamento idrologico: nel sistema Sostenibile l'acqua si infila nel terreno e si muove lungo l'intero profilo senza trovare ostacoli; al contrario, nel sistema Aziendale si riscontra una minore capacità di accettazione delle piogge, sia in termini di infiltrazione a causa della presenza di croste superficiali, sia in termini di permeabilità lungo il profilo per la presenza di uno strato compatto in corrispondenza del limite inferiore della lavorazione. Ciò determina l'insorgere di fenomeni di degradazione del suolo, quali l'erosione incanalata e la solifluzione in occasione dei sempre più frequenti eventi piovosi di breve durata ed elevata intensità, e il mancato accumulo di acqua negli strati più profondi, come confermato anche dai risultati relativi al monitoraggio del contenuto idrico del suolo. La quantità di acqua immagazzinata dal sistema Sostenibile/inerbito nei primi 2 metri di terreno è significativamente più elevata rispetto a quanto misurato nel sistema Aziendale/lavorato. Questo si è verificato soprattutto nella parte alta dei versanti ( $1710 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  del Sist. Sostenibile contro  $750 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  dell'Aziendale, accumulata nel periodo 12/02/2007 - 10/04/2007. Piogge totali nel periodo: 167 mm). In particolare, il sistema Sostenibile/inerbito, a differenza dell'Aziendale, è stato in grado di immagazzinare le acque di precipitazione autunno-invernali negli strati più profondi, ovvero da 100 a 200 cm. Probabilmente l'acqua tesaurizzata diviene poi disponibile per le piante di olivo, caratterizzate da apparato radicale profondo, nel periodo di massima richiesta idrica.

I valori di TOC (Tab. 3) registrati durante i due anni di monitoraggio nella prova condotta a Matera, mostrano sempre differenze significative fra i trattamenti; in generale CS1 presenta i contenuti più alti mentre CS2, a fronte di quantità elevate di carbonio apportato, fa registrare i valori più bassi. Si rilevano comunque incrementi in entrambe le epoche del 2008 rispetto al 2007 (DApr e DSet), evidenziando un effetto residuo di tutti i trattamenti. Il frazionamento della s.o. eseguito a fine prova dà indicazioni sulla qualità del carbonio accumulato nel suolo (Fig. 3). La tesi CS1, oltre ad avere i più alti contenuti di TOC, presenta anche le più elevate quantità di TEC e HC; AV e COM hanno un

comportamento simile, fatta eccezione per HC, significativamente più basso in AV. I risultati meno soddisfacenti si registrano anche in questo caso nella tesi CS2.

## Conclusioni

I risultati ottenuti a Ferrandina indicano che il sistema Sostenibile è in grado di aumentare la dotazione di s.o. del suolo, sia in termini di TOC che di HC. I fenomeni erosivi imputabili alle lavorazioni possono essere limitati, se non impediti, con l'inerbimento. Nelle condizioni dell'area di studio la pratica diffusa delle lavorazioni come tecnica di aridocoltura non consente il raggiungimento dell'obiettivo per cui viene adottata. Le modificazioni indotte sulla struttura del suolo, riducendo la capacità di accettazione delle piogge, ostacolano di fatto la formazione di una adeguata riserva idrica.

I risultati ottenuti a Matera individuano in CS1 la tesi che meglio risponde agli obiettivi della ricerca risultando migliore in termini di capacità di accumulo e di umificazione del C organico apportato. L'apporto di elevate quantità di carbonio (CS2) non si traduce in un aumento proporzionale della dotazione di s.o. nel suolo, probabilmente perchè tali dosi di ammendante interagiscono con difficoltà con il terreno, conferendogli caratteristiche tali (maggiore idrofobicità e minore resistenza al taglio) da renderlo più vulnerabile all'erosione. Particolare attenzione deve essere quindi posta alla qualità e alla quantità di s.o. da apportare.

## Ringraziamenti

Si ringraziano il Dott. Donato Ferri del CRA - SCA di Bari e i suoi collaboratori.

## Bibliografia

- ASTM 1990. Standard Guide for Comparison of Field Methods for Determining Hydraulic Conductivity in the Vadose Zone. Designation: D 5126 - 90 (Reapproved 1998), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Pagliai, M. 1988. Soil porosity aspects. *Int Agrophysics*, 4:215-232.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., Pellegrini, S. 2004. Soil structure and the effect of management practices. *Soil Till. Res.*, 79:131-143.
- Piovanelli, C., Gamba, C., Brandi, G., Simoncini, S., Batistoni, E. 2006. Tillage choices affect biochemical properties in the soil profile. *Soil Till. Res.*, 90:84-92.
- Rossi Pisa, P. 1997. Conducibilità idraulica del suolo saturo. In: *Metodi di analisi fisica del suolo* (M. Pagliai coord.), Franco Angeli, Roma VIII 69-87.
- Sequi, P., De Nobili, M. 2001. Frazionamento del carbonio organico. In: *Metodi di analisi chimica del suolo* (P. Violante coord.), Franco Angeli, Roma VIII 1-13.
- Soil Survey Staff, 2003. *Keys to Soil Taxonomy*. 9<sup>th</sup> Edition. USDA-NRCS. Washington, D.C.

Tabella 1. Quantità di N, TOC e biomasse apportate con i diversi trattamenti

Trattamenti	N° piante	Quantità per pianta	Quantità di N per pianta (g)	Quantità di TOC per pianta (kg)	Superficie totale trattata (m <sup>2</sup> )	Quantità totale distribuita
AV	6	800 lt	640	20,0	600	4800 lt
COM	6	15 kg	900	3,7	600	90 kg
CS1	6	60 kg	900	14,8	600	360 kg
CS2	6	120 kg	1800	29,6	600	720 kg

Tabella 2. Valori di  $K_{sat}$  misurati nelle due gestioni.

Tesi	$K_{sat}$ (Guelph) (mm h <sup>-1</sup> )	Classe di Conducibilità saturata
Inerbito	12,92	medio bassa
Lavorato	45,00	media
Inerbito (*)	6,67	medio bassa
Lavorato (*)	0,54	molto bassa

(\*) misure effettuate limitando i flussi idrici laterali

Tabella 3. Quantità di TOC del suolo, per ogni epoca di campionamento, nei diversi trattamenti; risultati con lettera diversa sono significativamente differenti ( $P < 0,05$ ) secondo il test di Duncan.

Trattamenti	Apr_07	Set_07	Apr_08	Set_08	DApr	DSett
	g kg <sup>-1</sup>					
AV	13,0 bc	12,2 a	16,2 b	15,5 ab	3,2	3,3
COM	13,2 ab	11,1 b	15,7 b	14,5 b	2,5	3,4
CS1	13,9 a	11,8 ab	17,7 a	16,4 a	3,8	4,6
CS2	12,4 c	9,9 c	13,0 c	12,6 c	0,6	2,7

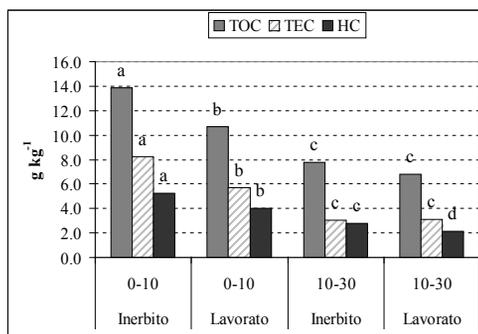


Figura 1. Frazionamento della sostanza organica del suolo a Ferrandina (MT).

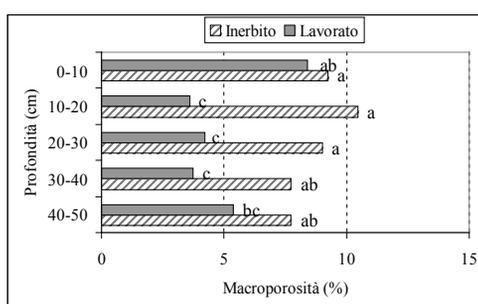


Figura 2. Valori di macroporosità (pori > 50 mm) alle differenti profondità.

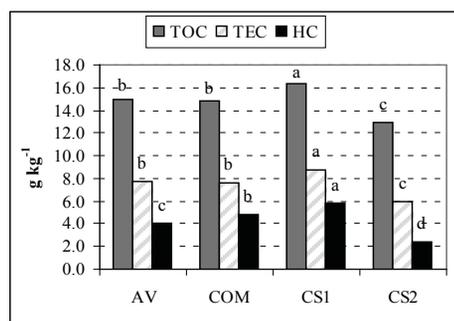


Figura 3. Frazionamento della sostanza organica del suolo a Matera.

# Advances in harvesting and pruning of olive trees

A. Tombesi

University of Perugia, Italy. agostinotombesi@gmail.it

## Abstract

In the last 20 years, following globalization of olive oil market, which caused greater competitiveness in terms of oil quality and production cost, all the countries interested to olive growing must introduce efficient planting and techniques to satisfy these requirements. Two main solutions were proposed: intensive orchards (~400 trees/ha) and super-high intensive orchards (~1600 trees/ha); the first is well known, because it was close to the reference model for new plantings in the last decades. On this model trunk shakers and fruit interception frames greatly improved mechanization degree. In order to optimize mechanical harvesting efficiency, plant characteristic, time of harvesting and plant layout were defined, and intensive cultural practices were suggested to obtain high oil production and quality. Super-high intensive orchards were an alternative with the purpose to use over-row harvester derived from the ones used in grape harvesting. This kind of machine, which operates in continuous, has high harvesting efficiency also in cultivars with small fruit size. This solution fascinated growers and started to spread all around the world. However, very soon, cultivars appeared to be the key-factor. Only very productive and compact cultivars resulted suitable for this system of cultivation. Pruning represents an important factor to facilitate mechanical harvesting and to regulate efficient fruit production. The mechanization of pruning increases work safety and reduces hand work, contributing to a more economical olive production. Optimal solutions were tested and recommended.

**Keywords:** Mechanical harvesting, Pruning, Intensive olive orchards, Super-high intensive, growing practices, mechanization.

## Introduction

In the last years there has been a significative expanding use of extra virgin olive oil in new large countries where the general low prices facilitated the introduction. For the future, the challenge is to increase olive oil production, of quality and at low or moderate price, warranting a right profit to the grower.

In the olive culture, the factors that contribute to reduce the production cost is the increase of crop and the mechanisation of cultural techniques. Between these, the most expensive are harvesting and in some way pruning.

In the mechanisation of harvesting two methods became popular: vibration of the tree and canopy shaking. Trunk and branch shakers were implemented to increase the efficiency. The most interesting technologies regarded the choice of the right vibrating frequency and amplitude, the multidirectional and orbital vibrating models, the reduction of the shaker mass, the manoeuvrability of the shaker, the use of durable components, the employment of larger powers. On the other hand, canopy shakers increased the shaken area and introduced means to better explore the canopy surface

and volume. The fruit collection was mechanised and the fruit removal machines were equipped with collecting frames to make easy and fast the fruit recovery and movement inside the farm.

## The most efficient olive harvesting machine

### 1. Trunk shaker and reverse umbrella

The trunk shaker has fruit removal efficiency of 70-95% and high operation capacity, because the time to detach fruits is 5-15 seconds. The success of trunk shaker has been enforced by the evolution of fruit interceptors, and the reverse umbrella mounted on a basal box to store the removed olives represents the optimum solution to complete the harvesting operation in short time.

### 2. Trunk shaker and side by side interceptor

The harvester is composed by two vehicles that run side by side along the row; one supports the trunk shaker located beneath the sloping padded frame that overlap the other sloping frame where operate a fruit collector and elevator that store the fruits in a bin. They are flexible machines, able to harvest trees of different size, with high operative capacities and easy to transfer.

### 3. Over row canopy shakers derived from grape harvester.

They represent an interesting alternative, and derive mainly from grape harvesters. They vibrate the fruiting branches by 10-12 shaking bars. The shaking box is wide 0.8 m and high 2.0-2.5 or up to 3.5 m in some models. The fruits are collected by a chain with baskets running at the same speed of the machine. The fruit removal is high, 90-95%, also in varieties with small fruits. The speed of operation is between 0.5 and 1.5 km/h.

### 4. Big over row canopy shakers.

The big over row machines have a large frame of 4x4 m with vibrating heads that, through axis penetrating inside the olive canopy, induce the fruit removal, but the machine is heavy and the size makes difficult the transfer and the fruit collection.

## Optimal harvesting period and oil quality

Olive fruits should be harvested when the oil quantity and quality are at the highest level and machinery efficiency is satisfying. During the final stage of fruit ripening, which lasts approximately two months, the fresh and dry fruit weight does not change significantly. Instead the fruit oil content increases considerably, because this period still coincides with intense oil formation.

Tab. 1. Harvesting efficiency and cost of different machines								
	Machine price €	Year utilisation h	Hour cost	Trees/h And trees/ha	Average crop/tree Kg	Fruit removal %	Harvested fruit /h Kg	Harvesting cost €/kg
Trunk shaker + reverse umbrella	70.000	360	80	30-200/400	30	75-90	742	0.107
Syde by side trunk shaker	250.000	1200	320	100-200/400	30	75-90	2475	0.129
Derived from grape harvester	220.000	600	250	700-1600	6	80-90	3570	0.070
Over row Colossus harvester	500.000	1200	320	100-300/500	30	80-90	2550	0.125

(Ravetti 2010, Pampanini et al. 2008, Ruffolo 2011, Tombesi 2011)

The Fruit Detachment Force (FDF) differs according to variety, it is approximately 6 N before the start of processes leading to the formation of the fruit separation layer. At the intermediate stage it is around 4-4.5 N and then it drops below 3 N at the advanced stage of ripening. Natural fruit drop begins when fruit detachment force values are medium or low; it occurs when abscission of olives with a limited FDF is encouraged by strong winds or gales. FDF values below 3 N are a sign of imminent fruit drop. When more than 5-10% of olives has dropped off the tree, it has significant impact on the amount of obtainable oil. If the olive fruits are healthy, the level of free acidity and the peroxide value of oil does not change during ripening. In contrast the polyphenol content, organoleptic characteristics and colour can vary. Polyphenol content is cultivar characteristic, changes in content tend to be bell-shaped, rising in the initial stage of maturation and later declining. Polyphenol content is generally at the highest value when the FDF starts to decrease. Oil characteristics are basically defined by sensations of fruitiness, bitterness and pungency. Fruitiness is more pronounced during the period of intense oil accumulation and starts to lessen when FDF tends towards intermediate values. Bitterness and pungency are characteristics of oils obtained from early harvested olives. As a rule, balanced, prime quality oils are very fruity and display equilibrium between bitter and pungent attributes which are noted at medium intensity. The optimal time to harvest each variety can be determined by combining the parameters related to the quantity and quality of obtainable oil. For each variety the optimal harvesting period lasts about 20 days.

## Mechanical harvesting cost.

In relation to a general high fruit production for tree and to the percentage of fruit removal, the final harvesting cost is very low for all the machines, but there are differences and some considerations between them (Tab.1). The side by side and the Colossus show the values of 0.125 €/kg obtained with a very high year utilisation, operating the harvest in about 60 days, and for 20 daily hours. The trunk shaker with reverse umbrella can operate 40 days with a daily use of 9 hours, inside the optimum harvesting period, and the harvesting cost is at medium level. The cheapest harvesting cost corresponds to the straddle grape derived harvesters. They can operate in 50 days for 12 hours each day. They can enlarge the use, operating after grape harvesting to reduce the amortization cost.

## Tree exigency and possible damages of different machines.

For each kind of machine we find out the best operating conditions:

For trunk shakers:

1. Planting production. Larger is the yield, higher is the work productivity. The use of high productive varieties in vocational areas and optimal application of cultural techniques will assure good production. We consider optimal a production of 30kg/tree on planting of 300 trees/ha.
2. Canopy volume. The trunk shakers show good performance with canopy volumes until 40-50 m<sup>3</sup>, obtainable with almost all the varieties for a long planting life.
3. Application point. The easiest method is the application on the trunk, that must be regular, straight and free of branching for about 1 m. When the application differs from perpendicular and the trees are recently irrigated some bark damages can be observed.
4. Planting distances. The distance of 6x6 m is a good reference, or if the catching frames are side by side the best combinations can be realised by distances of 7x5m or similar values.
5. Optimal harvesting period is when fruit detachment force starts to decrease, when oil content and quality are optimal.
6. Adapted varieties have fruit size more than 1.5-2 g, with upright habit. Many traditional varieties are respondent.
7. Tree age. The trunk shakers can be applied early, at 6-8 years old trees, when the trunk diameter is 8-10 cm, up to 60-70 years old ones, until the trunk is healthy and the shape is regular.
8. Soil sloping. The plain soils are the most respondent, however it is possible to operate until 20-25% of sloping, using chain tractor and light shakers.

Over row harvesters

The over row harvesters showing best results are those derived from grape harvesters, because they are built in large number and are reliable. They have the exigency to operate on trees which size is compatible with the shaking box. Then the trees must be lower than 2.5-3.5 m and not wider than 2.0-2.5 m with elastic branches that can enter inside the shaking box. This tree model must be efficient in terms of yield and life time. When the size of tree is larger some damages can occur regarding lateral branches breaking, bending or extirpation of the tree.

The big over row machine can operate with larger trees, not more than 25m<sup>3</sup> canopy volume. Some damages regard leaf dropping and branch breaking.

## Choice of cultural olive models adapted to harvesting machine

All the models of intense olive culture must adopt a canopy volume more or close to 10.000 m<sup>3</sup>/ha

that need to be efficient, maximizing leaf area well exposed to light and reducing structural parts as trunk and main branches. The tree must produce each year shoots of medium size that are more able to promote inflorescences in conditions of reduced competition for assimilate compounds carried out by fruits and vegetative growth points. The inflorescence formation is influenced also by variety, that can express different tendency to form flowers. It is fundamental that the tree have at disposal large amounts of assimilates and a limited vegetative activity. While the assimilate amount depends on leaves and their light exposure, the vegetative activity can be influenced by pruning intensity and by cultural techniques: fertilisation, irrigation, soil management and, first all, by the variety. In fact each variety in relation to its genetic vigour and environmental conditions needs of planting distances able to allow equilibrium conditions that can be maintained for a long period by standard cultural techniques.

The intensive olive culture consists in applying intense cultural practices optimizing assimilation and in adopting a size of tree correspondent to the exigencies of harvesting machines. The trunk shakers with reverse umbrella or with side by side catching frame operate on canopy volumes until 30-40 m<sup>3</sup>, the over row derived by grape harvesters ask for a canopy volume up to 7-10 m<sup>3</sup> and the big ones up to 25-30 m<sup>3</sup>. Following these harvester requirements the number of trees for hectare can be of 250-400 in intensive orchard and 1000-1800 in high intensive orchards.

## Pruning

The plants that show a good production level have a LAI around 6, the factors that determine their high efficiency are a radiant energy interception around 90% and the consequent transmitted light intensity, at maximum sun height, of 140 - 150 mmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. An improvement in the canopy efficiency can also come from a more uniform distribution of leaf density. Optimal canopy density seems to be 2 m<sup>2</sup> of leaves for m<sup>3</sup> of canopy.

### 7.1. Intensive system

On intensive planting the training pruning must be as much as possible light, taking care of definition of a trunk, free up to 1 m, then light thinning of canopy to promote the formation of 3-4 main branches on the free vase system.

During the mature stage, fruit production pruning should be carried out regularly to remove suckers and the whole or parts of exhausted branches to control tree height by lowering the top and to keep vegetative cover as close as possible to the scaffold branches. This kind of pruning must be carried out in the following sequence:

1. Check if the tree has the right shape, cutting the main and secondary branches if something has to be corrected.
2. Remove water sprout, possibly retaining a few to replace debilitated branches.
3. Thin the tips of the branches to keep them within the maximum training height.
4. Thin the secondary and tertiary branches to remove any that are misshapen, exhausted or decayed, and head overlong branches to points where there are replacement shoots. Remove dichotomous branches and thin overcrowded shoots and branches.
5. Cut suckers at their point of insertion in the tree base.

As regard to the intensity and the periodicity, the biannual cycle applied with medium intensity pruning showed higher yields, with reduction cost on respect to annual cycle. Leccino and Maurino varieties well respond to biannual and triannual cycle, for Frantoio instead it is recommendable cycles not longer than 2 years because it shows a large production of suckers and a sensibility to olive leaf spot.

For pruning it is necessary to use fuel chain saw, pneumatic or electrical chain saw, pneumatic or electrical shears with extension arms of 1 or 2 m in length to operate from ground level to increase worker safety.

Also the pruning using bars with 4-5 cutting discs that rotate at 2,000-3,500 rpm and powered by hydraulic motors are effective strongly reducing the hand work. The more efficient applications resulted using mechanical topping and elimination of suckers with electrical shears, applied each 4 years and spaced by mechanical hedging to control the lateral size of canopy.

## 7.2. Super high intensive systems

On the Super high intensive systems it is necessary to apply the following indications

- Minimum pruning to maintain a regular production of 0.6 kg of olives /canopy m<sup>3</sup>.
- It is necessary to remove branches below 0.6 m
- Avoid severe pruning because of the increase of vegetative growth
- Removing some lateral branch from insertion
- After planting tie upright the tree to the stake
- At second year remove basal branches below 60 cm and tie upright
- At 3°, 4°, apply light pruning, removing some lateral vigorous branch.
- At 5°-6° year apply a topping to reduce the height and to assure enough light exposure to the basal part of the tree, use every 3 years
- Then, apply a continuous branch thinning cutting them at the base to reduce shading and lateral growth
- Remove any branch below 60 cm to facilitate harvester fruit collection

Avoid strong pruning that reduces flower formation and that can alter the auspicate equilibrium based on medium- high yields to maintain the moderate tree size. There is some interest for a late selective pruning.

## Cultural techniques that influence growth and perspectives to maintain equilibrium between vegetative and productive growth.

Besides the fundamental genetic characteristics that are expressed by easy flower formation, high branching capacity facilitating fruiting shoot formation and a limited annual vegetative growth, these parameters can be influenced by cultural practices and environment conditions.

About environment the locations with mild climate offer longer vegetative growth period, North and South areas show different annual growth that influences the early production and the final tree size. The water level, nitrogen availability and light soil increase growth, and their appropriate management can optimise vegetative growth and production.

The pruning will considerably affect the first tree growth and, on full expanse tree, the equilibrium between vegetative and productive activity and the restoring of regular tree size. Also some techniques influencing the assimilate partitioning can be useful to regulate fruiting, growth and size. They can be used properly in intensive and super intensive cultivation.

## References

Pampanini R., Pignataro F., 2008. Aspetti economici della competitività in olivicoltura. Atti Convegno COMSIOL, Competitività del Sistema Olivo in Italia, Accademia Nazionale dell'Olivo e dell'Olio, Spoleto, 53-74.

Ravetti L., Robb S., 2010. Continuous mechanical harvesting in modern Australian olive growing systems. *Adv. Hort. Sci.*, 24,(1), 71-77.

Ruffolo M., 2011, Personal communication

Tombesi A., 2006. Planting systems, canopy management and mechanical harvesting, OLIVEBIOTEQ, Marsala-Mazara del Vallo, 5-10 November, pp.307-316.

Tombesi A. 2011. Intensive vs super-high density olive growing systems. OLIVEBIOTEQ, Chania, Crete, GREECE, October 31<sup>st</sup> – November 4<sup>th</sup> .

Tous J., Romero A., Plana J., Hermoso J.F., 2008. Olive oil cultivars suitable for very-high density planting conditions. *Acta Hort.*791, 403-408.



# La raccolta in olivicoltura richiede maggiore innovazione tecnologica

G. Zimbalatti e B. Bernardi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroforestali ed Ambientali (DiSTAfA)  
Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria  
Italia

## Riassunto

L'olivicoltura calabrese rappresenta una parte fondamentale dello scenario agricolo mediterraneo; pur vantando una tradizione millenaria e rappresentando una delle risorse più interessanti nel comparto agricolo nazionale, è però da sempre condizionata da un forte frazionamento e da condizioni strutturali molto difficili, che hanno fortemente limitato l'impiego e quindi lo sviluppo della macchine. In tale contesto risulta quindi difficile impostare dei modelli di meccanizzazione efficienti ed economicamente sostenibili per oltre la metà delle aziende presenti sul territorio. L'esigenza primaria è rendere quindi economicamente sostenibile l'operazione di raccolta delle drupe, che incide fortemente sul valore del prodotto finale. A ciò si aggiunge anche la sempre maggiore difficoltà di reperire manodopera e il costo elevato relativo all'acquisizione di nuove tecnologie; queste ultime, molte volte, risultano difficilmente ammortizzabili e spesso non gestibili, a causa della scarsa competenza del personale e della inadeguatezza delle strutture e delle procedure di mantenimento e controllo. In un contesto sempre più globalizzato e competitivo, è facilmente comprensibile come la concorrenzialità delle nostre produzioni, potrà essere mantenuta solamente percorrendo appieno la via dell'innovazione tecnologica.

**Parole chiave:** Testata vibrante, scuotitore radiocomandato, accelerometri, capacità di lavoro

## Introduzione

La situazione olivicola italiana presenta un quadro piuttosto complesso, dove l'aspetto caratterizzante riguarda la diffusione della cosiddetta olivicoltura tradizionale, contraddistinta da alti costi di produzione, modesta produttività unitaria e marginalizzazione di aree più o meno estese. La raccolta delle olive eseguita con metodi tradizionali richiede un costo non più sostenibile. Pertanto, anche in considerazione del fatto che le popolazioni tendono a lasciare l'agricoltura per altri settori produttivi e che le condizioni ambientali in cui si esegue la raccolta sono difficili, è necessario svincolare tale tecnica, almeno per una parte cospicua, dal lavoro umano (Tombesi A., 1990). La raccolta meccanica è ormai una concreta realtà ed è la sola capace di promuovere lo sviluppo della olivicoltura per adeguarla, al pari delle altre specie di interesse agrario, alle situazioni tecniche, sociali ed economiche dei nostri tempi, nel rispetto della qualità del prodotto, elemento imprescindibile per la commercializzazione dell'olio.

## Materiali e metodi

La Piana di Gioia Tauro è una delle più importanti aree olivicole della Calabria, ed in tale contesto, si è condotta una prima linea di ricerca tesa a valutare le produttività di lavoro conseguibili, in tre diversi oliveti, meccanizzando i cantieri di raccolta. Due di questi presentavano piante appartenenti alle cultivar "Sinopolese" ed "Ottobratica", allevate a vaso, età media 50 anni, altezza delle chiome di oltre 14 m, sesto d'impianto di 20 m x 20 m, densità di 25 piante/ha ed una resa di 3,20 t/ha. Il terzo era costituito invece da piante di "Carolea" di circa 14 anni, con struttura a vaso e sesto di 5 m x 6 m (330 piante/ha). Lo schema sperimentale ha previsto l'impiego di uno scuotitore, accoppiato, per l'intercettazione e l'accumulo del prodotto, alle reti o ad una macchina raccattatrice.

Una seconda linea di ricerca ha saggiato l'efficienza di un prototipo di scuotitore semovente (Fig. 1) che presentava la caratteristica molto interessante di poter essere direzionato, guidato ed azionato, grazie ad un dispositivo di radiocomando con appositi joystick, da terra, senza alcun operatore a bordo, sia durante le operazioni di posizionamento, sia durante le fasi di trasferimento (Zimbalatti et al., 2009 [A]). Se ne è valutata la sua funzionalità in due differenti oliveti: il primo costituito da piante di Carolea di 10 anni, sesto regolare di 6 m x 6 m e giacitura in piano, l'altro con piante secolari ed irregolari, disposte su terreno fortemente declive, con pendenze anche del 45%.

In entrambe le linee, la metodologia di rilevamento dei dati, elaborata seguendo le indicazioni del C.I.O.S.T.A., si è basata su un'analisi dettagliata delle varie fasi di lavoro al fine di valutare l'effettiva operatività delle macchine (Bolli et al., 1987).

Una terza linea di ricerca è stata incentrata sull'obiettivo di determinare la risposta dinamica alle sollecitazioni forzate imposte, da una testata vibrante, ad alcune piante di cultivar "Carolea" di 13 anni, allevate a vaso. Sei accelerometri "Hottinger Baldwin Messtechnik", HBM, (mod. "B12/200) in grado di monitorare accelerazioni sino a 200 m/s<sup>2</sup>, con frequenze di 100 Hz, sono stati applicati, sia sulle piante, sia sulla testata vibrante grazie a dei speciali supporti metallici appositamente costruiti. Su un campione rappresentativo di olive è stato calcolato il valore medio della forza di distacco e si è fissato, in 1000 m/s<sup>2</sup>, il valore minimo di accelerazione utile a garantire il distacco delle drupe.

## Risultati e discussione

Con riferimento allo studio sulla efficacia delle macchine, i dati riepilogati in tabella 1, sottolineano come, nei tre cantieri confrontati, sia stato il sistema "scuotitore con reti" applicato ad un impianto intensivo, quello in grado di garantire una capacità di lavoro anche doppia rispetto allo stesso sistema applicato ad impianti tradizionali. Ciò a sottolineare come impianti progettati nell'ottica di un ricorso alle macchine per la raccolta, possano garantire incrementi di produttività significativi (Giametta et al., 2010).

Anche lo scuotitore semovente radiocomandato ha conseguito ottime prestazioni (Fig. 2), sia in pianura, dove è stato possibile ottenere una capacità di lavoro di 45 piante/ora, ma anche in aree particolarmente declivi, con una media di 13 piante/ora; si tratta di un valore interessante, considerato che le piante non erano impostate per la raccolta meccanica ed erano di notevoli dimensioni.

Infine, i risultati degli studi condotti sull'effetto vibratorio trasmesso dagli scuotitori hanno fatto registrare accelerazioni, in genere inferiori a 1000 m/s<sup>2</sup>, che ha sottolineato come la sola sollecitazione di trazione sulla drupa è insufficiente a rompere il legame peduncolo-frutto e che occorre favorire quanto più possibile l'incidenza delle altre componenti delle forze responsabili del distacco.

I risultati ottenuti sembrano confermare che, affinché si massimizzi sull'albero l'effetto vibratorio trasmesso dagli scuotitori, ai fini dell'aumento della resa di raccolta dei frutti, è necessario che l'aggancio avvenga in modo tale che le branche principali siano poste nella direzione ortogonale rispetto

alla linea di azione della macchina, perché in tale modo la sollecitazione forzata favorisce le azioni di torso-flessione e di taglio nel punto di contatto drupa-peduncolo, in quanto l'oscillazione preponderante dei rami è orizzontale.

Occorre quindi favorire le ramificazioni dall'andamento regolare, eliminare i rami penduli cercando, per quanto possibile, di dare all'albero una struttura che sia la più rigida possibile e che non si sviluppi eccessivamente in altezza.

Per quanto concerne il sistema di ancoraggio della pinza sul tronco, si è inoltre visto come i valori dell'accelerazione lungo la direzione del braccio sono sempre maggiori di quelli misurati in direzione ortogonale allo stesso, provocando più accentuati fenomeni di slittamento lungo quest'ultima direzione, con conseguente perdita di parte dell'energia vibratoria impressa dalla macchina. In tale ottica, la ricerca dovrebbe quindi puntare anche al miglioramento dei sistemi di ancoraggio rendendo più solidale l'aggancio testata-tronco al fine di ridurre la dispersione dell'energia vibratoria. Appare chiaro, d'altronde, rilevare che spesso ad incidere, in misura più o meno elevata, sull'efficacia d'impiego della testata, è l'abilità e l'esperienza dell'operatore alla guida del mezzo meccanico.

## Conclusioni

L'olivicoltura calabrese e quella italiana in generale si trova, sempre più, a confrontarsi con il mercato internazionale, dove deve giocare un ruolo da protagonista, essendo uno dei maggiori produttori tra i Paesi dell'Unione Europea. Vi sono, di contro, Paesi come quelli mediterranei extra UE e soprattutto altri come la California, l'Argentina e l'Australia dove il forte fermento imprenditoriale e la rapida capacità di introduzione di tecnologia, rappresentano una sfida da tenere in debito conto nella produzione e collocazione di olio nel mercato internazionale (Loreti, 2007; Iannotta et al., 2006; Zimbalatti et al., 2009 [B]).

In tale ottica, le condizioni culturali rappresentano sicuramente un fattore penalizzante per via della declività dei suoli, la difficoltà di accesso, per la elevatissima percentuale di impianti tradizionali nei quali risulta difficile applicare tecnologie di raccolta meccanica ad elevata produttività. L'esigenza primaria è rendere economicamente ragionevole l'operazione di raccolta dei frutti che incide, come detto, fortemente nella determinazione del valore del prodotto.

Gli studi condotti nell'ambito del progetto RIOM ci permettono, ancora una volta, di rimarcare come la meccanizzazione della raccolta, ma in generale delle varie operazioni colturali, sia l'unica strada percorribile al fine di mantenere produttive quelle aree dove altrimenti non sarebbe più pensabile mantenere la sostenibilità delle produzioni.

L'introduzione di nuove macchine, come lo scuotitore radiocomandato, potrebbe rappresentare una soluzione vantaggiosa soprattutto negli oliveti tradizionali ove questi si intenda mantenerli per il loro contributo produttivo, l'elevato valore paesaggistico, il valore ambientale e il valore sociale, grazie ai quali alcune zone marginali non vengono abbandonate.

Tuttavia, nonostante gli alti livelli tecnici raggiunti, rimane ancora sull'albero, a raccolta avvenuta, una quantità apprezzabile di prodotto. Come detto, il fenomeno è particolarmente complesso in quanto influenzato da molteplici fattori di ordine sia meccanico che agronomico; non va trascurato inoltre il differente grado di maturazione delle olive, nonché l'estrema variabilità nelle caratteristiche morfo-fisiologiche, geometriche e fisiche delle singole parti costituenti l'albero.

Ciò determina la difficoltà di ideare raccogliatrici che, nonostante la loro versatilità operativa, riescano a garantire elevata qualità di lavoro senza penalizzarne il rendimento. Il problema si complica ulteriormente nelle piante secolari, tipiche della Calabria, nelle quali le notevoli dimensioni, la disuniformità strutturale e la elevata scalarità di maturazione dei frutti rendono difficile l'impiego

razionale delle macchine in termini di economicità ed efficienza operativa.

Da quanto fin qui emerso risulta fondamentale proseguire la ricerca nel settore dell'innovazione tecnologica, attraverso l'implementazione di nuove e sempre più efficienti macchine, che dovranno basarsi sul fondamentale assunto che saranno le piante a doversi adattare alle macchine, e non il contrario, se nel futuro si vorrà mantenere vitale un settore fondamentale per la nostra economia, e non solo, come è quello olivicolo.

## Bibliografia

Bolli, P. e Scotton, M. 1987. Lineamenti di tecnica della meccanizzazione agricola, 1a edizione, Edagricole, Bologna.

Giametta, G. e Bernardi, B. 2010. In Calabria la meccanizzazione richiede prima il rinnovamento. *Olivo e Olio*, n. 10, 40-42.

Iannotta, N. e Perri, E. 2006. L'esperienza della Spagna nell'olivicoltura superintensiva. *L'Informatore Agrario*, (1), 59-63.

Loreti, F. (2007), Alta densità: rivoluzione globale nelle tecniche di coltivazione dell'olivo, *Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura*, (7/8), 56-70.

Tombesi, A. 1990. Acquisizioni fisiologiche e meccaniche nella raccolta delle olive, *Genio Rurale* n. 5: 64-74.

Zimbalatti, G., Bernardi, B. e Morabito, S. 2009 [A]. Using a self-propelled radio-controlled shaker: mechanized harvesting tests and economic evaluation. Olivebioteq, Third International Seminar "For a renovated profitable and competitive Mediterranean olive growing sector", Sfax, Tunisia.

Zimbalatti, G. e Bernardi, B. 2009 [B]. Manual and mechanical pruning tests in the super intensive olive growing. Olivebioteq, Third International Seminar "For a renovated profitable and competitive Mediterranean olive growing sector", Sfax, Tunisia.

Tabella I. Produttività di lavoro nei cantieri oggetto di studio.

CULTIVAR	CANTIERE	CAPACITÀ DI LAVORO (piante/h)	PRODUTTIVITÀ DEL LAVORO		RESA DI RACCOLTA (%)
			(piante/h-op)	(kg/h-op)	
Ottobratica Sinopolese	Scuotitore Reti	11,2	1,4	105	55
Ottobratica Sinopolese	Scuotitore Raccattrice	7,8	1,6	110	45
Carolea	Scuotitore Reti	25	3,6	142	89

Figure



Fig. I. Scuotitore semovente radiocomandato

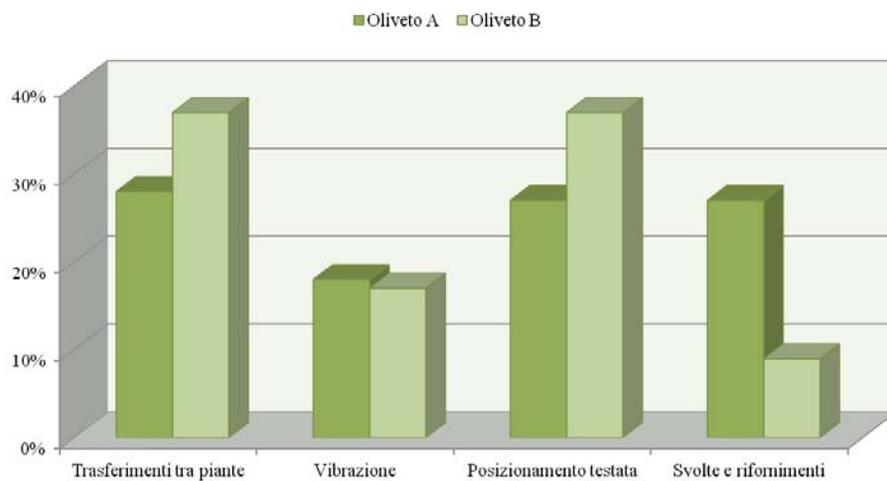


Fig. 2. Incidenza percentuale delle principali operazioni sul tempo di lavoro

# Innovazioni nella difesa fitosanitaria

N. Iannotta

Una efficace e razionale difesa fitosanitaria nelle regioni olivicole meridionali è da considerarsi una delle più importanti pratiche colturali e rappresenta una condizione essenziale per la stessa competitività della coltura, in quanto in quest'ambiente i parassiti trovano condizioni favorevoli al loro sviluppo e quindi rappresentano una grave minaccia alla quantità e alla qualità delle produzioni. Inoltre, come prescrivono le più recenti normative della UE, per i parassiti di natura entomologica occorre aggiornare le sostanze attive per combatterli in coltivazione convenzionale, sempre tenendo conto della primaria esigenza della salvaguardia ambientale, per cui le pratiche di lotta contro i parassiti devono contemperare questi diversi aspetti. Poi, una maggiore competitività economica dell'olivicoltura non può prescindere da un miglioramento quali-quantitativo della produzione, che può essere ulteriormente valorizzato dal valore aggiunto rappresentato dalla certificazione della stessa qualità. Stante l'esigenza ormai consolidata di una maggiore salvaguardia ambientale, raccomandata dalla Politica Agricola Comunitaria e resa indispensabile per ricevere gli aiuti comunitari, la certificazione del biologico trova maggiore preferenza presso i produttori. Come è noto, tale tipo di coltivazione ecocompatibile è disciplinata da una severa normativa, peraltro recentemente rivisitata e resa ulteriormente restrittiva, in tema di utilizzazione di prodotti in grado di combattere le principali avversità biotiche dell'olivo. Fra queste, *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790) (Diptera Tephritidae) assume un'importanza fondamentale per il suo ruolo di fitofago-chiave dell'ecosistema oliveto e perchè determina notevoli danni sia di tipo quantitativo che qualitativo alla produzione olivicola. Inoltre, l'esigenza di contenere le infestazioni di mosca delle olive, oltre che nelle regioni meridionali dove da sempre le infestazioni raggiungono allarmanti livelli percentuali, risulta essere ormai imprescindibile, visti i cambiamenti climatici in atto, anche nelle altre regioni olivicole italiane dove le condizioni eco-climatiche risultano favorevoli allo sviluppo del dittero. La lotta a *B. oleae*, già difficile in coltivazione convenzionale, diventa ancor più ardua nelle forme di coltivazione eco-compatibili come la coltivazione biologica a causa, come detto, delle restrizioni normative che la disciplinano.

Su tali basi erano posti gli obiettivi principali del progetto, in prosecuzione di quelli perseguiti già nel primo progetto RIOM.

## Risultati

Essi riguardano in primo luogo le osservazioni tendenti ad acquisire maggiori conoscenze sulla possibilità di analizzare ed interpretare la complessità agro-ambientale dei contesti produttivi olivicoli, in modo da contestualizzare la definizione di metodi e sistemi con una tecnologia appropriata ai diversi sistemi agricoli territoriali. Il tutto anche allo scopo di ideare e mettere in atto iniziative di prevenzione di base. In base a questo obiettivo è stato implementato un sistema di rilevamento dei dati a livello comprensoriale (SIT) e ad esso collegato un ulteriore sistema di gestione informatica dei dati (GIS), ed è stato utilizzato un sito web specifico ove poter rilevare i dati relativi agli ambienti osservati.

Il seguito ha riguardato la possibilità di adottare tecniche di difesa innovative nei confronti dei principali fitofagi e patogeni dell'olivo in Italia meridionale e sono stati elaborati i dati e svolte le

analisi di laboratorio dell'attività in campo. Tali tecniche, per troppo tempo attuate esclusivamente in funzione dell'aspetto quantitativo della produzione, sono state modificate ed obiettivate anche all'aspetto qualitativo, unanimemente riconosciuto come l'aspetto produttivo più importante per il conseguimento della competitività economica della coltura. Dette tecniche, inoltre, sono state adattate alle esigenze di promuovere la stabilità ambientale attraverso una maggiore conoscenza delle interrelazioni suolo-pianta-ambiente-animale, in modo da contribuire alla sostenibilità complessiva del processo produttivo olivicolo, oltrepassando i confini ristretti della produzione in un disegno più ampio di visione dell'agricoltura sostenibile su base territoriale ampia. In relazione a ciò sono state studiate le possibilità di adottare metodi di contenimento dei parassiti mediante applicazioni di tecniche alternative all'impiego delle sostanze chimiche in modo da rendere realmente ecocompatibile la difesa dai fitofagi e dai patogeni. Sul piano strettamente applicativo l'attività ha riguardato la individuazione ed il saggio di nuove sostanze attive in grado di combattere la mosca delle olive (*Bactrocera oleae*), il più pericoloso e dannoso fra i fitofagi dell'ecosistema olivo, alla luce delle recenti normative europee che hanno cancellato dall'elenco delle sostanze attive utilizzabili quelle tradizionalmente impiegate nell'olivicultura italiana.

#### Mosca delle olive (*Bactrocera oleae*)

Uno specifico studio etologico è stato effettuato circa la possibilità di stabilire una correlazione tra le catture di adulti di *Bactrocera oleae* ed i livelli di infestazione dei frutti, circostanza che consente una migliore applicazione delle strategie di lotta guidata ed integrata alla mosca delle olive. La ricerca è stata condotta in due anni di osservazione al fine di verificare in diversi areali olivicoli calabresi, storicamente caratterizzati da diversi livelli di infestazione, la presenza di correlazione tra popolazione adulta ed infestazione attiva di *B. oleae*. Le densità della popolazione adulta è stata determinata utilizzando delle trappole cromotropiche gialle mentre i livelli di infestazione dei frutti sono stati valutati mediante analisi diretta sulle drupe. Sono stati calcolati i coefficienti di correlazione tra infestazione attiva e le catture di adulti e tra infestazione attiva ed i diversi stadi preimmaginali. I risultati hanno dimostrato la presenza di correlazione tra le catture degli adulti e l'infestazione in tutti gli areali oggetto di studio ed in entrambi gli anni di osservazione. Nei pochi casi in cui la correlazione non è stata osservata si potrebbe ipotizzare che la relazione non è di tipo lineare, probabilmente a causa della scarsa produzione olivicola che induce molte femmine ad ovideporre nello stesso frutto. La presenza di correlazione consente di favorire una semplificazione del monitoraggio di *B. oleae* per promuovere delle strategie a basso costo suggerendo, inoltre, che è possibile sviluppare dei modelli previsionali dell'infestazione della mosca delle olive.

Per quanto attiene alla suscettibilità cultivar a *Bactrocera oleae*, è stato indagato il notevole germoplasma olivicolo esistente. La ricerca è stata svolta in campi dove le varietà sono coltivate nelle medesime condizioni ambientali e colturali. I risultati hanno evidenziato un diverso comportamento delle cultivar indagate in relazione alla loro diversa suscettibilità nei confronti dei parassiti citati. Delle centinaia di varietà esaminate, alcune hanno mostrato un'interessante ridotta suscettibilità (Bardhi Tirana, Gentile di Chieti, Nociara, Leccino, Carboncella Pianacce) al dittero e circa le cause di tale bassa suscettibilità di alcuni genotipi, si è individuata la quantità di oleuropeina presente nei frutti. La differente suscettibilità agli attacchi mostrata dai genotipi osservati può essere riconducibile all'azione di antibiotici svolta dall'oleuropeina nei tessuti della drupa sulla popolazione preimmaginale del dittero (soprattutto uova e larve di I età). Gli stessi risultati mostrano che la più alta quantità di oleuropeina nella drupa e la sua maggiore localizzazione nell'epicarpo è una peculiarità genetica delle cultivar. Solo nel caso della minore suscettibilità esibita dalla "Turdunazza antimosca" si ritiene che la causa sia riconducibile ad un'azione di repellenza che tale cv esercita nei confronti degli adulti del dittero. Invece, nelle cultivar

“Cellina di Nardò”, “Nolca”, “Termite di Bitetto” e “Tonda nera dolce”, è stata riscontrata una correlazione statistica tra il contenuto di cianidina nelle drupe e la bassa suscettibilità osservata. Molto probabilmente la colorazione scura della drupa, dovuta alla presenza di antociani, la rende meno riconoscibile alle femmine ovodepositrici di *B. oleae*.

Sulla lotta in convenzionale, alla luce delle nuove restrizioni riguardanti il numero di formulati commerciali contenenti tradizionali composti chimici (Allegato I, Direttiva 91/414/CEE), la lotta a *B. oleae* ha richiesto la sperimentazione di nuove sostanze attive in grado di fornire risultati paragonabili a quelli mostrati da quelli precedentemente in uso. Pertanto, in prosecuzione di indagini precedentemente svolte, l'obiettivo è stato quello di valutare l'efficacia del formulato commerciale Confidor® O-TEQ, a base di imidacloprid, recentemente registrato su olivo, per il controllo di detto dittero. Le prove sono state condotte nell'areale di Mirto-Crosia, situato sul litorale ionico cosentino e caratterizzato da elevati livelli di infestazione. I risultati ottenuti nel periodo complessivo di indagine hanno evidenziato una significativa riduzione dei livelli di infestazione sia in termini di infestazione attiva ( $F_{2,147} = 4.2094$ ;  $p = 0.0167$ ) che totale ( $F_{2,147} = 4.1240$ ;  $p = 0.0181$ ). È stato, inoltre, riscontrato l'effetto larvicida del formulato commerciale ( $F_{2,147} = 4.0093$ ;  $p = 0.2017$ ) ed una significativa riduzione della presenza di gallerie di sfarfallamento nelle drupe trattate ( $F_{2,147} = 7.2931$ ;  $p = 0.0009$ ). La mortalità delle pupe è risultata significativamente più elevata nelle tesi trattate ( $F_{2,147} = 4.2872$ ;  $p = 0.0155$ ). Il formulato commerciale Confidor® O-TEQ ha mostrato una significativa efficacia nei confronti del testimone. In definitiva i risultati ottenuti appaiono di promettente prospettiva per il controllo di *B. oleae* in olivicoltura convenzionale ed integrata, soprattutto per interventi di tipo curativo (effetto larvicida). Inoltre, sono state svolte ricerche circa l'impatto ambientale che detto prodotto provoca nell'ecosistema mediante valutazione della biocenosi presente prima e dopo i trattamenti. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare l'impatto dell'imidacloprid sulla biocenosi utilizzando il formulato commerciale Confidor® O-TEQ con due differenti concentrazioni (50 e 62.5% g/hl) Le prove sono state condotte negli anni 2009 e 2010 nell'areale di Mirto-Crosia, situato sul litorale ionico cosentino e caratterizzato da elevati livelli di infestazione. I risultati ottenuti mostrano nel complesso un impatto significativo dell'imidacloprid sugli artropodi non target. Tuttavia le conseguenze sulla artropodofauna non sono omogenee nei due anni di campionamento, mostrando nella seconda annualità una differenza statisticamente significativa solo fra il campo trattato con il principio attivo alla massima concentrazione e il controllo. Alcuni gruppi si sono mostrati più sensibili di altri e in particolare gli Homoptera Cicadellidae hanno mostrato un calo significativo delle loro popolazioni. Per gli artropodi considerati utili (parassitoidi e predatori), non sembrano emergere dati di un forte impatto.

In considerazione del notevole successo ottenuto presso gli olivicoltori italiani, una specifica attività di ricerca è stata dedicata alla coltivazione biologica. In quest'ambito si è valutata l'efficacia dei prodotti ammessi dalla normativa vigente contro i principali parassiti, con attenzione verso il rischio tossicologico connesso all'eventuale presenza di residui nocivi nel prodotto finale. Al riguardo è stato accertato che non tutte le sostanze ammesse, ancorché di origine naturale, sono esenti da rischi ambientali e tossicologici, come ad esempio l'azadiractina e il rotenone, largamente impiegato negli anni scorsi ma attualmente interdetto dalle recenti integrazioni legislative. Altre sostanze, invece, hanno mostrato poca efficacia (piretro, quassia, prodotti a base di *B. bassiana*), mentre le ricerche hanno indicato il caolino (repellente utilizzabile in biologico in quanto considerato biostimolante) quale efficace prodotto antidacico, senza effetti tossicologici collaterali e minimi impatti ambientali.

Sempre contro lo stesso fitofago, in coltivazione biologica, i risultati riguardano positivamente il Mass-trapping, sempre più economico ed efficace, il Caolino, come detto ottimo sia per l'efficacia che per il basso impatto ambientale, il Rame e lo Spinosad. Le prove di trappolaggio massale hanno

riguardato il possibile impiego di un nuovo dispositivo *attract and kill*. I nuovi dispositivi sperimentali testati sembrano rispondere positivamente alle richieste degli olivicoltori in quanto presentano costi inferiori ed efficacia superiore nel controllo dei danni determinati da *B. oleae*. Probabilmente, l'efficacia superiore può essere attribuita alla struttura costituita da polimeri di natura plastica che rilasciano gli attrattivi molto più lentamente rispetto ai dispositivi di tipo commerciale e rendono i dispositivi sperimentali più resistenti alla degradazione di tipo meccanico e alla degradazione dovuta alle condizioni climatiche. Inoltre, il costo dei dispositivi sperimentali è inferiore rispetto ai dispositivi già disponibili in commercio e l'applicazione in campo potrebbe essere ulteriormente migliorata realizzando un sistema di collocazione sulle piante più semplice al fine di ridurre maggiormente i costi della manodopera in campo. Sempre nel campo del trappolaggio massale è stato introdotto un nuovo prodotto (SpintorFly® Dow Agrosience) che prevede l'utilizzo di un'esca avvelenata con minime dosi di spinosad (0,24 g/L) come insetticida. L'esca non viene collocata in campo in specifici dispositivi, ma è irrorata su una piccola porzione delle parti vegetative della coltura per distribuire 0,24 g di principio attivo ad ettaro. Lo studio della selettività di un'esca avvelenata a base zuccherina è un punto focale per valutare l'opportunità del suo utilizzo in pieno campo visto che molti insetti sono attratti da sostanze zuccherine e se ne alimentano. L'esca non viene collocata in campo in specifici dispositivi, ma è irrorata su una piccola porzione delle parti vegetative della coltura per distribuire 0,24 g di principio attivo ad ettaro. Lo studio della selettività di un'esca avvelenata a base zuccherina è un punto focale per valutare l'opportunità del suo utilizzo in pieno campo visto che molti insetti sono attratti da sostanze zuccherine e se ne alimentano. I risultati hanno evidenziato che l'attrazione dello SpintorFly® è elevata nei confronti dei ditteri in generale e dei tefritidi in particolare, mentre è assente nei confronti del resto dell'entomocenosi. Questo sistema di controllo si conferma altamente selettivo ed è, pertanto, a basso impatto ambientale e consigliabile in agricoltura biologica oltre che in sistemi paesaggistici di elevato pregio conservazionistico.

Per quest'ultima innovativa molecola, si è provveduto a mettere a punto un metodo di laboratorio per la valutazione di eventuale presenza nel prodotto di indesiderabili residui. I risultati effettuati su olive trattate nei campi sperimentali del CRA, hanno evidenziato la assoluta assenza di residui nelle olive e nell'olio. Per molte delle tecniche di contenimento impiegate, sono stati studiati gli effetti che esse provocano nei confronti della biocenosi esistente nell'ecosistema.

#### Oziorrinco (*Otiorrhynchus cribricollis*)

Contro gli adulti di Oziorrinco, che, come noto, provoca notevoli danni alle giovani piantine, è stato saggiato un prodotto biologico naturale, il GRANMET, a base del fungo entomopatogeno *Metharhizium anisopliae* ceppo BIPESCO 5, che si instaura nella rizosfera ed è in grado di micotizzare il corpo degli insetti che vivono la maggior parte del tempo nel terreno in ogni stadio del loro sviluppo. La prova si è svolta in un campo di olivo sperimentale, localizzata nel comune di Mirto-Crosia, nel quale viene già adottato il mezzo di lotta meccanico, alternativo al mezzo chimico, consistente nella creazione di manicotti (fasce-trappola) di materiale sintetico, tipo lana di vetro, applicate sui tronchi ed eventualmente anche sui pali tutori e sui fili degli impianti di irrigazione allo scopo di impedire la risalita degli adulti sulla chioma, durante le ore notturne. Le fasce di resinato di lana, ostacolano le zampe dell'insetto grazie alla particolare struttura della lana sintetica; gli insetti vengono catturati in massa. La tesi trattata con il fungo entomopatogeno è stata messa a confronto con quelle dell'applicazione dei manicotti. Dai risultati acquisiti risulta che il trattamento con il fungo entomopatogeno ha ridotto in modo molto significativo l'abbondanza della popolazione dell'Oziorrinco rispetto alla tesi che ha previsto l'impiego dei manicotti. Inoltre è stato stimato un impatto di oltre il 70% sulla loro densità di attività. Infatti, l'andamento fenologico durante tutto il

periodo post trattamento si presenta abbastanza contenuto nella tesi trattata. Di conseguenza i danni provocati dall'erosione sui margini fogliari sono stati contenuti intorno al 20%, al pari della tesi con i manicotti, mentre oltre il 55% di danno fogliare si è registrato nella tesi controllo. In seguito a questa prima esperienza di protezione dell'olivo dagli adulti di Oziorrinco mediante prodotto biologico, si può desumere che il trattamento saggiato ha dimostrato una protezione uguale o addirittura maggiore dei manicotti per i quali è richiesto un costo maggiore per la manodopera.

In riferimento ai parametri chimici ed organolettici dell'olio, le indagini svolte hanno evidenziato una maggiore qualità degli oli prodotti nelle parcelle trattate con sostanze attive efficaci, rispetto ai controlli.

## Lotta ai patogeni

Per quanto attiene ai patogeni sono state svolte anche in questo caso indagini sulla suscettibilità varietale con interessanti indicazioni su genotipi poco suscettibili e su *Verticillium dahliae* sono state effettuate prove di resistenza genetica. La lotta contro *Verticillium dahliae* Kleb. è difficile e di incerta efficacia, per cui risultava importante individuare sistemi che prevenivano l'infezione. Con questo studio si è voluto approcciare il tema della resistenza genetica mediante test su alcune importanti e diffuse varietà di olivo, infettandole artificialmente con un patotipo fortemente virulento di *V. dahliae* ottenuto da olivo. Otto piantine di "Koroneiki", "Roggianella", "Carolea", "Cassanese", "Ottobratica", "Arbequina", "Leccino", "Arbosana", "Frantoio", "Urano", "Ascolana", "Coratina", "Pendolino" e "Nocellara messinese" sono state utilizzate nel saggio di resistenza, inocolandole artificialmente con la tecnica della ferita su fusto. Per la valutazione di resistenza, sono state individuate cinque categorie d'infezione in relazione alla gravità dei sintomi. La prova ha evidenziato una minore resistenza delle varietà Ottobratica, Leccino, Ascolana e Nocellara messinese, anche se i sintomi della malattia sono apparsi moderatamente gravi e la defogliazione assente. Frantoio, Arbequina, Arbosana e Urano sono risultate le varietà più resistenti, in quanto esenti da qualunque sintomo della malattia. Ulteriori test sono stati effettuati con altri isolati del patogeno, anche provenienti da diverse aree olivicole, su altre entità genetiche di olivo, con l'impiego di diversi patotipi di *V. dahliae* e, più recentemente, studiando l'interazione ospite/patogeno anche con approcci molecolari. In questo lavoro è stata valutata la resistenza genetica di alcune importanti cultivar attraverso uno *screening* di suscettibilità alla verticilliosi e la messa a punto di una tecnica molecolare per studiare l'espressione di geni coinvolti nella risposta di difesa. Queste prove hanno dimostrato e/o confermato un diverso comportamento delle cultivar saggiate in relazione all'inoculazione con diversi ceppi di *V. dahliae*, mettendo in evidenza ulteriormente come la resistenza genetica della cultivar sia subordinata alla virulenza del ceppo patogeno. La cv Frantoio non ha mostrato alcun sintomo della malattia, evidenziando una potenziale resistenza genetica al patogeno; le cv Ottobratica e Sant'Agostino hanno mostrato una elevata suscettibilità alla malattia. Ad ulteriori approfondimenti, invece, sono demandati le conclusioni circa il comportamento delle cv Arbequina, Arbosana e Urano, tre cultivar in crescente diffusione con i nuovi impianti superintensivi: le prime due hanno mostrato una sensibilità diversa in relazione alla virulenza del ceppo di *V. dahliae* impiegato nel saggio, "Urano" invece non ha mostrato alcuna suscettibilità nei confronti dei ceppi utilizzati, pertanto potrebbe acquisire un ruolo di grande importanza nella gestione ecosostenibile dei nuovi impianti. Le ricerche, proseguiranno con ulteriori approfondimenti, sia sul comportamento dei diversi genotipi verso ulteriori ceppi di *V. dahliae* sia sul ruolo svolto da geni chiave del metabolismo fenolico nei meccanismi di resistenza dell'olivo.

Sempre nel campo delle malattie, sono state svolte prove di lotta contro *Spilocaea oleagina*, agente

eziologico dell'“occhio di pavone”, mediante impiego di un nuovo prodotto sistemico a base di tetraconazolo in confronto ai convenzionali metodi di lotta con prodotti cuprici e dodina. I risultati hanno mostrato una sostanziale efficacia dei prodotti tradizionali, maggiore rispetto a quello sistemici testato.

Circa le possibili utilizzazioni dei risultati, si può dire che essi rappresentano un fondamentale orientamento sia per gli olivicoltori in convenzionale ed integrato che in coltivazione biologica, con elevato livello di maturità in quanto prontamente trasferibili nel tessuto produttivo italiano.

### Publicazioni prodotte

- 1) **Iannotta N., Belfiore T., Perri L., Noce M.E., Scalercio S., Vizzarri V., 2009:** Olivo, un fungo entomopatogeno contro gli attacchi dell'oziorrinco. *Informatore Fitopatologico* n.19 del 9-5-2009: 36-38
- 2) **Rouini I., Simeone V., Cesari G., El Bilali H., Perri E., Benincasa C., Scalercio S., Iannotta N., 2009:** Olive fly management using copper, kaolin and propolis in three italian organic olive groves. XIV Simposium scientifico-tecnico del aceite de oliva (EXPOLIVA). Jaèn 13-15 mayo (in press)
- 3) **Rouini I., Simeone V., Cesari G., El Bilali H., Perri E., Benincasa C., Scalercio S., Iannotta N., 2009:** Copper, silicon and aluminium residues in olive oil after olive fly management with kaolin, propolis and copper oxichloride. XIV Simposium scientifico-tecnico del aceite de oliva (EXPOLIVA). Jaèn 13-15 mayo (in press)
- 4) **Benincasa C., Perri E., Iannotta N., Romano E., Scalercio S., 2009:** Determination of spinosad residues in olive drupes using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. XIV Simposium scientifico-tecnico del aceite de oliva (EXPOLIVA). Jaèn 13-15 mayo (in press)
- 5) **Iannotta N., Belfiore T., Bozzo G., Noce M.E., Scalercio S., Vizzarri V., 2009:** Selettività di un'esca avvelenata con spinosad specifica per il controllo dei tefritide (Diptera Tephritidae). *Proceedings XXII Congresso Nazionale di Entomologia* : 208
- 6) **Iannotta N., Belfiore T., Noce M.E., Perri L., Scalercio S., Vizzarri V., 2009:** Imidacloprid: prospettive per la lotta a *Bactrocera oleae* (Rossi,1790) in olivicoltura convenzionale ed integrata. *Proceedings XXII Congresso Nazionale di Entomologia* : 208
- 7) **Noce M.E., Belfiore T., Scalercio S., Vizzarri V., Iannotta N., 2009:** Efficacy of new mass-trapping devices against *Bactrocera oleae* (Rossi,1790) for minimizing pesticide input in agroecosystem. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **44** : 442-448
- 8) **Scalercio S., Belfiore T., Noce M.E., Vizzarri V., Iannotta N., 2009:** The impact of compounds allowed in organic farming on the above-ground arthropods of the olive ecosystem. *Bullettin of insectology* 62 (2): 137-141
- 9) **Noce M.E., Belfiore T., Scalercio S., Vizzarri V., Iannotta N., 2009:** - Assessment of correlation between captures of *Bactrocera oleae* adults and infestation levels of olive fruits in Southern Italy. *REDIA XCII* 2009:15-21
- 10) **Scalercio S., Belfiore T., Noce M.E., Vizzarri V., Iannotta N., 2010:** The abundance of non-target insects is unmodified by applications in olive groves of a spinosad-based bait. *Boll. Soc. Entomologica italiana*, 142 (1): 35-38
- 11) **Benincasa C., Perri E., Iannotta N., Scalercio S., 2011:** LC/ESI-MS/MS method for the identification and quantification of spinosad residues in olive oils. *Food Chemistry* 125 (2011) 1116-1120
- 12) **Iannotta N., Belfiore T., Noce M.E., Scalercio S., Vizzarri V., 2010:** Frantoio, Urano, Arbequina

e Arbosana resistono alla verticilliosi. L'Informatore Agrario 44/2010: 65-67

13) **Vizzari V., Belfiore T., Noce M.E., Scalercio S., Iannotta N. 2011:** Test di resistenza genetica alla verticilliosi (*Verticillium dahliae* Kleb.) su alcune importanti e diffuse cultivar di olivo. Acta Italus Hortus n.1 : 390-393

14) **Noce M.E., Belfiore T., Scalercio S., Zaffina F., Iannotta N.,2011:** Efficacia del formulato commerciale Confidor O-TEQ per la lotta alla mosca delle olive in olivicoltura convenzionale ed integrata. Atti XXIII Congresso nazionale di Entomologia, Genova 13-16 giugno:232 (abstract)

15) **Iannotta N., Belfiore T., Noce M.E., Scalercio S., Vizzari V., Zaffina F.,2011:** Effetti sull'artropodocenosi di trattamenti con imidacloprid impiegato contro *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790) Atti II convegno OLIVO E OLIO, PG 21-23/9/2011. Acta Italus Hortus (in press)

16) **Iannotta N., Belfiore T., Noce M.E., Scalercio S., Zaffina F.,2011:** Efficacia di imidacloprid contro le infestazioni di *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790) in Calabria. Atti II convegno OLIVO E OLIO, PG 21-23/9/2011. Acta Italus Hortus (in press)

Tabella I. Coefficienti di correlazione ( $C_{A/AI}$ ,  $C_{F/AI}$ ,  $C_{FIL}$ ,  $C_{F/P}$ ) e coefficienti di determinazione ( $R^2$ ) calcolati in due anni di osservazione. A=adulti; AI=infestazione attiva; F=femmine; L=larve; P=pupe.

	$C_{A/AI}$	$R^2$	$C_{F/AI}$	$R^2$	$C_{F/L}$	$R^2$	$C_{F/P}$	$R^2$
Primo anno								
ARC1	0.765**	0.5850	0.788**	0.6217	0.748*	0.5595	0.885**	0.7834
ARC2	0.899**	0.8088	0.912**	0.8327	0.932**	0.8687	0.794**	0.6299
REN1	0.741*	0.5489	0.785**	0.6159	0.907**	0.8232	0.814**	0.6618
REN2	0.798**	0.6368	0.831**	0.6905	0.825**	0.6811	0.830**	0.6896
ROS1	0.919**	0.8447	0.940**	0.8845	0.866**	0.7508	0.746*	0.5569
TER1	0.339	0.1152	0.328	0.1080	0.547	0.2998	0.409	0.1675
TER3	0.567	0.3220	0.584	0.3415	0.757*	0.5730	0.616	0.3792
TER7	0.284	0.0805	0.263	0.0691	0.605	0.3656	0.266	0.0709
Secondo anno								
ARC2	0.877**	0.7693	0.833**	0.6944	0.883**	0.7797	0.785**	0.6170
ARC3	0.739**	0.5455	0.684*	0.4673	0.658*	0.4336	0.717**	0.5137
ARC5	-0.020	0.0004	-0.103	0.0105	0.198	0.0393	0.004	0.0016
MIR6	0.515	0.2651	0.598	0.3578	0.213	0.0453	0.802**	0.6441
REN1	0.462	0.2138	0.459	0.2106	0.610*	0.3506	0.786**	0.6176
REN2	0.727**	0.5280	0.699*	0.4893	0.501	0.2512	0.770**	0.5926
REN3	0.276	0.0761	0.373	0.1390	0.261	0.0681	0.592*	0.3506
REN4	0.686*	0.4700	0.696*	0.4840	0.656*	0.4307	0.766**	0.5873
TER3	0.775**	0.6005	0.765**	0.5680	0.805**	0.6480	0.882**	0.7775
TER10	0.685*	0.4691	0.652*	0.4246	0.363	0.1318	0.821**	0.6743

\*  $P < 0.05$

\*\*  $P < 0.001$

Tabella 2. Suscettibilità dei genotipi indagati alla mosca e al marciume dei frutti.

Genotipo	<i>B. oleae</i>		<i>C. dalmaticum</i>	Oleuropeina	Cianidina
	IA	IT	IF		
Ascolana tenera	34,33 A	56,33 A	12,00 A	7974,1	0,0
Arbequina	16,00 AB	28,83 B	3,33 b	508,9	11,5
Bardhi Tirana	13,50 c	28,33 DE	1,67 DE	10790,2	0,0
Carboncella di Pianacce	23,67 ab	44,67 ABC	1,33 DE	14458,7	0,0
Carolea	29,83 ab	53,33 AB	4,67 AB	13791,4	0,0
Cassanese	22,17 b	36,67 CD	2,17 BCDE	12587,9	0,0
Cellina di Nardò	9,83 B	17,67 F	3,33 BC	8165,2	79,0
Cima di Melfi	12,17 B	31,83 BCDE	4,67 BC	-	-
Dolce Agogia	18,67 B	40,67 B	3,17 BC	8913,3	27,3
Dolce di Rossano	17,33 B	33,33 BCDE	1,67 BC	11860,3	0,0
Frantoio	10,83 B	20,33 F	0,67 C	7831,2	12,7
Gentile di Chieti	24,00 ab	48,83 AB	4,33 ABC	1,6	0,0
Giarraffa	29,67 ab	55,00 A	5,67 A	12228,2	0,0
Gordal sevillana	14,33 B	28,83 B	7,50 a	3994,2	17,6
Hojiblanca	15,00AB	32,00 AB	3,83 b	5808,2	0,0
Kalamata	19,17 AB	28,50 B	5,00 ab	10571,0	0,0
Konservolia	21,17 A	37,17 A	5,50 ab	5761,2	187,5
Koroneiki	17,83 AB	29,83 B	4,50 ab	5761,2	187,5
Lucques	16,67 AB	31,33 AB	5,50 ab	3557,7	12,6
Manzanilla	17,83 AB	27,00 B	5,00 ab	10517,0	85,6
Moraiolo	16,83 B	27,83 CDEF	4,00 BC	11810,7	0,0
Nera di Cantinelle	10,67 B	27,33 DEF	3,17 BC	8727,3	10,5
Nocellara del Belice	27,00 ab	43,50 BC	2,00 CDE	9413,8	0,0
Nociara	28,17 ab	49,67 AB	1,17 DE	14412,7	0,0
Nolca	12,17 B	29,17 BCDE	4,33 BC	155,9	91,1
Nostrale di F. Romano	17,17 B	41,83 B	3,67 BC	3174,0	34,0
Nostrana di Brisighella	32,33 A	56,67 A	11,17 A	6444,0	0,0
Ogliarola del Bradano	16,50 B	27,67 CDEF	4,50 BC	3830,2	0,0
Ogliarola garganica	14,50 B	34,50 BCDE	2,83 BC	5387,2	71,6
Ogliarola del Vulture	15,50 B	36,83 BCD	6,00 B	9082,3	36,9
Picholine	24,83 ab	46,50 ABC	3,17 ABCD	8563,7	0,0
Picual	18,83 AB	31,33 AB	3,00 b	8915,3	21,8
Termite di Bitetto	12,83 B	30,17 BCDE	3,67 BC	1654,4	34,0
Tonda di Strongoli	11,50 B	24,67 EF	1,50 BC	8299,6	0,0
Tonda nera dolce	6,67 d	19,25 E	0,58 E	85,0	26,3

Tabella 3. Efficacia imidacloprid (Confidor O-TEQ). Dati dettagliati (Media  $\pm$  DS) relativi ai singoli stadi determinanti le percentuali di infestazione registrate nelle diverse tesi in corrispondenza di ogni rilievo effettuato nell'anno di osservazione 2010. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative tra le tesi: analisi della varianza ANOVA, post hoc test LSD, lettere minuscole: P = 0,05; lettere maiuscole: P = 0,01.

	Punture sterili	Uova	Larve	Pupe	Larve morte	Pupe morte	Fori sfarfi.	Inf. Attiva	Inf. Totale
9-Ago	13,00 $\pm$ 13,96	1,00 $\pm$ 2,24	13,00 $\pm$ 9,08	9,00 $\pm$ 12,45	C50 6,00 $\pm$ 5,48	0	0	23,00 $\pm$ 2,168	42,00 $\pm$ 25,64
19-Ago	41,00 $\pm$ 8,22	2,00 $\pm$ 4,47	3,00 $\pm$ 4,47	4,00 $\pm$ 4,18	6,00 $\pm$ 4,18	2,00 $\pm$ 2,74	1,00 $\pm$ 2,24	9,00 $\pm$ 2,24	59,00 $\pm$ 7,42
30-Ago	55,00 $\pm$ 5,00	2,00 $\pm$ 0	6,00 $\pm$ 6,52	4,00 $\pm$ 4,18	4,00 $\pm$ 8,94	2,00 $\pm$ 2,74	5,00 $\pm$ 5,00	10,00 $\pm$ 9,35	76,00 $\pm$ 16,36
10-Set	40,00 $\pm$ 16,58	3,00 $\pm$ 2,24	8,00 $\pm$ 9,75	15,00 $\pm$ 7,07	11,00 $\pm$ 5,48 10,00a $\pm$	4,00 $\pm$ 6,52	12,00 $\pm$ 4,47	24,00 $\pm$ 8,94 15,00ab $\pm$	91,00 $\pm$ 9,62
21-Set	30,00 $\pm$ 13,69	1,00 $\pm$ 2,24	9,00 $\pm$ 10,84	2,00a $\pm$ 2,74	10,00	2,00 $\pm$ 2,74	17,00 $\pm$ 12,04	10,61	91,00 $\pm$ 10,25
1-Ott	61,00 $\pm$ 9,62	1,00 $\pm$ 2,24	0	5,00 $\pm$ 8,66	16,00 $\pm$ 8,22	1,00 $\pm$ 2,24 10,00A $\pm$	16,00 $\pm$ 15,57	5,00A $\pm$ 8,66	99,00A $\pm$ 2,24
20-Ott	52,00b $\pm$ 4,47	3,00 $\pm$ 0,9	0A	0a	13,00b $\pm$ 2,74	6,12	15,00 $\pm$ 3,54	0A	90,00A $\pm$ 6,12
04-Nov	58,00C $\pm$ 4,47 55,00B $\pm$	2,00 $\pm$ 2,00	6,00 $\pm$ 4,18	0A	5,00AB $\pm$ 5,00	7,00 $\pm$ 7,58	7,00A $\pm$ 5,70	6,00A $\pm$ 4,18 17,00ab $\pm$	83,00A $\pm$ 5,70
19-Nov	17,68	1,00 $\pm$ 2,24	13,00B $\pm$ 9,08	2,00 $\pm$ 4,47	3,00 $\pm$ 4,47	1,00 $\pm$ 2,24	15,00A $\pm$ 10,00	11,51	91,00 $\pm$ 5,48
30-Nov	49,00 $\pm$ 17,82	0	13,00 $\pm$ 8,37	0	1,00 $\pm$ 2,24	0	27,00 $\pm$ 17,89	18,00 $\pm$ 5,70	95,00 $\pm$ 8,94
9-Ago	19,00 $\pm$ 10,84	1,00 $\pm$ 2,24	11,00 $\pm$ 14,32	5,00 $\pm$ 7,07	C62,5 2,00 $\pm$ 2,74	0	1,00 $\pm$ 2,24	17,00 $\pm$ 19,87	39,00 $\pm$ 16,73
19-Ago	33,00 $\pm$ 13,96	1,00 $\pm$ 2,24	3,00 $\pm$ 2,74	10,00 $\pm$ 7,91	5,00 $\pm$ 5,00	0	6,00 $\pm$ 6,52	14,00 $\pm$ 9,62	58,00 $\pm$ 13,51
30-Ago	48,00 $\pm$ 16,05	2,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 2,74	9,00 $\pm$ 6,52	7,00 $\pm$ 7,58	3,00 $\pm$ 4,47	9,00 $\pm$ 13,42	11,00 $\pm$ 8,94	78,00 $\pm$ 15,25
10-Set	48,00 $\pm$ 16,05	4,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 2,74	9,00 $\pm$ 6,52 5,00ab $\pm$	7,00 $\pm$ 7,58 27,00b $\pm$	3,00 $\pm$ 4,47	9,00 $\pm$ 13,42	11,00 $\pm$ 8,94	78,00 $\pm$ 15,25
21-Set	50,00 $\pm$ 13,23	1,00 $\pm$ 2,24	6,00 $\pm$ 8,22	6,52	15,25	1,00 $\pm$ 2,24	12,00 $\pm$ 13,04	5,00a $\pm$ 3,54	90,00 $\pm$ 15,41
1-Ott	42,00 $\pm$ 21,39	0	2,00 $\pm$ 4,47	0	10,00 $\pm$ 7,91	4,00 $\pm$ 4,18	27,00 $\pm$ 20,80	2,00A $\pm$ 4,47	85,00B $\pm$ 9,35
20-Ott	34,00a $\pm$ 17,46	2,00 $\pm$ 4,47	0A	0a	4,00a $\pm$ 4,18	1,00B $\pm$ 2,24	16,00 $\pm$ 8,94	0A	55,00B $\pm$ 20,31 76,00A $\pm$
04-Nov	39,00B $\pm$ 6,52	2,00 $\pm$ 2,00	5,00 $\pm$ 6,12	0A	20,00B $\pm$ 7,07	2,00 $\pm$ 4,47	10,00A $\pm$ 6,12	5,00A $\pm$ 6,12	20,24
19-Nov	58,00B $\pm$ 9,08	1,00 $\pm$ 2,24	4,00A $\pm$ 4,18	3,00 $\pm$ 2,74	5,00 $\pm$ 6,12	3,00 $\pm$ 4,47	13,00A $\pm$ 8,37	7,00a $\pm$ 5,70	86,00 $\pm$ 8,94
30-Nov	57,00 $\pm$ 14,83	0	12,00 $\pm$ 9,75	0	1,00 $\pm$ 2,24	0	24,00 $\pm$ 5,48	15,00 $\pm$ 10,61	97,00 $\pm$ 7,58
9-Ago	24,00 $\pm$ 9,62	1,00 $\pm$ 2,07	10,00 $\pm$ 11,73	1,00 $\pm$ 2,24	Testimone 7,00 $\pm$ 5,70	0	2,00 $\pm$ 2,74	15,00 $\pm$ 18,37	48,00 $\pm$ 24,14
19-Ago	40,00 $\pm$ 10,61	1,00 $\pm$ 2,24	4,00 $\pm$ 2,24	9,00 $\pm$ 7,42	9,00 $\pm$ 6,52	0	1,00 $\pm$ 2,24	14,00 $\pm$ 6,52	64,00 $\pm$ 10,84
30-Ago	55,00 $\pm$ 7,91	2,00 $\pm$ 0	0	5,00 $\pm$ 6,12	4,00 $\pm$ 4,18	0	13,00 $\pm$ 13,04	5,00 $\pm$ 6,12	77,00 $\pm$ 9,75
10-Set	60,00 $\pm$ 15,81	4,00 $\pm$ 1,00	3,00 $\pm$ 4,47	7,00 $\pm$ 10,37 11,00b $\pm$	11,00 $\pm$ 11,40	0	9,00 $\pm$ 6,52	14,00 $\pm$ 7,42	94,00 $\pm$ 4,18
21-Set	55,00 $\pm$ 22,36	1,00 $\pm$ 2,24	1,00 $\pm$ 2,24	3,54 12,62 $\pm$	6,00b $\pm$ 10,84	1,00 $\pm$ 2,24	24,00 $\pm$ 17,10	21,00b $\pm$ 8,94	95,00 $\pm$ 11,18
1-Ott	46,77 $\pm$ 12,38	1,00 $\pm$ 2,24	4,08 $\pm$ 6,68	12,11	6,00 $\pm$ 5,48	2,00 $\pm$ 2,74	20,54 $\pm$ 13,46	23,69B $\pm$ 11,43	99,00A $\pm$ 2,24
20-Ott	31,00a $\pm$ 6,52	3,00 $\pm$ 0,60	20,00B $\pm$ 10,00	7,00b $\pm$ 7,58	7,00ab $\pm$ 6,71	2,00B $\pm$ 2,74	23,00 $\pm$ 10,95	27,00B $\pm$ 16,81	90,00A $\pm$ 7,91
04-Nov	29,00A $\pm$ 5,48 23,00A $\pm$	2,00 $\pm$ 2,00	19,00 $\pm$ 13,87	7,00B $\pm$ 2,74	3,00A $\pm$ 4,47	1,00 $\pm$ 1,24	37,00B $\pm$ 19,87	28,00B $\pm$ 16,43	98,00B $\pm$ 4,47
19-Nov	12,55	2,00 $\pm$ 0	20,00B $\pm$ 3,54	2,00 $\pm$ 0	1,00 $\pm$ 2,24	2,00 $\pm$ 4,47	44,00B $\pm$ 10,84	23,00b $\pm$ 7,58	93,00 $\pm$ 7,58
30-Nov	34,00 $\pm$ 18,84	1,00 $\pm$ 0,50	16,00 $\pm$ 11,40	0	3,00 $\pm$ 4,47	0	44,00 $\pm$ 10,84	17,00 $\pm$ 12,04	98,00 $\pm$ 6,12

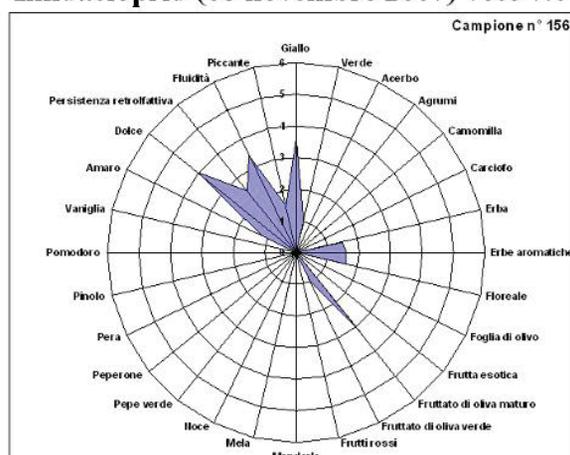
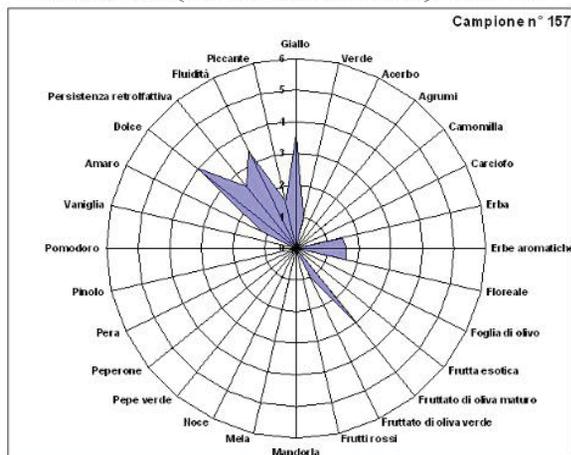
**Imidacloprid (08 novembre 2007) voto 7.0****Controllo (08 novembre 2007) voto 6.8**

Figura 1. Profilo sensoriale dell'olio ottenuto con olive trattate con imidacloprid (a sinistra, punteggio panel 7.0) e non trattate (a destra, punteggio panel 6.8).

Tabella 4. Abbondanza dei taxa campionati nelle tesi sperimentali durante il 2009 calcolata come numero di individui.

	Confidor 62,5%		Confidor 50%		Controllo	
	2009	2010	2009	2010	2009	2010
Araneae	123	74	135	74	110	48
Opiliones	3	0	15	1	24	6
altri Hymenoptera	106	99	169	92	74	139
Ichneumonoidea	127	40	53	112	70	72
Formicidae	144	57	133	46	210	61
Coccinellidae	8	4	12	4	16	7
Macrolepidoptera	83	44	56	28	47	37
Neuroptera	14	38	44	27	18	33
Mecoptera	44	1	22	9	181	11
Syrphidae	56	83	152	57	42	118
Cicadellidae	205	199	171	291	617	253
Heteroptera	50	18	45	37	74	46
Homoptera	109	90	83	105	118	123
TOTALE CATTURATI	7763	6277	11700	5398	9617	8263
TOTALE DETERMINATI	1072	747	1090	883	1601	954

Tabella 5. Rapporti dopo/prima trattamenti della cenosi campionata. Per Opiliones e Mecoptera non è disponibile alcun valore per l'assenza degli individui prima dei trattamenti.

	2009			2010		
	Confidor 62,5%	Confidor 50%	Controllo	Confidor 50%	Confidor 62,5%	Controllo
Araneae	1,71	1,48	1,03	0,48	0,75	0,88
altri Hymenoptera	0,88	1,12	1	0,28	0,18	0,75
Hymenoptera Ichneumonoidea	0,38	0,5	1,47	0,18	0,35	1,94
Hymenoptera Formicidae	1,68	2,61	1,72	1,4	0,17	2,14
Coleoptera Coccinellidae	0	5	1	0	0	1
Lepidoptera	3,63	8,25	2,2	0,64	2,27	1,78
Neuroptera	1,5	0,45	1	0,44	0,43	0,13
Diptera Syrphidae	6,67	9,67	21	0,84	0,86	1,38
Hemiptera Cicadellidae	0,04	0,13	1,59	0,48	0,38	3,1
Hemiptera Heteroptera	0,36	1	0,9	0,21	0,29	0,76
Hemiptera Homoptera	0,4	0,77	0,78	1,1	1,35	0,24
<b>TOTALE</b>	0,63	0,95	1,57	0,49	0,52	1,13

Tabella 6. Dati di cattura circa tesi trattata con dispositivi attivati con spinosad e non attivati.

	ATTIVATO	NON ATTIVATO	$F_{1,47}$	$P$
<b><i>Bactrocera oleae</i></b>	<b>12.1 A</b>	<b>4.1 B</b>	<b>8.48</b>	<b>0.005</b>
<b><i>Ceratitis capitata</i></b>	<b>5.72 A</b>	<b>1.29 B</b>	<b>6.44</b>	<b>0.01</b>
<b>Altri Diptera</b>	<b>11.93 A</b>	<b>5.29 B</b>	<b>22.33</b>	<b>5E-06</b>
<b>Altri Insecta</b>	<b>19.22 B</b>	<b>22.71 A</b>	<b>0.53</b>	<b>0.47</b>

Tabella 7. Valori di LOD e LOQ, recovery e precision (RSD) di spinosine in campioni di olio.

Analyte	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fortified (ng/mL)	(mean $\pm$ RSD) <sup>a</sup>	Recovery (%)	Fortified (ng/mL)	(mean $\pm$ RSD) <sup>b</sup>	Recovery (%)	Fortified (ng/mL)	(mean $\pm$ RSD) <sup>b</sup>	Recovery (%)
Spinosyn A	0.003	0.010	200	226 $\pm$ 3	113	100	116 $\pm$ 5	116	50	130 $\pm$ 3	130
Spinosyn D	0.002	0.005	200	196 $\pm$ 3	98	100	105 $\pm$ 6	105	50	103 $\pm$ 0	103
Spinosyn B	0.029	0.098	200	173 $\pm$ 8	87	100	99 $\pm$ 7	99	50	105 $\pm$ 2	105
Spinosyn K	0.003	0.008	200	178 $\pm$ 1	89	100	91 $\pm$ 7	91	50	97 $\pm$ 1	97

<sup>a</sup> Each value is the mean of three determinations, RSD = relative standard deviation.

<sup>b</sup> Each value is the mean of six determinations, RSD = relative standard deviation.

Figura 2. Efficacia del caolino.

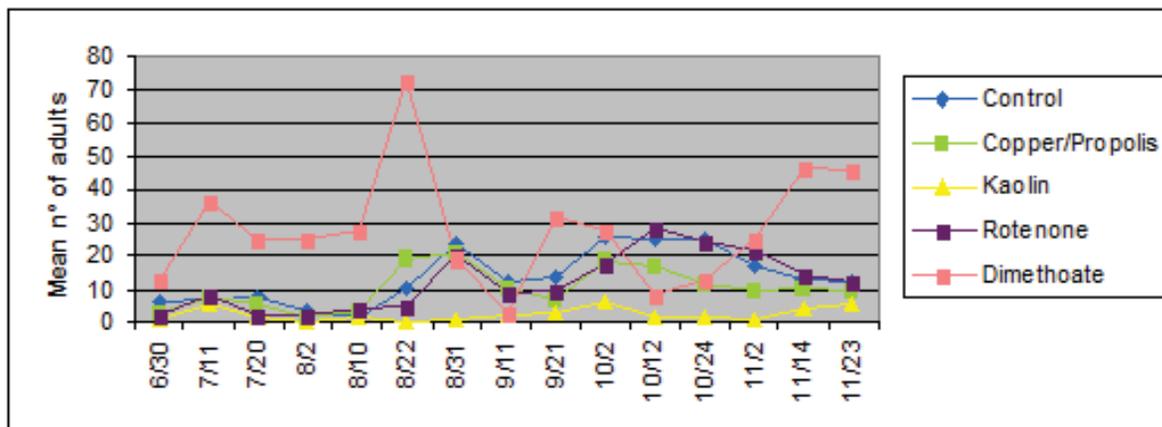


Figura 3. Andamento della popolazione adulta di Oziiorrinco nella parcella tratta con fungo entomopatogeno (sinistra) e con maniccotti (destra).

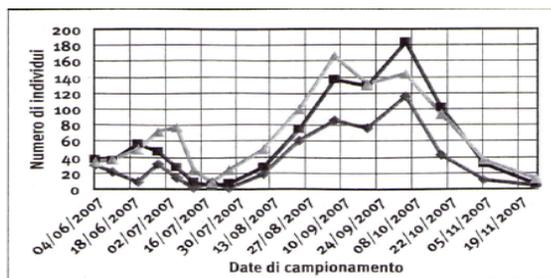
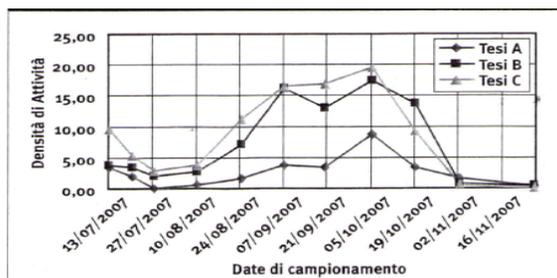


Tabella 8. Risultati del saggio di suscettibilità genotipica. Cultivar e isolati utilizzati (10 repliche per ogni cultivar).

Cultivar Isolato	<b>Arbequina</b>				<b>Arbosana</b>				<b>Urano</b>			
	20%	50%	75%	100%	20%	50%	75%	100%	20%	50%	75%	100%
<b>ND (Sicilia)</b>												
<b>ND M (Puglia)</b>			2	2				1				
<b>D (Puglia)</b>				3								
<b>Mirto(Calabria)</b>												
<b>ND(Umbria)</b>												

Cultivar Isolato	<b>S. Agostino</b>				<b>Ottobratica</b>				<b>Frantoio</b>			
	20%	50%	75%	100%	20%	50%	75%	100%	20%	50%	75%	100%
<b>ND (Sicilia)</b>				2			1	1				
<b>ND M (Puglia)</b>				1			1	1				
<b>D (Puglia)</b>				6				2				
<b>Mirto(Calabria)</b>												
<b>ND(Umbria)</b>												

Tabella 9. Caratteristiche dell'olio ottenuto con olive trattate e non trattate.

LOCALITA'	Mirto						Terranova da Sibari					
	Carolea, Dolce di Rossano, Cassanese			Multivarietale			06 novembre			20 novembre		
	26 ottobre	08 novembre		02 ag. - 12 sett.		Controllo	Caolino	Naturalis	Controllo	Caolino	Naturalis	Controllo
DATA TRATTAMENTO	Imidacloprid 13 sett.	Controllo -	Imidacloprid 13 sett.	Controllo -	Caolino 02 ag. - 12 sett.	Controllo -	Caolino 02 ag. - 12 sett.	Naturalis 12 sett.	Controllo -	Caolino 02 ag. - 12 sett.	Naturalis 12 sett.	Controllo -
INFESTAZIONE												
<b>attiva</b>	2,0	3,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	7,0	2,5	4,5	8,0
<b>totale</b>	14,0	32,0	24,0	19,0	17,0	21,0	26,0	32,0	35,0	32,0	35,0	35,0
INDICE DI JAEN	7	0,1	7	7	1,5	3,99	6,5	6,5	2,7	6,5	6,5	6,5
PARAMETRI MERCEOLOGICI												
Acidità	0,50	0,42	0,35	0,79	0,42	0,35	0,28	0,42	0,35	0,28	0,42	0,42
<b>n° perossidi</b>	10,2	9,0	12,4	18,5	10,2	10,2	12,0	12,2	10,2	12,0	12,2	9,8
PARAMETRI SALUTISTICI												
<b>Fenoli totali</b>	176,83	348,33	160,53	118,12	270,77	275,12	259,65	258,74	179,52	60,70	51,38	55,44
<b>Tociferoli</b>	59,85	61,00	52,21	48,11	47,83	56,06	60,70	51,38	46,35	60,70	51,38	55,44
ACIDI GRASSI												
C <sub>16:0</sub>	13,95	13,37	11,70	11,50	15,72	17,04	12,55	14,27	14,92	12,55	14,27	13,49
C <sub>18:1</sub>	67,91	70,37	72,70	72,50	67,69	64,98	70,75	69,54	67,81	70,75	69,54	70,04
C <sub>18:2</sub>	13,08	11,61	11,29	11,28	10,52	11,98	10,67	9,60	10,94	10,67	9,60	10,96
VOTO PANEL	8,0	7,7	7,0	6,8	7,2	7,0	7,3	7,8	7,0	7,3	7,8	7,0



# Linee guida per la gestione degli oliveti secolari

V. Simeone<sup>1</sup>, M. Tucci<sup>1</sup>, R. Viti<sup>1</sup>,  
J. Calabrese<sup>1</sup>, E. Perri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari (C.I.H.E.A.M.)

<sup>2</sup>Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), C.da Li Rocchi, 87036 Rende (CS)

## Introduzione

Gli olivicoltori sono i custodi del nostro paesaggio ed i depositari del sapere che ruota intorno agli oliveti; essi sanno come ottenere produzioni di qualità dagli olivi secolari ma le sfide imposte dal mercato, impongono dei cambiamenti non sempre compatibili con la salvaguardia del territorio. La presente linea guida, realizzata grazie al progetto RIOM (Ricerca, Innovazione in Olivicoltura Meridionale), finanziato dal MiPAAF ha lo scopo di fornire suggerimenti per la gestione degli oliveti secolari nell'area pugliese. Per fare questo è necessario considerare l'agroecosistema degli oliveti secolari e attuare le pratiche agricole necessarie all'ottenimento di una produzione di qualità, seguendo alcune semplici regole.

### L'agroecosistema

L'agroecosistema definisce quella parte di territorio modificato dall'uomo, in cui si svolge l'attività agricola e differisce quindi dagli ecosistemi naturali. Se consideriamo il numero e la presenza di specie vegetali ed animali come espressione della biodiversità di un sistema territoriale, allora appare evidente come i campi coltivati e le aree dedicate all'agricoltura in genere, siano più poveri in biodiversità al confronto dei sistemi naturali coesistenti sullo stesso territorio. Per praticare una olivicoltura a basso impatto ambientale (ecocompatibile) è necessario creare o ricreare un equilibrio tra l'ambiente e la coltura in modo tale da ridurre o eliminare il ricorso ad input esterni. Il raggiungimento di questo "equilibrio" tra la parte produttiva dell'agroecosistema (i campi coltivati e l'azienda agraria) e l'impiego sostenibile delle risorse naturali presenti, presuppone da un lato la piena conoscenza delle caratteristiche dei nostri oliveti, dall'altro la messa in opera di una serie di accorgimenti finalizzati a rendere più "complesso" l'agroecosistema considerato, rendendolo cioè più simile per quanto possibile, ai sistemi naturali.

Questi accorgimenti sono :

- salvaguardare o, se non presenti, creare delle aree aziendali, quali siepi, alberature, zone umide, eventuali muretti a secco, ecc., dove organismi utili possono rifugiarsi, nutrirsi e riprodursi;
- creare e/o mantenere dei buoni livelli di fertilità del terreno, attraverso un'attenta gestione della sostanza organica, dando particolare importanza all'utilizzo dei materiali organici presenti in azienda (es. residui colturali);
- conservare il suolo, proteggendolo da agenti fisici degradativi, come il vento e l'acqua, che possono dare luogo a problemi di erosione;
- valorizzare e scegliere le varietà coltivate più adatte all'ambiente considerato;
- utilizzare in maniera ottimale le risorse naturali (es. l'acqua);
- condurre in maniera razionale le pratiche colturali

- ridurre i costi di produzione limitando il più possibile i fattori di produzione esterni all'azienda stessa come, ad esempio, i fertilizzanti chimici ed i prodotti di sintesi per la difesa delle piante.

Nelle aziende olivicole condotte con il metodo di coltivazione a basso impatto è molto importante prevedere aree naturali e seminaturali, quali alberature, siepi, aree, dove sono presenti varie specie erbacee, arbustive ed arboree, che rappresentano luoghi di rifugio e di "produzione" ("biofabbriche") di insetti (predatori, parassitoidi), acari, uccelli ed altri animali (anfibi, piccoli rettili, ecc.) utili. Gli spazi naturali e seminaturali svolgono al meglio il loro ruolo se sono distribuiti in maniera tale da avere una continuità fisica fra le diverse infrastrutture ecologiche presenti nell'azienda e, possibilmente, anche con quelle eventualmente presenti all'esterno della stessa. L'estensione degli spazi dedicati alla realizzazione di un'elevata biodiversità non dovrebbero essere meno del 5% (soprattutto in piccole aziende e quando nel territorio circostante l'azienda, gli spazi naturali sono molto limitati e le aziende vicine non hanno infrastrutture ecologiche o ne dispongono in quantità limitata). Ovviamente, la loro importanza aumenta all'incrementare della dimensione aziendale e, naturalmente, sono da considerare nel computo eventuali spazi coperti da vegetazione di origine naturale (es. boschi).

Nella tab. 1 sono riportate alcune specie che favoriscono la presenza di predatori e/o parassitoidi di insetti dannosi per l'olivo e che, pertanto, andrebbero utilizzate per la realizzazione di infrastrutture biologiche o, se presenti, salvaguardate.

Piante che favoriscono la presenza di insetti utili	Insetti utili	Insetti dannosi controllati
Ginestrella comune <i>Osyris alba</i> (L.)	<i>Chelonus eleaphilus</i>	Tignola dell'olivo
Acacia spinosa, Spino di Giuda <i>Gleditschia triacanthos</i> (L.)	<i>Eupelmus urozonus</i>	Mosca dell'olivo
Enula cepittoni, Prucaria <i>Inula viscosa</i> (L.)	<i>Eupelmus urozonus</i>	Mosca dell'olivo
Giuggiolo comune <i>Zyziphus sativa</i> (Gaertn.)	<i>Psytalia concolor</i>	Mosca dell'olivo
Cappero <i>Capparis spinosa</i> (L.)	<i>Psytalia concolor</i> <i>Chelonus eleaphilus</i>	Mosca dell'olivo Tignola dell'olivo
Mirto <i>Myrtus communis</i> (L.)	<i>Scutellista cyanea</i>	Cocciniglia nera dell'olivo
Lentisco <i>Pistacia lentiscus</i> (L.)	<i>Scutellista cyanea</i>	Cocciniglia nera dell'olivo

Tab. 1 Specie utili nell'agroecosistema oliveto.

Di seguito si riporta una breve descrizione delle specie vegetali elencate in tabella.

**Famiglia:** Santalacee

**Nome scientifico:** *Osyris alba* (L.)

**Nome comune:** Ginestrella comune

È un piccolo arbusto della macchia mediterranea, alto sino a 1,5 m, sempreverde e con numerosi rami eretti. Le foglie si sviluppano in inverno e sono pressoché assenti in estate. Fiorisce da aprile

a giugno. Il frutto è una drupa carnosa di colore rosso vivo a maturazione (da settembre a ottobre). Le Santalaceae sono piante semiparassite: malgrado abbiano la clorofilla e siano, quindi, in grado di fotosintetizzare, assorbono acqua e sali minerali dalle radici e dai rami di altre piante. Le drupe, malgrado l'aspetto invitante, hanno un sapore sgradevole, come testimonia il nome *Osyris* che deriva da *Oxys* = acido. Tra gli insetti utili che ospita c'è il *Chelonus eleaphilus* che è un parassitoide della tignola dell'olivo (*Prays oleae*).

**Famiglia: Leguminosae**

**Nome scientifico: Gleditschia triacanthos (L.)**

**Nome comune: Acacia spinosa, Spino di Giuda**

Lo Spino di Giuda cresce in qualunque tipo di terreno adattandosi anche ai terreni poveri. Si propaga per seme. Fiorisce a maggio. Resiste all'inquinamento atmosferico, può tollerare una certa ombra e non viene danneggiato dalle gelate invernali. I suoi rami sono molto fragili, per cui vengono facilmente spezzati dal vento. Lo spino di Giuda è utile nella lotta contro la mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae* Gmelin). Infatti, questa pianta viene infestata da un dittero cecidomide, la Cecidomia dell'acacia spinosa (*Dasyneura gleditschiae*), che produce tipiche galle rossastre sulle foglie e grazie alla presenza di questo insetto, particolarmente nel periodo di agosto-settembre, si osserva la presenza dell'*Eupelmus urozonus*, un insetto entomofago, molto utile, perchè oltre che parassitizzare la Cecidomia dell'acacia spinosa, attacca anche la mosca dell'olivo, soprattutto nel periodo estivo-autunnale, durante il quale la mosca causa i danni maggiori. Lo Spino di Giuda assicura la permanenza delle popolazioni di *E.urozonus* nell'agroecosistema olivetato anche nelle annate di limitata produzione di olive.

**Famiglia: Composite**

**Nome scientifico: Inula viscosa (L.)**

**Nome comune: Enula cepittoni, Prucaria**

In Puglia questa specie si riscontra sull'intero territorio, sia lungo le coste sia negli ambienti dell'entroterra, ma sempre ad altitudini inferiori a 800 m. Prospera in ambienti ruderali, incolti, come ad esempio il bordo delle strade. Grazie alla sua peculiarità di essere rustica e vigorosa, viene impiegata nei programmi di recupero ambientale, per il ripristino di cave, scarpate, ecc.. Durante la fioritura, che si protrae da fine agosto ad ottobre, assume un aspetto gradevole per i suoi abbondanti fiori di colore bianco. L'Enula cepittoni viene attaccata da un dittero, il miopite (*Myopites stylata*), che determina sul capolino la produzione di galle all'interno delle quali si sviluppano le larve dell'insetto. Il miopite viene parassitizzato dall'*E. urozonus*, che è un insetto che si sviluppa su varie larve, comprese quelle della mosca dell'olivo. Più precisamente, le larve della *B. oleae*, vengono parassitizzate nel periodo compreso tra luglio ed ottobre, successivamente l'*E. urozonus*, abbandona l'olivo e sverna nelle galle dell'*Inula viscosa*. Di conseguenza, la presenza dell'*Inula*, garantisce la conservazione dell'*E. urozonus* nell'agroecosistema olivetato.

**Famiglia: Rhamnaceae**

**Nome scientifico: Zyziphus sativa (Gaertn.)**

**Nome comune: Giuggiolo comune**

È particolarmente gradita ai pronubi per la sua fioritura abbondante ed il polline appetito. Fiorisce in maggio-luglio. Si propaga per seme o talea. Spoglia in autunno inoltrato ed ha un risveglio primaverile tardivo. Nei frutti del Giuggiolo si sviluppano le larve di una mosca, la *Carpomya incompleta*, che viene parassitizzata dalla *Psytalia concolor*, noto parassita specializzato della mosca delle olive. La *Carpomya* rappresenta uno dei pochissimi ospiti alternativi della *P. concolor*, pertan-

to l'arbusto ospitandola nei suoi frutti assicura la presenza della stessa anche in annate di scarica dell'oliveto o, comunque, durante i periodi in cui non si riscontra la mosca olearia. Inoltre, svolge un ruolo importante nell'incrementare la diversità biologica, grazie ai suoi frutti appetiti da uccelli e numerose specie di insetti.

**Famiglia: Capparidaceae**

**Nome scientifico: Capparis spinosa (L.)**

**Nome comune: Capperò**

La pianta si ritrova generalmente in ambienti rupestri e rocciosi oppure su antichi muri e casolari, dove i semi vengono trasportati dagli uccelli. La capacità di resistere a lunghi periodi di siccità deriva dalla particolare struttura delle foglie e dal capillizio radicale molto sviluppato. Fiorisce in maggio-luglio. Si propaga per talea o per seme. Il capperò può fornire un prodotto facilmente commerciabile sia allo stato fresco che semitrasformato. È una specie che incrementa la presenza di pronubi essendo i suoi fiori particolarmente appetiti da questi insetti. La mosca del capperò (*Capparimyia savastanoi* Mart.) rappresenta uno dei pochissimi ospiti alternativi della *Psytalia concolor*, pertanto la pianta ospitandola nei suoi frutti assicura la presenza della stessa. Il *Chelonus elaphinus*, insetto utile contro la tignola dell'olivo, pur mostrando una spiccata specificità nei confronti della stessa, vive anche a spese di altri lepidotteri come il Tortice del capperò (*Cydia capparidana* Zel.). Pertanto, il *C. spinosa* può favorire anche la presenza di questo insetto utile nella lotta contro la tignola dell'olivo.

**Famiglia: Myrtaceae**

**Nome scientifico: Myrtus communis (L.)**

**Nome comune: Mirto**

Arbusto della macchia mediterranea, sempreverde, aromatico e molto ramificato. Ha foglie coriacee e fiori ermafroditi e solitari. Produce bacche arrotondate che a maturità assumono una colorazione nero-bluastro. Fiorisce a maggio - luglio. Pianta diffusissima nella macchia mediterranea. Predilige le posizioni soleggiate e riparate e terreni con pH neutro o alcalino. Le bacche ed i germogli possono essere utilizzati per produrre un ottimo liquore. Svolge un ruolo importante nei riguardi di alcuni insetti utili nel controllo della cocciniglia nera dell'olivo (*Saissetia oleae*). In particolare, il mirto ospita la *Scutellista cyanea*, che è un parassita di gran parte delle specie di cocciniglie Lecanidi. Tale insetto rappresenta il più attivo e diffuso nemico della *S. oleae*, potendo parassitizzare fino al 70-90% delle uova deposte. Il mirto è tra le piante ritenute utili perché infestate da cocciniglie ospiti della *Scutellista*. Inoltre è ospite anche di specie predate dal *Chilocorus bipustulatus* altro insetto utile nel controllo delle cocciniglie.

**Famiglia: Anacardiaceae**

**Nome scientifico: Pistacia lentiscus (L.)**

**Nome comune: Lentisco**

Arbusto o, raramente, alberello sempreverde. Specie tipica della macchia mediterranea. I frutti sono piccole drupe di 3-5 mm di diametro, prima rosse ed in seguito, a maturità, nere. Fiorisce a marzo - giugno. Svolge un ruolo importante nei riguardi di alcuni insetti utili nel controllo della cocciniglia nera dell'olivo. In particolare, ospita la *Scutellista cyanea* che rappresenta il più attivo e diffuso nemico della *Saissetia oleae*.

**Famiglia: Oleaceae**

**Nome scientifico: Phillirea angustifolia (L.)**

**Nome comune: Filirrea, Ilatro o Lilatro**

Arbusto di 1-3 m di altezza, raramente assume forma di albero, sempreverde. Ha corteccia grigia e foglie opposte, coriacee e lucide nella pagina superiore. I fiori sono raccolti in piccoli racemi ascellari ed hanno petali bianco-rosei. I frutti sono piccole drupe di colore nero-bluastro. Fiorisce a marzo-maggio. La Filirea è diffusa in tutto il bacino del Mediterraneo; in Italia è presente in tutto il paese. Svolge un ruolo importante perché essendo attaccata dalla Tignola dell'olivo (*Prays oleae*) attira su di essa tale parassita.

**Gli olivi secolari, il suolo e il clima**

Gli olivi secolari con la loro longevità e la loro capacità di produrre con continuità nell'arco di tanti secoli dalla piantumazione, dimostrano di essersi perfettamente adattati agli ambienti in cui vivono, di avere un'eccezionale capacità di resistenza alle avversità ambientali e di poter quindi essere la risposta alla sfida posta dai cambiamenti climatici.

Gli olivi secolari abitano, caratterizzano e danno vita al nostro paesaggio da tempi remoti. Dall'antichità queste piante si sono adattate agli ambienti in cui vivono e che soddisfano le esigenze di questa coltura. Questa evidenza indica che il rapporto ambiente-pianta è già ottimizzato e ciò facilita l'applicazione di metodi di coltivazione a basso impatto ambientale che consentono di ridurre al minimo gli interventi colturali (concimazione, irrigazione e trattamenti antiparassitari) ottenendo nel contempo buoni risultati in termini quantitativi e qualitativi.

L'olivo, come ogni specie, ha esigenze pedoclimatiche specifiche che possono variare leggermente a seconda della varietà. Per quanto riguarda il suolo, i risultati migliori si ottengono in suoli di medio impasto, franco sabbiosi, franco-limosi, argillo-limosi o franco-limo-argillosi, aventi un pH compreso tra 6,8 e 7,5. Terreni di questo tipo assicurano un buon equilibrio in termini di aerazione, permeabilità e capacità di ritenzione idrica. I suoli sabbiosi, hanno una ridotta capacità di trattenere i nutrienti e l'acqua mentre quelli argillosi, spesso non consentono un'adeguata aerazione e in pianura, possono risultare soggetti a ristagno idrico, cui questa specie risulta molto sensibile. L'olivo tuttavia presenta una larga adattabilità, riuscendo a crescere e produrre in modo accettabile anche in terreni con un contenuto elevato di scheletro o di calcare, con una limitata dotazione di nutrienti aventi un pH fino a 5,5 e 8,5, cioè relativamente salini e/o sodici. L'olivo, rispetto alla maggior parte delle specie da frutto, presenta una maggiore tolleranza all'eccesso di boro e cloruri nel terreno. Riguardo ai valori massimi di temperatura, l'olivo può resistere anche a temperature superiori a 40-45 °C. Tuttavia, se tali alti valori si prolungano nel tempo, si hanno forti effetti negativi sull'attività vegeto-produttiva delle piante, soprattutto se sono associati a situazioni di carenza idrica. Sono dannose per l'olivo le gelate tardive (inizio primavera) e/o precoci (autunnali). Per quanto riguarda il clima, le temperature minime invernali rappresentano il fattore limitante più importante per l'olivo. La coltura può essere effettuata fino ad altitudini di 600-700 m s.l.m., soprattutto nelle aree di coltivazione più miti (es. sud Italia). La temperatura influenza la composizione chimica dell'olio e quindi le caratteristiche qualitative dello stesso. Ad esempio, gli oli delle zone calde hanno solitamente un maggior contenuto in acidi grassi saturi rispetto a quelli delle zone relativamente fresche.

L'olivo ha una notevole resistenza alla siccità, dovuta a diverse forme di adattamenti anatomici e fisiologici che gli consentono di affrontare meglio della gran parte delle specie arboree da frutto questa avversità, tanto che può sopravvivere e fornire una certa produzione anche in condizioni di piovosità molto bassa (< 300 mm). L'olivo mal sopporta ambienti molto umidi e/o in cui frequentemente ci sono nebbie, perché questi favoriscono gli attacchi di patogeni e/o fitofagi e piogge durante la fioritura comportano una riduzione dell'allegagione.

### Scelta varietale

La Puglia, fra le regioni olivicole, presenta il più alto numero di varietà coltivate (circa 50), in gran parte autoctone, di queste 4-5 cultivar (Ogliarola salentina, Coratina, Cellina di Nardò, Ogliarola barese e Ogliarola garganica) sono diffuse notevolmente, nell'ordine di diverse decine di migliaia di ettari e sono economicamente importanti per l'economia agricola regionale.

Di seguito sono indicate le principali caratteristiche da tenere in considerazione per valutare la rispondenza delle cultivar al metodo di coltivazione a basso impatto ambientale.

Varietà	Motivazioni
Con bassa sensibilità alle avversità biotiche	In un olivicoltura a basso impatto la difesa contro i patogeni (es. occhio di pavone, rogna, ecc.) ed i fitofagi (es. mosca, cocciniglia, ecc.) è più difficoltosa e quindi l'utilizzo di varietà resistenti a tali avversità assume grandissima importanza.
Rustiche, con buona resistenza alle avversità abiotiche	Tollerano meglio situazioni di stress dovute a fattori ambientali (es. temperature basse o elevate, siccità, alta ventosità, salinità, limitata fertilità del suolo, ecc.), che indeboliscono le piante, sono anche meno sensibili alle avversità biotiche. La rusticità consente anche di ottenere soddisfacenti produzioni senza la necessità di forti input nutritivi ed idrici.
A drupa piccola	La mosca, depone di preferenza sulle olive di maggiori dimensione inoltre, nei frutti piccoli, le alte o le basse temperature possono uccidere più facilmente le larve di mosca presenti nella polpa.
Con drupa ad invaiatura precoce	Permettono di ridurre l'incidenza di attacchi tardivi di mosca.
A maturazione precoce	Consentendo di raccogliere le olive in epoca precoce, permettono di sfuggire agli attacchi tardivi di mosca.

Fonte: Pannelli e Alfei - Olivo e Olio n. 6 del 2008 e integrazioni.

Caratteristiche vegetative, produttive e biologiche, suscettibilità alle avversità abiotiche e biotiche e qualità dell'olio delle principali cultivar coltivate in Puglia per la produzione di olio (tabella seguente).

Varietà	Vigorìa	Portamento	Fertilità	Entrata in produzione	Potenziale produttivo		Peso unitario frutti	Resa in olio
Cellina di Nardò	E	Es	Autosterile	P		E	B	M
Cima di Mola	E	Es	Autosterile	P		E	B	E
Coratina	M	Es	Parzialmente autosterile	P		E	M	E
Ogliarola barese	E	SP	Parzialmente autofertile	M		E	M	M
Ogliarola garganica	E	SP	Parzialmente autofertile	M		E	M	M
Ogliarola salentina	E	Es	Autosterile	P		E	B	E
Varietà	Epoca di pigmentazione	Durezza polpa	Oleico/ (Palmitico + Linoleico)	Contenuto in fenoli totali		Sensibilità ad avversità ambientali e parassitarie		
						Occhio di pavone	Rogna	Mosca
Cellina di Nardò	M	M	M			E	B	E
Cima di Mola	P	B	M			E	B	B
Coratina	T	E	E			E	M	M
Ogliarola barese	T	E	M			M	M	E
Ogliarola garganica	T	E	M			M	M	E
Ogliarola salentina	P	B	B			E	B	B

Legenda: E = Elevato/a; M = Medio/a; B = Basso/a; P = Precoce; T = Tardiva; A = Assurgente; Es = Espanso; P = Pendulo.

## Buone pratiche aziendali

Nell'ambito di queste linee guida, sono prese in esame solo le pratiche agricole direttamente correlate alla gestione degli oliveti secolari quali:

1. Potatura
2. Gestione del suolo e fertilizzazione
3. Irrigazione
4. Gestione delle avversità
  - a. Gestione delle infestanti
  - b. Controllo dei parassiti
5. Raccolta delle olive
6. Infittimenti, rimpiazzo delle fallanze
  - a. Scelta delle varietà
  - b. Scelta della forma di allevamento

Alcune pratiche, come ad esempio la scelta del luogo di impianto, non sono prese in considerazione; la ragione di ciò sta nel fatto che queste linee guida riguardano oliveti esistenti da lungo tempo e per i quali una gestione più attenta all'ambiente, può costituire un modo per includere queste aree agricole in un sistema di valorizzazione globale della realtà territoriale a cui appartengono, pur conservando un'attenzione specifica alla redditività della loro gestione e in definitiva alla sostenibilità dell'agroecosistema che essi contribuiscono a creare.

### Potatura

Negli oliveti secolari, le comuni pratiche di gestione prevedono le potature di produzione, la potatura ordinaria e quella straordinaria e talvolta, a seguito degli infittimenti e del rimpiazzo di alcune fallanze, anche la potatura di allevamento.

### *Potatura d'allevamento*

L'adozione di una forma d'allevamento si prefigge uno o più scopi:

- Equilibrare il rapporto fra apparato vegetativo e apparato riproduttivo. Un adeguato equilibrio, permette di ottimizzare la produzione in termini di qualità e quantità e nel contempo, fornire le risorse nutritive necessarie per rinnovare la vegetazione e la fruttificazione nell'anno successivo.
- Adattare la pianta alle condizioni d'illuminazione: in condizioni di illuminazione limitata, la forma d'allevamento, permette di ottimizzare l'utilizzazione della luce favorendone l'ingresso in ogni zona della chioma. Nei casi in cui l'illuminazione risulta eccessiva rispetto alle esigenze della specie, la forma d'allevamento ha lo scopo di prevenire danni ad esempio dovuti all'eccessivo irraggiamento solare al cambio o ai frutti.
- Offrire un'adeguata aereazione della chioma. Una chioma troppo fitta, crea condizioni di ristagno dell'aria con formazione di un gradiente di umidità che ostacola l'evapotraspirazione limitando l'intensità della fotosintesi. Inoltre un'insufficiente aereazione, favorisce gli attacchi da parte di alcune crittogame e di alcuni insetti. La forma d'allevamento crea le condizioni affinché ci sia un'adeguata ventilazione all'interno della chioma.
- Facilitare le operazioni colturali: la forma d'allevamento è studiata anche per agevolare l'esecuzione di alcune operazioni colturali, rimuovendo le cause che possono intralciarle.
- Ridurre i costi della manodopera: la forma di allevamento è studiata per agevolare le operazioni eseguite manualmente o con l'uso di particolari macchine, in particolare la potatura e la

raccolta, allo scopo di aumentare la produttività del lavoro.

La potatura di allevamento, si applica nei primi anni dall'impianto con lo scopo di conferire alla pianta la forma scelta ed ottenere il completamento di una robusta struttura scheletrica e l'inizio della fruttificazione nel più breve tempo possibile. Ciò, per tutte le forme considerate, si ottiene riducendo al minimo gli interventi cesori, mantenendo inizialmente più ramificazioni laterali di quelle che servono per creare la struttura delle piante, eliminando solo i rami eccessivamente vigorosi e/o mal posizionati (es. succhioni all'interno della chioma). Per poter meccanizzare la raccolta delle olive con vibrator da tronco, nel caso della forma a vaso che è quella più utilizzata, occorre allevare le piante in maniera da ottenere un fusto libero da vegetazione alto 1-1,2 m su cui si inseriscono 3-4 branche primarie inserite con un angolo di inserzione intorno a 35° rispetto alla verticale e sulle quali sono allevate quelle secondarie, tenute relativamente numerose, corte e senza bruschi cambi di direzione. Infine, si provvede all'eliminazione dei rami penduli che sono poco rispondenti alle vibrazioni; contemporaneamente, per non ridurre il volume fruttificante della chioma, bisogna consentire un maggior sviluppo in altezza degli alberi mentre se s'intende effettuare la raccolta manualmente o con attrezzature agevolatrici, occorrerà contenere l'altezza a m 4-5 e far sviluppare la chioma in maniera espansa. Questa operazione si ottiene inclinando maggiormente le branche principali rispetto alla verticale (fino a massimo 40°-45°), facendo allungare un po' di più le branche secondarie e favorendo la presenza di pendaglie.

### *Potatura di produzione*

La potatura di produzione si applica nella fase adulta delle piante, ha lo scopo di mantenere la forma data con la potatura di allevamento, di equilibrare l'attività vegetativa e quella riproduttiva, mantenere nel tempo la capacità produttiva raggiunta e di eliminare eventuali porzioni danneggiate della chioma. Aspetto fondamentale della potatura di produzione è quello di applicare la giusta intensità. Spesso, si attua una potatura eccessiva che determina una riduzione della capacità produttiva delle piante. Anche una potatura troppo leggera può risultare dannosa, perché può causare eccessivi ombreggiamenti nelle parti interne della chioma ed un forte consumo di acqua, creando condizioni favorevoli allo sviluppo di patogeni e fitofagi e alla possibile insorgenza di stress idrico. La potatura di produzione andrebbe eseguita tutti gli anni. Se ciò non fosse possibile, andrebbe fatta almeno ogni due anni (biennale) e nell'anno in cui non si esegue la potatura, sarebbe opportuno eliminare almeno i succhioni nelle parti interne della chioma (ciò può essere fatto anche in estate). Negli oliveti secolari, dove la potatura viene eseguita normalmente con turno poliennale (ogni 4-6 anni), è importante, al fine di mantenere un certo equilibrio vegeto-produttivo ed evitare eccessivi addensamenti di vegetazione, intervenire tutti gli anni almeno per eliminare i succhioni.

Questo tipo di tempistica degli interventi consente di adempiere a quanto stabilito dal decreto regionale di recepimento della condizionalità, emanato nel 2009, che stabilisce regole comuni per il pagamento dei contributi agli agricoltori come previsto dalla PAC e quindi l'obbligo di potare le piante d'olivo almeno una volta ogni 5 anni (vedi Allegato II del Decreto Regionale di recepimento della Condizionalità - Decreto Ministeriale di recepimento del regolamento del consiglio (EC) N 73/2009 del 19 Gennaio 2009 che stabilisce regole comuni per il pagamento dei contributi agli agricoltori secondo quanto stabilito dalla PAC).

Nell'oliveto con una gestione a basso impatto ambientale assume grande rilevanza evitare eccessivi addensamenti di vegetazione che, come visto, possono favorire l'attacco di patogeni (es. occhio di pavone) e fitofagi (es. cocciniglia, che determina anche l'attacco da parte della fumaggine), soprattutto in ambienti relativamente umidi. A riguardo occorre considerare che le differenti cultivar, possono avere diversa vigoria, densità di vegetazione e suscettibilità ai parassiti. Pertanto, è molto

importante scegliere la giusta intensità di potatura ed il turno in funzione dell'ambiente in cui si opera e delle caratteristiche della cultivar considerata, tenendo in forte conto degli effetti di questa pratica sulla sanità delle piante. Con la potatura si devono asportare le parti malate o attaccate da insetti al fine di ridurre le fonti di inoculo. Tuttavia, in piante che presentano un forte attacco di rogna, l'asportazione delle parti malate dovrà essere fatta gradualmente per evitare un'eccessiva riduzione della superficie fogliare e nel frattempo dovranno essere eseguiti trattamenti a base di rame per contenere l'infezione. In caso di piante malate di rogna o, peggio, di verticillosi, prima di passare a potare piante sane, occorre disinfettare gli attrezzi con soluzioni a base di rame.

### ***Epoca di potatura***

La potatura deve essere eseguita durante tutto il periodo di riposo vegetativo. Nelle zone dove c'è il rischio che si verifichino dei danni da freddo, andrebbe effettuata dopo il periodo di forti gelate (nel caso di gran parte della Puglia il mese migliore per eseguire la potatura è marzo), perché se fosse eseguita prima potrebbe rendere le piante più soggette ai danni da freddo. Anche il ritardo della potatura deve essere evitato, in quanto causa l'indebolimento delle piante, in quanto insieme al materiale di potatura si allontana anche parte delle sostanze di riserva che nel frattempo sono state mobilitate dai tessuti di riserva in direzione della chioma. Solo nel caso di alberi molto vigorosi, può essere consigliabile eseguire la potatura un po' più tardivamente (aprile), perché così facendo si determina una diminuzione dell'attività vegetativa a vantaggio di quella riproduttiva e si viene a favorire un maggior equilibrio tra le due attività.

### **Gestione del suolo e fertilizzazione**

Nell'ambito di una agricoltura a basso impatto ambientale, gli obiettivi della gestione della fertilità sono essenzialmente tre:

1. miglioramento della fertilità del terreno;
2. risparmio delle risorse non rinnovabili;
3. rinuncia all'impiego di prodotti che possono contaminare l'agroecosistema.

Dall'esigenza di raggiungere questi obiettivi derivano alcune buone norme fondamentali:

- evitare le perdite di elementi solubili;
- possibilmente utilizzare le leguminose come fonte di azoto;
- non impiegare prodotti ottenuti per sintesi chimica;
- salvaguardare l'attività degli organismi vegetali e animali che vivono nel terreno;
- lottare contro l'erosione.

### ***Fertilità***

In una olivicoltura a basso impatto ambientale, la fertilità e l'attività biologica dei suoli devono essere mantenute o incrementate attraverso la messa a punto di pratiche agricole sostenibili, combinando le diverse tecniche di copertura e protezione del suolo (inerbimento, sovescio, ecc.) attraverso l'impiego dei residui vegetali e derivanti dagli allevamenti animali, con l'obiettivo di ridurre al minimo l'impiego di mezzi provenienti dall'esterno dell'azienda. Tale modalità di gestione sostenibile della coltura, si può conseguire attraverso l'applicazione di diverse pratiche di seguito riportate:

- l'utilizzo di coperture vegetali, rappresentate dall'inerbimento permanente o temporaneo; in quest'ultimo caso notevole importanza è assunta dalla coltivazione di specie da sovescio, in particolare di leguminose, che sono in grado di fissare azoto e quindi determinano un aumento netto del contenuto di questo elemento nutritivo nel terreno;
- l'incorporazione nei suoli di materiale organico, possibilmente compostato, proveniente dalla

stessa azienda; da altre aziende che praticano metodi di coltivazione a basso impatto ambientale o da aziende che non applicano schemi produttivi intensivi/industriali, oppure acquistato sul mercato;

- l'uso di fertilizzanti esterni all'azienda sia organici sia minerali (di origine naturale) andrebbe ipotizzato solo se i sistemi sopra citati non si siano mostrati efficienti nel garantire un'appropriatezza nutrizione delle piante coltivate;

In base a tali presupposti, la gestione della fertilità dell'oliveto può prevedere le pratiche agricole di seguito riportate.

### *Inerbimento*

L'inerbimento consiste nella consociazione con l'olivo di specie erbacee appositamente seminate o, nella grandissima maggioranza dei casi, spontanee (inerbimento naturale). L'erosione idrica è un problema in molti dei nostri terreni. La maggior parte dei terreni in piano, va detto, non soffrono di questa situazione ma passando su terreni in pendio il pericolo cresce. In tutta l'Italia meridionale ed in particolare in Puglia la piovosità si concentra in periodi in cui il terreno può essere ancora nudo ed esiste anche una certa ricorrenza di piogge talora molto intense. L'erosione idrica, quindi, provoca danni innegabili, anche se difficilmente quantificabili. In alcuni casi può farsi sentire, seppur in tono minore o, perlomeno, con effetti meno puntuali e macroscopici anche l'erosione eolica. L'unica difesa in entrambi i casi, è mantenere una copertura vegetante del terreno o effettuare una coltura consociata erbacea invernale che, seminata in autunno e sovesciata o raccolta agli inizi di aprile, protegga il terreno. Con l'inerbimento le proprietà fisiche del terreno vengono migliorate dalla presenza di un fitto capillizio radicale che si distribuisce uniformemente e più o meno profondamente a seconda delle specie e inoltre la presenza di apparati radicali fittonanti favorisce l'infiltrazione profonda dell'acqua soprattutto nel caso di piogge intense. Tale tecnica presenta problemi in condizioni di limitata disponibilità idrica a causa della competizione per l'acqua tra olivi e cotico erboso. In queste situazioni (piovosità annua inferiore a 600 mm) la gestione del suolo mediante lavorazione diventa la tecnica da preferire perché permette di valorizzare al massimo l'acqua disponibile, aumentando la capacità idrica del suolo e quindi la possibilità di "immagazzinare" l'acqua piovana e diminuendo le perdite dovute all'evaporazione ed alle erbe infestanti. Purtroppo la gestione del suolo attraverso le lavorazioni, determina maggiori perdite di sostanza organica per mineralizzazione, fenomeni di erosione in terreni in pendenza ed una minore portanza del terreno, soprattutto subito dopo il verificarsi di piogge. Un compromesso fra le due tecniche può essere rappresentato dalle tecniche dell'inerbimento temporaneo e dell'inerbimento parziale. L'inerbimento temporaneo consiste nel tenere coperto il terreno con essenze erbacee, lasciando crescere le erbe spontanee o seminando un apposito erbaio (sovescio), nel periodo autunno-primaverile (quando si concentra la maggior piovosità e minore è la competizione per l'acqua) e lavorando il terreno nel periodo primaverile - estivo.

L'inerbimento parziale, consiste nell'effettuare l'inerbimento degli interfilari e la lavorazione lungo i filari oppure nell'effettuare l'inerbimento e la lavorazione a file alterne.

In Puglia la piovosità non è elevata, varia a seconda delle zone tra i 400 ed i 600 mm/anno. In tali condizioni, è consigliabile effettuare l'inerbimento in caso si possa ricorrere almeno all'irrigazione di soccorso. Se non c'è la possibilità di effettuare interventi irrigui almeno in caso di necessità, l'inerbimento temporaneo o l'inerbimento permanente (gestito con numerosi sfalci per ridurre al minimo la competizione per l'acqua) possono rappresentare la giusta soluzione per salvaguardare il contenuto di sostanza organica del suolo. Recenti indagini hanno evidenziato che con l'inerbimento si hanno consumi di acqua leggermente maggiori ma, grazie al progressivo miglioramento delle caratteristiche fisiche del terreno, si

ha anche la costituzione di una maggior riserva idrica a livello del suolo in primavera, cosa che consente un risparmio di acqua irrigua e una migliore gestione delle piante nel periodo più caldo. Questo indica che tale pratica, se ben gestita, può essere utilizzata anche quando le disponibilità idriche non sono abbondanti. Nei terreni che rimangono nudi dall'autunno alla primavera inoltrata, si verifica una notevole perdita per lisciviazione di elementi nutritivi e di azoto in particolare. Il risultato di ciò è doppiamente negativo perché si ha un impoverimento del terreno ed un inquinamento della falda freatica. Al contrario un terreno coperto agisce in due modi: da un lato ostacola il ruscellamento (scorrimento superficiale) dell'acqua, dall'altro incamera gli elementi nutritivi nei tessuti vegetali, bloccandoli momentaneamente sotto forma organica e rendendoli disponibili in seguito con la decomposizione dei tessuti vegetali.

Pertanto l'inerbimento presenta numerosi vantaggi:

- permette di mantenere o incrementare il livello di sostanza organica del terreno;
- favorisce la presenza di organismi utili che aiutano nel controllo di quelli dannosi;
- riduce l'erosione nei terreni in pendenza;
- diminuisce il compattamento del suolo causato dal passaggio dei mezzi meccanici;
- permette lo sviluppo anche negli strati superficiali di terreno dell'apparato radicale degli olivi;
- diminuisce la perdita di azoto per lisciviazione e, quindi, i rischi di inquinamento degli strati profondi del terreno e delle falde;
- determina una migliore disponibilità del fosforo e del potassio e degli altri elementi nutritivi lungo il profilo del terreno;
- se comprende leguminose, può fornire azoto immediatamente assimilabile;
- agevola l'esecuzione della raccolta (più facile spostamento dei teli e movimentazione delle macchine e riduzione dei rischi di infangatura delle olive) e della potatura.

#### *Gestione dell'inerbimento*

Nei primi 2-3 anni di inerimento può essere necessaria, nei terreni meno dotati di elementi nutritivi, una fertilizzazione supplementare per favorire l'insediamento del "prato". Successivamente, gli apporti derivanti dalla decomposizione del materiale sfalciato e delle radici morte, sono sufficienti alla nutrizione del prato e quindi non richiede apporti di fertilizzanti aggiuntivi rispetto a quelli necessari per gli olivi. Il cotico erboso va controllato effettuando da 2 a 4 sfalci per stagione vegetativa: il primo all'inizio della primavera e gli altri successivamente quando il cotico raggiunge circa 20 cm di altezza. Facendo crescere l'erba fino ad altezze maggiori, si aumenta la produzione di sostanza organica e contestualmente anche la competizione per l'acqua e viceversa. Pertanto, se le disponibilità idriche sono buone e si vuole incrementare la sostanza organica apportata con l'inerimento, si può ritardare l'esecuzione dello sfalcio, mentre in condizioni di disponibilità idriche non elevate, non si deve ritardare il primo sfalcio. Si può ridurre la competizione per l'acqua, operando secondo turni più brevi gli sfalci successivi, si consideri anche che, così facendo, nel periodo primaverile-estivo, grazie agli sfalci si crea uno strato pacciamante che permette di ridurre le perdite di acqua per evaporazione. Per non ridurre la capacità di ricaccio dell'erba, l'altezza del taglio da terra deve essere di 5-6 cm. Ogni 3-4 anni, nel periodo invernale, può essere opportuno fare una scarificazione del prato per arieggiare il terreno. Indicativamente, l'inerimento permanente può fornire 3-6 t/ha/anno di sostanza secca, pari a 0,6-1,8 t/ha/anno di humus.

#### *Sovescio (concimazione verde)*

Negli oliveti, per gestire la fertilità del terreno può essere utile prendere in considerazione la pratica del sovescio. Quando si prende in considerazione questa possibilità, per quanto riguarda la risorsa idrica, valgono le stesse limitazioni o norme orientative già riportate nel caso degli inerimenti. Il sovescio può essere totale o parziale. Per sovescio totale si intende l'interramento di una pianta erbacea

coltivata appositamente; per sovescio parziale si intende invece l'interramento di residui di piante coltivate per realizzare altri tipi di produzioni. Il sovescio è molto importante per apportare sostanza organica nelle situazioni in cui l'impiego di letame o compost risulta non praticabile (es. non reperibili in zona/alti costi di trasporto), in quanto consente apporti di sostanza organica secca fino a 4-6 t/ha, che corrispondono a 0,4-1,2 t/ha di humus. Negli ambienti meridionali ad estate lunga ed inverno mite, è possibile praticare il sovescio adottando numerose specie erbacee autunno-primaverili (leguminose, graminacee, crucifere, ecc.) seminate singolarmente o in miscuglio. Di seguito sono riportati i possibili obiettivi di una concimazione verde e la scelta delle specie.

<i>Obiettivo principale</i>	<i>Scelta della specie</i>
Fissazione di azoto	Leguminose
Organizzazione dell'azoto residuo nel terreno ( <i>catch crops</i> )	Crucifere, Graminacee
Sbriciolamento ed aerazione del terreno	Graminacee, favino
Rapida copertura del suolo	Colza, rafano, senape
Risparmio di acqua	Sovescio autunno-vernino
Lotta alle infestanti	Crucifere
Offerta di fiori per api in autunno-inverno	Trifogli, senape gialla, favino
Produzione aggiuntiva di foraggio	Miscugli graminacee-leguminose

In genere, nel caso del sovescio, il miscuglio di diverse specie per la costituzione di una copertura verde da interrare successivamente risulta migliore dell'uso di una singola specie grazie all'effetto complementare offerto dalle diverse piante. Combinando leguminose a radici fittonanti con graminacee a radici fascicolate si ottiene un miglioramento della fertilità sia in termini chimici che fisici (struttura/permeabilità/porosità). Una pratica ben radicata, soprattutto negli ambienti semi-aridi, quale quello pugliese, prevede la coltivazione di specie a ciclo autunno-primaverile da sovesciare in marzo o aprile. Le quantità medie di elementi nutritivi e di biomassa apportati con un sovescio sono funzione delle specie scelte e delle condizioni del terreno.

<b>Biomassa di alcune colture erbacee da sovescio</b>	
<b>Specie</b>	<b>Biomassa verde (q/ha)</b>
Favino	350-450
Lupino	300-350
Veccia	250-300
Trifoglio incarnato	150-250

Le specie con ciclo autunno-primaverile più utilizzate in Puglia sono rappresentate da graminacee e leguminose; molto comuni i miscugli di orzo e favino o di orzo e veccia. La coltivazione di sole leguminose è da preferire solo nel caso si voglia privilegiare l'apporto dell'azoto massimizzando quindi la fissazione di questo elemento attraverso la coltura da sovescio. Orientativamente, il sovescio con leguminose può rendere disponibili da 50 a 100 kg di azoto/ha, le quantità più alte si ottengono quando si usano soltanto leguminose; va considerato però che queste quantità possono variare moltissimo in funzione delle condizioni ambientali e dell'andamento stagionale. Per rendere disponibili in tempi brevi la gran parte degli elementi nutritivi contenuti nelle essenze erbacee, lo sfalcio deve essere eseguito al momento della spigatura nel caso delle graminacee e all'inizio della fioritura nel caso delle leguminose. Lo sfalcio delle essenze da sovescio può essere ritardato se, come visto in precedenza, si vuole massimizzare la produzione di humus stabile (effetto ammendante), che possa avere un effetto migliorativo sulla struttura del suolo (e sulla capacità idrica dei terreni), ma in questo caso l'effetto concimante, cioè l'apporto di elementi nutritivi, sarà leggermente ridotto.

#### *L'impiego di materiale organico di origine vegetale o animale*

Per conservare o migliorare la fertilità del terreno è di grande importanza l'apporto di sostanza organica. I materiali organici di origine vegetale o animale che possono essere utilizzati per la fertilizzazione, sono numerosi:

- letami di bovini, ovini, caprini, equini, ecc.;
- compost;
- pollina;
- sovescio;
- residui di potatura;
- residui dei processi di trasformazione delle olive, quali la sansa e le acque di vegetazione;
- residui della lavorazione delle ossa, della lana e dei peli;
- ritagli di cuoio.

I materiali organici elencati, sono caratterizzati da un graduale rilascio di elementi nutritivi, permettendo così di svolgere la loro azione, man mano che sono richiesti dalle piante.

I primi due materiali rientrano tra gli ammendanti organici di origine vegetale o animale, caratterizzati da una bassa concentrazione di sostanze nutritive e da un elevato contenuto di sostanza organica e di flora batterica. Gli ammendanti, al momento della somministrazione al terreno, devono essere maturi, cioè i processi fermentativi responsabili della loro formazione devono essere terminati da tempo e la componente organica residua deve avere caratteristiche di resistenza agli ulteriori attacchi microbici. Il compost può avere sia origine vegetale (Ammendante Compostato Verde ACV) che origine mista (Ammendante Compostato Misto ACM).

È importante che i materiali organici impiegati, siano facilmente reperibili in zona, soprattutto tenendo sempre presente il rapporto costi-benefici delle somministrazioni.

Nell'ottica di ridurre gli input esterni, è rilevante impiegare una tecnica di fertilizzazione che utilizzi al meglio i residui della filiera olivicola, come il materiale di potatura o la sansa vergine e le acque di vegetazione, che residuano dai processi di trasformazione.

Per l'uso delle sanse e dei reflui di frantoi oleari (acque di vegetazione), occorre rispettare la specifica normativa, che stabilisce i limiti di accettabilità e le modalità d'uso. A quest'ultimo riguardo, le dosi massime di sansa o acqua di vegetazione tal quali, che possono essere somministrate sono di 50 m<sup>3</sup>/ha/anno se tali materiali sono stati ottenuti con sistemi a pressione (discontinui) di estrazione dell'olio dalle olive e di 80 m<sup>3</sup>/ha/anno se sono state ottenute con sistemi continui di estrazione dell'olio dalle olive; tali quantitativi vanno comunque verificati alla luce delle normative vigenti in

materia nelle diverse regioni olivicole.

Le sanse e le acque di vegetazione, possono anche essere miscelate con altri materiali per ottenere un compost che, rispetto al materiale tal quale, ha un valore fertilizzante maggiore. A tale riguardo, potrebbe essere utile compostare la sansa e le acque di vegetazione con il materiale di potatura dell'olivo, con l'aggiunta di paglia, materiale sfalciato, letame e/o pollina, ecc., magari direttamente in campo per ridurre i costi del successivo trasporto.

Per avere indicazioni di massima sull'ammontare di elementi nutritivi derivanti dalla somministrazione di ammendanti, si può considerare che, in generale, il letame e gli altri ammendanti che possono essere apportati, in caso di distribuzione annuale, rendono disponibile ogni anno circa il 60-70% degli elementi nutritivi che contengono.

La convenienza nell'acquisto di compost extra-aziendale è funzione del prezzo, che a sua volta dipende dal tipo di formulazione e/o di confezionamento del prodotto. A titolo di esempio, alcune ditte vendono il compost in polvere o pellettato ed in sacchi di varia grandezza o sfuso, con notevoli differenze sul prezzo di vendita: quello in polvere e/o sfuso può avere un prezzo di vendita molto più basso di quello pellettato e/o in sacchi. Ciò deve essere tenuto presente al momento della scelta dei fertilizzanti, unitamente al fatto che i diversi tipi di formulazione e di confezionamento, possono richiedere per il trasporto e la distribuzione, attrezzature differenti.

La somministrazione di letame o di altri materiali organici compostati o no (ad es. le sanse) andrebbe eseguita in autunno/inverno dopo la raccolta. Se il terreno è gestito mediante lavorazioni e si esegue un intervento in autunno, la distribuzione andrebbe fatta prima di tale intervento. Quando si effettua il sovescio, la somministrazione di eventuali fertilizzanti organici e dei concimi fosfo-potassici può essere fatta alla semina del sovescio (eseguita dopo le prime piogge autunnali) oppure, in alternativa se ben compostata, all'interramento della biomassa dopo lo sfalcio.

### *Criteria per determinare i fabbisogni nutritivi dell'olivo*

Una nutrizione equilibrata, contribuisce in maniera importante a realizzare un buon rapporto fra l'attività vegetativa e quella riproduttiva delle piante. L'olivo assorbe dal terreno tutti gli elementi nutritivi necessari al suo sviluppo. La fertilizzazione ha come scopo principale, quello di migliorare o conservare la fertilità del terreno, prevedendo la somministrazione anche di eventuali nutrienti carenti e utilizzando prodotti a basso impatto ambientale (es. quelli consentiti in agricoltura biologica). Per determinare gli elementi nutritivi che devono essere apportati all'oliveto, occorre conoscere il livello di fertilità del terreno, lo stato nutrizionale delle piante ed i fattori che influiscono sulle esigenze nutritive delle stesse (es. età delle piante, potenzialità produttiva degli alberi, stato sanitario, applicazione o meno dell'irrigazione, ecc.). Strumenti utili per la determinazione delle quantità di elementi nutritivi da apportare all'oliveto sono rappresentati dall'analisi del terreno, dalla diagnostica fogliare, dal calcolo delle asportazioni e dall'osservazione visiva delle piante.

Per una corretta fertilizzazione è anche importante conoscere come varia durante la stagione vegetativa l'assorbimento dei vari elementi nutritivi. Indicativamente, per i principali nutrienti, si ha che:

- l'azoto è assorbito durante tutta la stagione vegetativa, con un'intensità maggiore nel periodo che va dalla piena fioritura all'indurimento del nocciolo;
- il fosforo è assorbito soprattutto nella prima parte della stagione vegetativa (il fabbisogno di questo elemento nutritivo è in generale modesto);
- il potassio, pur essendo assorbito sin dall'inizio della ripresa vegetativa, è utilizzato in quantità elevata nelle fasi di accrescimento e di inoliazione delle drupe.

Nel determinare i fabbisogni nutritivi, si deve tener conto anche dello stato degli olivi: se deboli o

deperiti devono essere apportate dosi relativamente elevate per rinvigorirli.

Per l'esecuzione della fertilizzazione è sconsigliabile ricorrere alle così dette ricette di fertilizzazione formulate in base alle condizioni medie di clima, di terreno e di coltura. Più razionalmente, il tecnico o l'agricoltore deve stabilire caso per caso le dosi di fertilizzanti da impiegare considerando le quantità di elementi nutritivi presenti nel suolo (mediante analisi del terreno), lo stato nutrizionale delle piante (mediante osservazione visiva e/o diagnostica fogliare) e il livello produttivo che può essere raggiunto in funzione delle condizioni ambientali e colturali dell'oliveto.

I valori ottenuti dai risultati dell'analisi del terreno, devono essere confrontati con quelli di riferimento per individuare eventuali deficit di elementi nutritivi. Per valutare lo stato nutritivo delle piante, si può ricorrere alla tecnica della diagnostica fogliare che mette a confronto il contenuto in elementi nutritivi delle foglie dell'oliveto considerato, con il contenuto in elementi nutritivi di oliveti presi a riferimento e che presentano un stato vegeto-produttivo ottimale. Gli oliveti di riferimento, dovrebbero essere siti in zone limitrofe e avere caratteristiche strutturali simili (cultivar, forma di allevamento, ecc.) a quello oggetto di analisi; purtroppo, questi dati spesso non sono disponibili, poiché, anche a causa dei costi relativamente elevati, spesso la diagnostica fogliare non è utilizzata come pratica corrente ma solo in casi particolari al fine di evidenziare eventuali carenze, eccessi o squilibri nutritivi. Il momento di riferimento migliore per l'esecuzione del campionamento è rappresentato dal periodo di riposo invernale - dicembre-gennaio.

Un altro approccio per determinare i fabbisogni nutritivi dell'oliveto è quello di calcolare le quantità di nutrienti asportate in maniera permanente dal terreno e non successivamente reintegrate.

Le asportazioni di elementi nutritivi da considerare per il cosiddetto "calcolo delle asportazioni", sono le seguenti:

- elementi nutritivi asportati dalle parti che vengono portate via dall'oliveto:
- frutti, rami e foglie se quest'ultimi dopo la potatura, sono portati fuori dall'oliveto;
- elementi nutritivi che servono a sostenere l'accrescimento delle parti "permanenti" delle piante:
- grosse radici, tronco, branche;
- perdite per dilavamento;
- immobilizzazioni nel terreno.

<b>Calcolo delle quantità di elementi nutritivi asportate (calcolati su 100 piante di medie dimensioni)</b>			
<b>Parti dell'albero che vengono eliminate: frutti, legno e foglie</b>	<b>Perdita di sostanza secca (kg/albero)</b>	<b>Elementi nutritivi contenuti nella sostanza secca (%)</b>	<b>Elementi nutritivi asportati dal terreno da 100 piante di olivo (kg)</b>
Produzione media annua: kg 15 di olive/albero	8,25	Calcio 0,86 Anidride fosforica 1,10 Potassio 2,02 Azoto 1,18	Calcio 7,07 Anidride fosforica 9,09 Potassio 16,67 Azoto 9,74
Materiale di potatura: kg 20 di legno/albero	11,06	Calcio 1,44 Anidride fosforica 0,41 Potassio 1,94 Azoto 1,01	Calcio 16,69 Anidride fosforica 4,70 Potassio 22,45 Azoto 11,69
Materiale di potatura: kg 5 di foglie/albero	2,60	Calcio 2,54 Anidride fosforica 0,43 Potassio 2,73 Azoto 1,84	Calcio 6,60 Anidride fosforica 1,13 Potassio 7,09 Azoto 4,79
Parti dell'albero che non vengono eliminate: radici, tronco e branche (la quantità è assimilabile a quella asportata da 15 kg di legno)	8,07	Calcio 1,44 Anidride fosforica 0,41 Potassio 1,94 Azoto 1,01	Calcio 12,52 Anidride fosforica 3,52 Potassio 16,83 Azoto 8,77
Asportazioni/fabbisogni totali			Calcio 41,80, Anidride fosforica 18,10, Potassio 61,60, Azoto 34,20

Sulla base delle asportazioni determinate nella tabella, in un oliveto con piante disposte a m 6 x 6 (278 piante/ha), il fabbisogno degli elementi nutritivi più importanti può essere stimato pari a circa 50 kg/ha di fosforo, 170 kg/ha di potassio e 95 kg/ha di azoto. Tali quantità fanno riferimento ad un oliveto che produce circa 41 q/ha di olive e, quindi, in oliveti con potenzialità produttive maggiori dovranno essere opportunamente aumentate. Nel caso degli oliveti secolari bisogna considerare ovviamente il numero di piante ettaro, probabilmente più basso e la dimensione delle piante, che può essere ingente.

### **Fertilizzazione ausiliaria**

L'uso di fertilizzanti ausiliari esterni all'azienda, sia organici sia minerali, dovrebbe essere limitato ai soli casi in cui l'utilizzo di coperture vegetali e l'impiego di materiali organici di origine vegetale o animale non sia sufficiente a garantire un'appropriata nutrizione alle piante.

I fertilizzanti azotati consigliati, sono quelli derivanti da epitelio animale, da farina di sangue, da pellami, pelli, crini e lana, da cornunghia torrefatta, da letame essiccato, da pannelli di ricino, ecc.. In generale, tali concimi, essendo organici, cedono l'azoto più gradualmente rispetto a quelli minerali normalmente utilizzati nell'agricoltura convenzionale. Tuttavia ci sono differenze, anche marcate, tra i differenti concimi per quel che riguarda la velocità di cessione degli elementi nutritivi: per

esempio quelli derivanti da farine di sangue cedono l'azoto molto più rapidamente di quelli ottenuti da cornunghia. Tali differenze devono essere tenute presenti nella scelta del periodo di somministrazione. Pertanto i fertilizzanti derivanti da farine di sangue vanno somministrati poco prima della ripresa vegetativa delle piante; quelli ottenuti da cornunghia invece andrebbero somministrati con largo anticipo rispetto alla ripresa vegetativa. Alcuni fertilizzanti sono molto costosi (es. quelli a base di farina di sangue) e questo dovrà essere tenuto presente al momento della scelta.

Per quanto riguarda il potassio sono anche disponibili dei fertilizzanti organici, tra cui le borlande, che hanno un effetto piuttosto rapido. Quando sia necessario apportare fosforo (cosa poco frequente in Puglia), se si usano i concimi minerali indicati per la fertilizzazione di fondo, occorre tenere conto nella scelta della reazione del terreno, i terreni con pH basico tendono a immobilizzare il fosforo rendendolo comunque non disponibile.

In commercio sono disponibili numerosi fertilizzanti organici contenenti tutti i principali elementi nutritivi ed il loro contenuto percentuale (titolo) è riportato in etichetta.

Per l'olivo, in genere sono maggiori i fabbisogni di azoto e potassio rispetto a quelli di fosforo, è quindi opportuno somministrare fertilizzanti che abbiano titolo relativamente alto per l'azoto ed il potassio e basso per il fosforo. Questo può essere ottenuto anche somministrando fertilizzanti diversi che siano complementari, per esempio uno che contiene più azoto ed uno che contiene più potassio. La pollina è un fertilizzante da somministrarsi da solo o utile ad integrare gli apporti di letame o compost.

#### *Concimazione fogliare e fertirrigazione con fertilizzanti ausiliari*

La concimazione fogliare e la fertirrigazione, non possono considerarsi delle pratiche di concimazione ordinarie ma potrebbero essere prese in considerazione per superare eventuali crisi nutritive temporanee, ad esempio di azoto soprattutto nel periodo fioritura-allegagione, che possono verificarsi quando si ha la temporanea immobilizzazione dell'azoto da parte dei microrganismi che stanno decomponendo sostanza organica con alto rapporto C/N o nei primi anni di inerbimento) o carenze di microelementi, utilizzando fertilizzanti che possono essere solubilizzati. Queste evenienze però sono poco frequenti nel caso di olivi secolari.

#### *Dove distribuire i fertilizzanti*

Quando la proiezione delle chiome degli alberi sul terreno interessa più del 50% della superficie, la fertilizzazione va eseguita su tutta la superficie dell'oliveto. In caso contrario è meglio effettuarla distribuendo i fertilizzanti soprattutto in corrispondenza del bordo della proiezione della chioma sul terreno, dove sono in genere localizzate le radici della pianta più giovani e più efficienti nell'assorbire i nutrienti dal terreno.

#### *Strategie di fertilizzazione*

In oliveti privi di inerbimento, con produzioni di 30-40 q/ha, la fertilizzazione può essere effettuata interrando i residui di potatura trinciati ed apportando annualmente 20-30 t/ha di letame o di compost con composizione equivalente. Per oliveti con produzioni superiori, occorre aumentare l'apporto di letame/compost e/o somministrare anche concimi ausiliari. Un'altra possibilità consiste nell'alternare l'apporto di letame/compost e l'esecuzione del sovescio (di graminacee e leguminose o di sole leguminose), integrando tali fertilizzazioni, se necessario, con la somministrazione di concimi ausiliari.

In oliveti inerbiti, l'esigenza di effettuare la fertilizzazione con letame o compost è meno importante che in quelli lavorati e quindi, se tali fertilizzanti non sono disponibili, non si hanno particolari difficoltà a soddisfare le esigenze nutritive delle piante somministrando dei concimi ausiliari.

Nel caso di terreno gestito mediante inerbimento o sovescio, è consigliabile tritare i residui di potatura. La trinciatura dei residui di potatura viene eseguita al momento del sovescio o dello sfalcio del prato. Tale abbinamento, soprattutto con il sovescio, risulta utile al fine di sopperire alla temporanea possibile sottrazione di azoto, da parte dei microrganismi demolitori dei materiali legnosi (materiale di potatura). Sarebbe opportuno effettuare apposite concimazioni che apportino azoto prontamente disponibile (20-30 kg/ha di azoto), somministrando letame o compost. Tale apporto per massimizzare l'effetto, sarebbe opportuno interrarlo, pratica che se eseguita parzialmente, potrebbe coincidere con la rottura del prato fatta per "arieggiare il terreno". eseguita ogni 2 anni a filari alterni, raddoppiando le dosi annuali. Se non è necessario effettuare la rottura del prato, e/o se il terreno è a forte rischio di erosione, il letame/compost può essere lasciato in superficie.

In tutti i casi, se il letame o i compost disponibili non sono sufficienti a soddisfare i fabbisogni nutritivi degli alberi si, può alternare la somministrazione di tali fertilizzanti a quella di concimi ausiliari.

Per quanto riguarda gli oliveti rinfittiti, la fertilizzazione nel caso di olivi giovani, deve soprattutto assicurare l'apporto di azoto da localizzare in vicinanza delle giovani piante. Indicativamente, I fabbisogni sono dell'ordine di 50, 80, 120 e 160 g di azoto per pianta, rispettivamente il 1°, 2°, 3° e 4° anno dopo l'impianto.

#### *Verifica dell'efficacia degli schemi di fertilizzazione applicati*

L'efficacia delle quantità e delle tipologie di fertilizzanti, scelte sulla base delle condizioni ambientali e colturali (es. gestione del suolo, potenzialità produttiva delle piante, ecc.) dell'oliveto, deve essere valutata sulla base delle risposte in termini vegetativi e produttivi delle piante e se necessario, devono essere effettuati degli aggiustamenti progressivi.

I quantitativi e le tipologie dei fertilizzanti apportati, si possono considerare ottimali quando consentono il raggiungimento della produzione ritenuta idonea in quell'ambiente ed in quelle condizioni colturali, permettendo allo stesso tempo, un adeguato rinnovo vegetativo con germogli di 20-50 cm di lunghezza e senza l'emissione di un eccessivo numero di succhioni, che rappresenta la base della produzione dell'anno successivo. Se le piante danno una bassa produzione e presentano un limitato accrescimento vegetativo, la quantità di fertilizzanti da somministrare deve essere aumentata. Viceversa, se le piante presentano un forte rigoglio vegetativo con l'emissione di numerosi succhioni, la quantità di fertilizzanti dovrebbe essere ridotta. Osservando le risposte delle piante, per successive approssimazioni, si giunge a individuare lo schema di fertilizzazione ottimale nelle condizioni in cui si opera. Questi aggiustamenti devono essere fatti anche tendendo in considerazione le altre pratiche che influenzano le risposte vegeto-produttive delle piante (in particolare, potatura e irrigazione). Come già detto, utili indicazioni, sulla giustezza delle scelte fatte possono essere tratte anche dalle analisi del terreno, che andrebbero fatte almeno ogni 5 anni.

#### *Gestione delle lavorazioni*

Per una gestione dell'oliveto che prenda in considerazione la necessità di preservare e migliorare le risorse naturali e ambientali, tenendo anche conto della necessità di contenere i costi di gestione, bisognerebbe prestare attenzione alla modalità di attuazione ed al numero delle lavorazioni. Tali pratiche, talvolta possono risultare anche dannose per la struttura del suolo e per la biodiversità in genere, oltre a costituire un onere dal punto di vista finanziario.

La scelta di ricorrere alle lavorazioni per la gestione del suolo, può rendersi necessaria nel caso di piovosità estremamente ridotta e nella impossibilità di ricorrere ad apporti idrici, anche se di soccorso.

In tal caso, la prima lavorazione dell'anno, potrebbe risultare necessaria dopo la raccolta, quando

può essere opportuno eseguire una lavorazione a 10-15 cm per interrare i fertilizzanti organici e minerali poco mobili e favorire la penetrazione delle acque meteoriche.

In primavera-estate, si possono eseguire altre 2-4 lavorazioni a 5-10 cm di profondità per il controllo delle piante spontanee e la riduzione dell'evaporazione.

Si ribadisce che, per limitare gli inconvenienti delle lavorazioni, si può sostituire la lavorazione autunnale con uno sfalcio delle piante spontanee, in modo da avere il terreno inerbito nel periodo autunnale - primaverile; ciò, oltre a facilitare l'accesso delle macchine nei campi, è particolarmente utile in terreni in pendenza al fine di ridurre l'erosione.

### *Irrigazione*

La notevole resistenza alla siccità dovuta a diverse forme di adattamenti anatomici e fisiologici che consente all'olivo di affrontare meglio della gran parte delle specie arboree da frutto, questa avversità. Il fabbisogno idrico dell'olivo è stato calcolato intorno a 600 mm annui (ETc = 600 mm). In caso di piovosità che si aggirano sui 600 mm annui, condizioni che si registrano in gran parte delle aree del Mediterraneo in cui vegeta l'olivo, l'irrigazione, pur non necessaria, può certamente contribuire a migliorare l'attività vegeto-produttiva. Ciò permette di superare eventuali periodi critici per il verificarsi di alte temperature e siccità in corrispondenza di alcune fasi fenologiche, quando le piante sono più sensibili alle condizioni di stress. In ambienti con piovosità inferiore a quella sopra indicata, l'applicazione dell'irrigazione comporta un rilevante miglioramento dell'attività vegetativa e delle rese. L'olivo comunque, riesce a sopravvivere e a fornire produzioni, anche in condizioni di piovosità molto bassa (< 300 mm) e le piante secolari, risultano ben adattate agli ambienti in cui vivono. In tempi passati, l'irrigazione veniva utilizzata solo in caso di effettiva necessità. Queste piante, normalmente di dimensioni ragguardevoli, sono dotate di apparati radicali molto ben sviluppati che conferiscono loro la capacità di resistere anche a situazioni difficili, condizioni che derivano da carenza idrica o da improvvisi allagamenti, dovuti a precipitazioni erratiche intense.

I momenti in cui l'olivo risulta maggiormente sensibile agli stress idrici sono:

- prefioritura, fioritura e allegagione;
- accrescimento dei frutti per moltiplicazione cellulare (dall'allegagione all'inizio dell'indurimento del nocciolo);
- accrescimento dei frutti per distensione cellulare (dalla fine dell'indurimento del nocciolo in poi).

I volumi irrigui stagionali nel caso degli oliveti, in dipendenza delle condizioni ambientali e colturali, possono anche arrivare a 2.000 m<sup>3</sup>/ha nel caso di oliveti intensivi ma nel caso di piante secolari, anche se irrigate, tali volumi possono considerarsi casi limite per i motivi già riportati. Le quantità di acqua devono essere definite attentamente, in maniera da somministrare quanto è strettamente necessario per assicurare una buona produzione ed un buon ricambio vegetativo, senza giungere a situazioni di eccesso che determinerebbero anche condizioni favorevoli all'attacco da parte di parassiti.

Per quanto riguarda i sistemi di irrigazione, quelli a microspruzzo e a goccia risultano essere i più idonei perché hanno un'elevata efficienza e il 90-95% dell'acqua distribuita, risulta utilizzata dalle piante. I sistemi a goccia, a causa dei bassi volumi di adacquamento, evitano il dilavamento degli elementi nutritivi, non bagnano la vegetazione e quindi non favoriscono attacchi parassitari indesiderati. Questi sistemi di irrigazione inoltre riducono lo sviluppo delle infestanti in quanto bagnano solo piccole porzioni di terreno. Per gli stessi motivi è da evitare l'irrigazione per aspersione sovrachioma.

Altrettanto importante è da evitare il ristagno idrico, di cui l'olivo è particolarmente sensibile;

ad un efficace sistema d'irrigazione in alcuni casi, va quindi associato un sistema di collettamento e smaltimento delle acque in eccesso in grado di facilitare il deflusso delle acque meteoriche, in occasione di piogge particolarmente intense.

### ***Controllo dei parassiti***

La difesa in oliveti a basso impatto è un sistema di controllo degli organismi dannosi, che utilizza tutti i fattori e le tecniche disponibili, nel rispetto dei principi ecologici, tossicologici ed economici, consentendo di mantenere le popolazioni al di sotto delle soglie d'intervento, che comportano danni economici. Si tratta dunque, di un sistema di controllo che prevede prima interventi di tipo agronomico, fisico, meccanico e/o biologico e solo se questi non risultano in grado di garantire un accettabile contenimento dei parassiti, si fa ricorso ai mezzi tecnici.

Pertanto, in un'olivicoltura a basso impatto, risulta essenziale creare le condizioni per limitare al massimo la presenza di organismi dannosi. Quest'ultimi, sono presenti in gran numero nell'oliveto ma in realtà solo alcuni possono mettere in pericolo la redditività della coltura. L'olivicoltore, deve conoscere il potenziale di dannosità nell'areale in cui insiste la sua azienda; solo con tale conoscenza di base può intraprendere al meglio le scelte colturali, finalizzandole anche alla riduzione della dannosità dei principali organismi nocivi.

Di seguito sono fornite indicazioni utili per il controllo dei principali fitofagi e patogeni che attaccano l'olivo.

**Mosca delle olive (*Bactrocera oleae* Gmelin)**

**Monitoraggio**

Viene effettuato installando trappole cromotropiche (gialle) e/o a feromoni, in numero di 2-3/ha, a metà chioma e controllando le stesse settimanalmente, in maniera da tenere sotto controllo l'evoluzione della popolazione degli adulti.

**Campionamento**

A partire dall'inizio dell'indurimento del nocciolo, si prelevano 100 drupe settimanalmente per determinare l'infestazione attiva.

**Fattori di limitazione**

Naturali	Agronomici	Artificiali
<p><b>Condizioni climatiche</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Con temperature estive superiori a 36 °C si ha una mortalità di uova e larve di I età anche del 90%..</li> <li>• Bassi valori di umidità relativa (&lt; 50%) sfavoriscono lo sviluppo dell'insetto.</li> </ul> <p><b>Presenza di nemici naturali</b></p> <p>Insetti</p> <p><i>Psytalia concolor</i>, <i>Eupelmus urozonus</i>, <i>Pnigalio mediterraneus</i>, <i>Eurytoma martellii</i>, <i>Cyrtoptyx latipes</i>, <i>Lasioptera berlisiana</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preferire varietà a drupa piccola e a maturazione precoce.</li> <li>• Per la gestione del suolo, se possibile, utilizzare l'inerbimento per favorire la bio-cenosi degli insetti utili.</li> <li>• Gestire attentamente l'irrigazione al fine di rendere meno recettive le olive, nel momento di maggiore rischio d'infestazione.</li> <li>• Evitare l'applicazione di una potatura molto intensa perché, oltre a causare una riduzione della produzione, determina una concentrazione dell'attacco sulle poche olive prodotte, che essendo di pezzatura maggiore, risultano più suscettibili.</li> <li>• Evitare, per quanto possibile, di lasciare sulle piante, frutti non raccolti, perché favoriscono la continuità delle generazioni del fitofago.</li> <li>• Creazione/mantenimento di infrastrutture ecologiche (es. siepi, alberature, ecc.) con piante utili, quali <i>Acacia spinosa</i>, <i>Enula ceppitoni</i>, <i>Giuggiolo</i> comune.</li> </ul>	<p><b>Biocidi</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Piretro (adulticida)</li> <li>- Azadiractina (larvicida-adulticida)</li> </ul> <p>Devono essere applicati su tutta la chioma. La loro limitata efficacia e gli alti costi ne limitano l'uso.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Spinosad</li> </ul> <p>Si utilizza con bassissimi dosaggi e viene riportato come un prodotto che presenta un'ottima selettività sulla coltura e sugli insetti utili, permettendo di ridurre i tempi di applicazione e i costi di distribuzione oltre i consumi d'acqua. La sua azione è adulticida.</p> <p>Si può applicare in due modi diversi:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) utilizzando pompe a spalla con getto unico e ugello singolo formando chiazze di 30-40 cm (5 litri di soluzione per ettaro);</li> <li>2) mediante pompe portate da una trattore applicando il prodotto in banda di circa 15-20 cm di larghezza, con getto unico e ugello singolo (max. 15 litri di soluzione x Ha).</li> </ol> <p>E' sufficiente trattare il 50% delle piante (a fila e a piante alterne). Si può iniziare il trattamento alle prime catture degli adulti o al superamento della soglia di intervento.</p> <p><b>Esche proteiche</b></p> <p>Si tratta di una miscela formata da esche proteiche attivate con piretrine naturali e viene irrorata su una parte della chioma in tutte le piante o sul 50% delle stesse (trattando una parte di chioma di una pianta sì ed una no o di piante di un filare sì ed uno no), in funzione del grado di infestazione. Le esche attirano gli adulti che nutrendosi, rimangono uccise dall'insetticida.</p>

Fattori di limitazione		
Naturali	Agronomici	Artificiali
		<p>Questa tecnica presenta problemi in caso di infestazioni elevate. Inoltre, se si verificano piogge consistenti, si ha il dilavamento delle esche che dovrebbero, pertanto, essere nuovamente distribuite.</p> <p><b>Repellenti-Antideponenti</b>  -Zolfo  -Silicato di sodio  -Argille (Caolino)  -Prodotti a base di rame (in tutte le sue forme)  Devono essere applicati alle prime catture degli adulti. Sono soggetti a dilavamento da parte delle piogge; pertanto se dilavati, bisogna ripetere il trattamento. Il caolino e soprattutto, il rame, hanno mostrato una buona efficacia. Il caolino presenta un costo relativamente elevato.</p> <p><b>Mezzi biotecnici</b>  -Cattura massale  Viene effettuata con trappole posizionate una per pianta o una ogni due piante, nel lato sud delle chiome, a circa 2 m di altezza, alle prime catture degli adulti. È sempre opportuno posizionare una trappola su tutte le piante, lungo il perimetro dell'apezzamento.  La cattura massale deve essere adottata su ampie superfici (minimo 5 ha), dove dà buoni risultati nelle prime fasi di infestazione della mosca e successivamente, solo se la pressione dell'insetto non diventa elevata. Dato l'alto numero di trappole da utilizzare, il costo di questo sistema di controllo risulta elevato.</p> <p><b>Tipologie di trappole utilizzabili</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Trappole cromotropiche di colore giallo spalmate di colla, che attraggono la mosca, oltre che con il colore, grazie al bicarbonato di ammonio e/o al feromone con cui sono attivate.</li> <li>• Trappole alimentari "Mac-Phail", che catturano le mosche attratte dall'ammoniaca prodotta dal fosfato biammonico con cui sono attivate;</li> <li>• Trappole "Attract &amp; kill", di recente introduzione, richiamano le mosche grazie all'azione di un attrattivo alimentare e di uno</li> </ul>

Fattori di limitazione		
Naturali	Agronomici	Artificiali
		<p>feromonico uccidendole per opera degli insetticidi di sintesi (deltametrina o lambda-cialotrina) di cui sono impregnate. L'uso di questi insetticidi di sintesi è ammesso solo per le trappole utilizzate nella cattura massale.</p> <p><b>Controllo biologico</b>                      Può essere fatto utilizzando il braconide <i>Psytalia concolor</i> (Sz.), lanciando in campo grandi quantità di insetti utili allevati (metodo inondativo). Per stabilire il momento dei lanci è necessario avvalersi di campionamenti settimanali in campo delle drupe al fine di individuare la presenza di larve di mosca suscettibili (2<sup>e</sup> e 3<sup>e</sup> età larvale) alla parassitizzazione da parte della <i>P. concolor</i>. I risultati non sempre incoraggianti ottenuti e gli elevati costi per la produzione del parassitoide rappresentano dei forti limiti all'applicazione di questa tecnica.</p> <p><b>Controllo chimico</b>                      I trattamenti a tutta chioma sono autorizzati al max 2 interventi per la difesa curativa (controllo delle larve) con Dimetoato, Fosmet e Imidacloprid. Per il primo e il secondo principio attivo, al max due interventi l'anno indipendentemente dall'avversità; per il terzo un solo intervento l'anno, solo con formulazione in dispersione oleosa e limitatamente su olive da olio.</p>

<b>Tignola delle olive (<i>Prays oleae</i> Bern)</b>		
<b>Monitoraggio</b>		
Viene effettuato installando trappole a feromoni per la cattura degli adulti, in numero di 2-3/ha, a metà chioma e controllando le stesse settimanalmente, in maniera da tenere sotto controllo l'evoluzione della popolazione degli adulti.		
<b>Fattori di limitazione</b>		
<b>Naturali</b>	<b>Agronomici</b>	<b>Artificiali</b>
<p><b>Condizioni climatiche</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperature superiori a 27-28 °C causano un'elevata mortalità delle uova della generazione carpofaga.</li> <li>• Bassi valori di umidità relativa dell'aria (&lt; 60%) determinano una riduzione della percentuale di schiusura delle uova.</li> <li>• Il verificarsi di numerosi giorni con temperature minime uguali o inferiori a 0 °C determina un'elevata mortalità delle larve fillofaghe svernanti.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preferire varietà a drupa piccola.</li> <li>• Per la gestione del suolo, se possibile, preferire l'inerbimento per favorire la biocenosi degli insetti utili.</li> <li>• Evitare l'applicazione di una potatura molto intensa perché, oltre a causare una riduzione della produzione, determina una concentrazione dell'attacco della tignola sulle poche olive prodotte, che sono anche più suscettibili perché, essendo poche, sono più grandi.</li> </ul>	<p><b>Controllo biologico</b></p> <p>- <i>Bacillus thuringiensis</i></p> <p>L'unica generazione potenzialmente dannosa è quella carpofaga. L'efficacia di trattamenti con <i>B. thuringiensis</i> su questa generazione è molto limitata, perché le larve nate dalle uova deposte sulle olive penetrano velocemente all'interno del frutto.</p> <p>Trattamenti eseguiti con <i>B. thuringiensis</i> sulla generazione antofaga con l'obiettivo di ridurre il numero di adulti che possono ovideporre sulle olive. Nella maggior parte dei casi, non hanno dato buoni risultati.</p> <p><b>Controllo chimico</b></p> <p>Gli interventi chimici con Dimetoato sono giustificati solo per le varietà a drupa grossa e per la sola generazione carpofaga, per un max di un trattamento.</p>

**Cocciniglia mezzo grano di pepe (*Saissetia oleae* Olivier)**

**Monitoraggio**

Viene effettuato visivamente per stabilire la presenza dell'insetto nelle chiome. Se la cocciniglia risulta presente, si segue l'evoluzione dell'infestazione su campioni di 100 foglie prelevati ad intervalli che, nel periodo in cui potrebbe essere utile effettuare dei trattamenti per il controllo dell'insetto, possono diventare anche molto brevi (una settimana o meno).

**Fattori di limitazione**

Naturali	Agronomici	Artificiali
<p><b>Condizioni climatiche</b></p> <p>Inverni freddi causando la morte di numerose uova e neanidi di prima, seconda o terza età svernanti, determinano forti riduzioni della presenza dell'insetto.</p> <p>Le alte temperature estive determinano un'elevata mortalità delle neanidi di prima età.</p> <p><b>Presenza di nemici naturali</b></p> <p>Insetti:</p> <p><i>Chilocorus bipustulatus</i>, <i>Exochomus quadripustulatu</i>, <i>Scutellista cyanea</i>, <i>Moranila californica</i>, <i>Eublemma scitula</i>, <i>Coccophagus</i> spp., <i>Diversinervus</i> spp., <i>Metaphycus</i> spp., in particolare <i>M. swirskii</i>, <i>M. bartletti</i>, <i>M. helvolus</i> e <i>M. lounburyi</i>.</p> <p>Funghi:</p> <p><i>Cephalosporium lecanii</i> e specie del genere <i>Isaria</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quando si realizzano nuovi impianti è importante applicare distanze di piantagione relativamente "ampie" che, favorendo l'illuminazione e l'aerazione delle chiome, determinano condizioni non favorevoli alla cocciniglia.</li> <li>• La potatura annuale, applicata con giusta intensità, determinando buone illuminazione ed aerazione della chioma, sfavorisce lo sviluppo della cocciniglia, mentre quella biennale o poliennale, facilitando la formazione di addensamenti di vegetazione, lo favorisce.</li> <li>• Asportare con la potatura e distruggere le parti più attaccate.</li> <li>• Gestire attentamente la fertilizzazione (soprattutto azotata) e l'irrigazione, in maniera da evitare eccessi che, promuovendo un'esuberante vegetazione, determinano condizioni favorevoli alla sviluppo dell'insetto.</li> </ul>	<p><b>Biocidi</b></p> <p>- Olio minerale</p> <p>In caso di presenza della cocciniglia, è consigliabile intervenire con dei trattamenti solo se il numero di neanidi vive risulta, mediamente, superiore a 4-5/foglia su un campione di 100 foglie.</p> <p>L'olio minerale ha un'ottima efficacia se diretto contro le neanidi di prima età. Pertanto, nel periodo di luglio-agosto, quando dalle uova sotto il corpo delle cocciniglie adulte le neanidi schiudono, occorre effettuare il monitoraggio delle stesse, con rilievi almeno settimanali. Quando si ha circa il 70-80% di neanidi schiuse si esegue un trattamento. Dopodichè, è opportuno ripeterlo subito dopo la completa schiusura delle uova. È molto importante effettuare i trattamenti in maniera tale da assicurare una bagnatura uniforme delle chiome.</p> <p>Se l'infestazione è concentrata su alcune piante, i trattamenti vanno limitati alle piante infestate.</p> <p>Per valutare il grado di schiusura delle uova è opportuno utilizzare uno stereomicroscopio.</p> <p><b>Controllo chimico</b></p> <p>Al max effettuare due trattamenti l'anno con Fosmet indipendentemente dall'avversità.</p>

## Oziorrinco (*Otiorrhynchus cribricollis* Gyll.)

### Fattori di limitazione

Naturali	Agronomici	Artificiali
<p><b>Presenza di nemici naturali</b></p> <p>Insetti: <i>Forficula</i> spp..</p> <p>Nematodi entomopatogeni.</p> <p>Funghi: <i>Beauveria bassiana</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lasciare con la potatura alcuni polloni alla base del tronco, in maniera che l'oziorrinco, nutrendosi delle foglie inserite su questi, non attaccherà o attaccherà meno e più tardi la chioma delle piante.</li> </ul>	<p><b>Mezzi meccanici</b></p> <p>- <i>Barriere o fasce protettive.</i></p> <p>Gli adulti di oziorrinco attaccano l'olivo durante le ore più fresche del giorno e durante la notte, mentre nella parte centrale del giorno si rifugiano nel terreno sotto gli alberi.</p> <p>Il controllo consiste nell'applicare intorno al tronco o, in piante grandi, intorno alle branche principali, barriere o fasce protettive di lana sintetica o resinato di lana, in cui gli insetti che salgono sulla pianta rimangono intrappolati. Per ottenere i migliori risultati bisogna adoperare fasce di 20 cm di altezza, legate con lacci elastici nella parte alta, in maniera da formare un imbuto con la parte più larga rivolta verso il basso. Le fasce devono essere applicate anche intorno ai pali tutori e, se l'oliveto è dotato di impianto di irrigazione a microportata con ali gocciolanti sollevate da terra, intorno ai tiranti ed alle tubazioni di adduzione dell'acqua. Le fasce in lana sintetica o resinato di lana hanno una durata di 2-3 anni.</p> <p>In passato venivano utilizzate barriere o fasce protettive di plastica (l'insetto scivola su di esse) o collose (l'insetto rimane attaccato su di esse). Va tenuto presente che le prime danno buoni risultati solo se applicate su cortecce molto lisce e che creano un microclima caldo-umido sotto la fascia che può modificare i tessuti corticali della pianta, mentre le seconde, se la colla va a contatto con la corteccia delle piante, soprattutto in quelle più giovani, può dare luogo ad effetti fitotossici. La colla applicata sul palo tutore spesso si asciuga in tempi brevi e, quindi, deve essere rinnovata più spesso di quella applicata alle piante. Sulla colla possono restare intrappolati anche molti insetti utili, quali sirfidi, coccinelle e crisope.</p> <p><b>Controllo biologico</b></p> <p>Può essere effettuato solo contro le larve utilizzando nematodi entomopatogeni o il fungo <i>Beauveria bassiana</i>. Il costo più alto e la minore sicurezza di efficacia rispetto ai sopraccitati mezzi meccanici non rendono solitamente conveniente l'utilizzo di questi mezzi biologici.</p> <p><b>Controllo chimico</b></p> <p>Non sono autorizzati interventi chimici.</p>

**Margaronia (*Palpita unionalis* Hb. )**

**Monitoraggio**

Sono disponibili trappole a feromone per il monitoraggio ma, solitamente, non sono utilizzate perché la durata del feromone è molto limitata (massimo una settimana) e, quindi, sarebbe necessario sostituire i diffusori molto spesso con negative conseguenze sui costi. Pertanto, è preferibile effettuare il monitoraggio osservando direttamente le piante.

**Fattori di limitazione**

Naturali	Agronomici	Artificiali
<p><b>Condizioni climatiche</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• L'insetto non riesce a svilupparsi con temperature minori a 9-10°C.</li> </ul> <p><b>Presenza di nemici naturali</b></p> <p>Insetti:</p> <p><i>Syrphus corollae</i>,</p> <p><i>Apanteles xanthostigmus</i>, <i>Nemorilla maculosa</i>,</p> <p>Ditteri,</p> <p>Neurotteri crispidi,</p> <p>Ragni.</p>	<p>.</p>	<p><b>Controllo biologico</b></p> <p>- <i>Bacillus thuringiensis</i>.</p> <p>In genere, l'insetto non provoca danni significativi su piante adulte, mentre invece può risultare pericoloso su quelle giovani. Su quest'ultime, al manifestarsi dell'attacco, per evitare il blocco dello sviluppo delle piante in altezza, si deve effettuare un trattamento con <i>B. thuringiensis</i> che, in caso di forte attacco, può essere necessario ripetere dopo circa 2 settimane.</p> <p>I periodi di maggiore pericolosità dell'insetto sono la primavera e il fine estate - autunno; pertanto, in tali periodi bisogna tenere sotto controllo le piante.</p>

<b>Rodilegno giallo (<i>Zeuzera pyrina</i> L.)</b>		
<b>Monitoraggio</b>		
Per monitorare la presenza dell'insetto si installano, prima dell'inizio degli sfarfallamenti (aprile), 2-3 trappole/ha a feromone, appena al di sopra delle chiome degli alberi.		
<b>Fattori di limitazione</b>		
<b>Naturali</b>	<b>Agronomici</b>	<b>Artificiali</b>
<p><b>Condizioni climatiche</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>L'insetto non riesce a svilupparsi con temperature minori a 9-10 °C.</li> </ul> <p><b>Presenza di nemici naturali</b></p> <p>Insetti:</p> <p><i>Apanteles</i> spp., <i>Microdus conspicuus</i>, <i>Pristomerus vulnerator</i>, <i>Rhaphitelus maculatus</i>.</p> <p>Funghi</p> <p><i>Verticillium lecanii</i>, <i>Beauveria bassiana</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Con la potatura devono essere asportati e distrutti i rami attaccati.</li> <li>Piante irrigate e concimate in maniera equilibrata contrastano meglio l'insetto.</li> <li>Le piante vigorose possono reagire agli attacchi di zeuzera producendo essudati nel foro d'entrata della larva che, seccandosi, fino a diventare cristallini, possono inglobare la piccola larva uccidendola.</li> </ul>	<p><b>Mezzi biotecnici</b></p> <p>-<i>Cattura massale</i></p> <p>Viene effettuata installando, prima dell'inizio degli sfarfallamenti (aprile), 8-10 trappole/ha a feromone, appena al di sopra delle chiome degli alberi. Le capsule feromoniche devono essere periodicamente sostituite. Questo sistema di controllo trova dei limiti di applicazione nel fatto che le trappole sono piuttosto costose e andrebbe effettuata su ampie superfici.</p> <p><b>Controllo biologico</b></p> <p>L'utilizzo di nematodi entomoparassiti <i>Steinernema feltiae</i> e <i>biblionis</i> e del fungo <i>Beauveria bassiana</i>, introdotti nella galleria tramite appositi bastoncini con del cotone all'estremità (<i>cotton fiocs</i>), possono essere efficaci nel controllare le larve, ma il metodo risulta costoso.</p> <p><b>Mezzi meccanici</b></p> <p>All'inizio degli sfarfallamenti, rilevati dalle trappole installate per monitorare l'insetto, intensificare i controlli delle piante per individuare eventuali fori di ingresso delle larve. Dopodichè, si inserisce un sottile filo di ferro con la punta uncinata nel foro fino a raggiungere la larva e ucciderla; se si riesce a portar fuori la larva con l'uncino si avrà la sicurezza del risultato.</p>

<b>Rogna (<i>Pseudomonas syringae</i> sp. <i>savastanoi</i> Van Hall)</b>		
<b>Fattori di limitazione</b>		
<b>Naturali</b>	<b>Agronomici</b>	<b>Artificiali</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preferire varietà resistenti alla rogna.</li> <li>• Con la potatura eliminare di preferenza le parti attaccate dal batterio. Effettuare la potatura in periodi asciutti, cercando di limitare i grossi tagli.</li> <li>• Durante la raccolta, operare in maniera da ridurre al minimo le lesioni causate alle piante.</li> <li>• Mantenere le piante nelle migliori condizioni vegetative, effettuando concimazioni equilibrate.</li> <li>• Dopo aver potato una pianta infetta, disinfettare gli attrezzi per la potatura prima di potare un'altra pianta. È opportuno potare per ultime le piante infette.</li> </ul>	<p><b>Biocidi</b></p> <p>-Prodotti rameici (ossicloruro, poltiglia bordolese, ossido o idrossido).</p> <p>Non è possibile fare trattamenti curativi, pertanto la difesa contro la rogna deve essere basata su trattamenti preventivi.</p> <p>Il batterio si diffonde penetrando attraverso le ferite, pertanto se si verificano eventi (grandinate, gelate, ecc.) che provocano dei danni alle piante occorre effettuare tempestivamente un trattamento con prodotti rameici, soprattutto se l'oliveto è costituito da piante appartenenti a cultivar molto sensibili a questa avversità.</p> <p>Su varietà sensibili al patogeno, se si esegue la raccolta con attrezzature agevolatrici o con bacchiatori meccanici, che possono provocare delle lesioni sui rami maggiori di quelle causate dalla raccolta manuale, può essere opportuno eseguire un trattamento con prodotti rameici subito dopo la raccolta e comunque in tempi molto brevi, soprattutto se le temperature sono miti e l'umidità relativa dell'aria è alta.</p> <p>In piante molto infette può essere opportuno effettuare un trattamento con prodotti rameici subito dopo la potatura.</p>

Occhio di pavone o cicloconio ( <i>Spilotea oleagina</i> Cast. Hugh )		
Fattori di limitazione		
Naturali	Agronomici	Artificiali
<p><b>Condizioni climatiche</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Le temperature superiori a 30 °C o inferiori a 5-10 °C rappresentano un limite per l'avvio delle infezioni.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evitare di impiantare varietà non resistenti all'occhio di pavone in zone umide (es. in fondo valle, in prossimità di laghi, ecc.).</li> <li>Quando si realizza un nuovo oliveto, evitare distanze di piantagione troppo strette che, quando le piante sono adulte, facilitano l'insorgenza di ombreggiamento e di un microclima umido all'interno delle chiome che favoriscono il patogeno.</li> <li>La potatura annuale, applicata con giusta intensità, determinando buone illuminazione ed aerazione della chioma, sfavorisce lo sviluppo dell'occhio di pavone, mentre quella biennale o poliennale, facilitando la formazione di addensamenti di vegetazione, favorisce lo sviluppo del patogeno.</li> <li>Evitare l'irrigazione per aspersione sovrachioma.</li> </ul>	<p><b>Biocidi</b></p> <p>- Prodotti rameici (ossicloruro, poltiglia bordolese, ossido o idrossido)</p> <p>In caso di forti attacchi di occhio pavone nell'anno precedente, evidenziati da forti defogliazioni soprattutto della metà inferiore della chioma, effettuare un trattamento a base di rame prima della ripresa vegetativa per abbattere l'inoculo. Eseguire poi un secondo trattamento per proteggere la nuova vegetazione dall'attacco del patogeno, utilizzando sempre prodotti a base di rame, in pre-fioritura (15-20 giorni prima della fioritura), quando nei germogli si sono formati i primi 3-4 nodi fogliari. In luglio-agosto, è opportuno eseguire la diagnosi precoce per determinare l'eventuale presenza di nuove infezioni non ancora manifeste. Se il test risulta positivo è opportuno programmare un altro trattamento da eseguirsi a fine estate - inizio autunno, quando compaiono sulla pagina superiore delle foglie le tipiche macchie causate dall'occhio di pavone.</p> <p>La diagnosi precoce si fa immergendo un campione di 100 foglie, per 2-3 minuti, in una soluzione di idrato sodico o potassico al 5%, tenuta alla temperatura di 50-60 °C per le foglie mature e di 20 °C per le foglie giovani. Nelle foglie infette compaiono delle piccole macchie scure.</p> <p><b>Controllo chimico</b></p> <p>L'utilizzo della Dodina al max un intervento l'anno.</p>

## Raccolta delle olive

### *Epoca di raccolta*

L'epoca di raccolta deve essere scelta considerando l'evoluzione della quantità e della qualità dell'olio durante la maturazione delle olive. Nella scelta si può tener presente anche l'efficienza in termini di rese (% di prodotto distaccato) e tempi di raccolta delle macchine che, eventualmente, si intende utilizzare per distaccare i frutti dalle piante, che dipendono soprattutto dal peso e dalla resistenza al distacco delle olive. La resistenza al distacco diminuisce durante la maturazione rendendo più facile la caduta dei frutti.

In generale, una raccolta precoce determina la produzione di un olio caratterizzato da un colore verde, un fruttato erbaceo e livelli relativamente elevati di amaro e piccante; quest'ultimi dovuti all'alto contenuto di fenoli. In effetti, durante la maturazione le sostanze fenoliche, che sono importanti composti antiossidanti che hanno un'azione antiossidante sia nell'olio sia *in vivo* dopo essere state ingerite, prima aumentano e poi diminuiscono. Una raccolta tardiva determina l'ottenimento di un olio con colore verde meno intenso o tendente al giallo e con sentori di fruttato, amaro e piccante relativamente poco intensi. Oli con caratteristiche qualitative intermedie a quelle descritte si ottengono con raccolta delle olive in epoca intermedia. In linea generale, le caratteristiche sensoriali di un olio sono di elevato livello fino a che la pigmentazione delle olive interessa solo la superficie (buccia), mentre tendono a decadere quando la pigmentazione si estende anche alla polpa (appiattimento sensoriale). Durante la maturazione, si ha anche un intenerimento delle olive che, conseguentemente, diventano più suscettibili a danni meccanici, quali ammaccature e ferite (che si possono procurare con le operazioni di raccolta e/o durante il trasporto e l'eventuale stoccaggio delle olive prima della lavorazione in frantoio), che possono favorire l'insorgenza di processi di alterazione dell'olio (es. inacidimento e ossidazione) all'interno dei frutti.

La quantità di olio ottenibile dall'oliveto aumenta durante la maturazione come risultato dell'incremento del contenuto di olio delle olive, ma deve essere considerato che con il procedere della maturazione si ha anche una perdita di prodotto dovuta alla caduta di frutti (cascola). Pertanto, generalmente, in epoca precoce di raccolta si hanno oli più caratterizzati sensorialmente, ma la quantità spesso non è la massima ottenibile, in epoca intermedia si ha una buona quantità e qualità del prodotto, in epoca tardiva gli oli possono presentare un appiattimento sensoriale e c'è il rischio di una diminuzione della quantità ottenibile a causa di una forte cascola.

Se si è in una zona DOP o IGP e si vuole certificare l'olio, l'epoca di raccolta dovrà essere scelta considerando anche quanto eventualmente prescritto dal disciplinare di produzione riguardo al periodo di raccolta ed alle caratteristiche analitiche e sensoriali che deve possedere l'olio.

L'evoluzione della maturazione dei frutti e quindi della qualità dell'olio è influenzata dall'andamento climatico e dalla carica di frutti delle piante che, pertanto, devono essere tenuti presenti nella scelta dell'epoca di raccolta. In particolare, in piante cariche si ha un rallentamento della maturazione delle olive, mentre in quelle scariche si ha un'accelerazione di tale processo.

In caso di attacchi tardivi di mosca è opportuno anticipare la raccolta per minimizzare i danni in termini di riduzione sia della quantità sia della qualità dell'olio; ciò è particolarmente importante nelle coltivazioni biologiche. In ambienti freddi può essere consigliabile anticipare la raccolta per evitare il rischio di danni ai frutti e quindi all'olio causati dal verificarsi di gelate precoci, che possono determinare l'insorgenza del difetto sensoriale di "legno umido".

In definitiva, l'epoca di raccolta dovrà essere scelta in funzione dell'evoluzione della quantità e dell'obiettivo produttivo dell'azienda: epoca precoce per ottenere un olio fortemente caratterizzato da un punto di vista sensoriale e ricco di sostanze antiossidanti quali i fenoli (olio "novello" o olio ad alto valore nutrizionale), epoca intermedia e in qualche caso medio-tardiva, per cultivar che

presentano una limitata cascola, per ottenere un olio extravergine standard adatto alla grande distribuzione, epoca che meglio soddisfa le prescrizioni del disciplinare per produrre oli DOP o IGP, ecc.. Va precisato che ci sono cultivar che per le loro caratteristiche intrinseche consentono di ottenere oli fortemente caratterizzati in termini sensoriali e con un alto contenuto di sostanze antiossidanti (fenoli) anche in epoche intermedie e medio-tardive di raccolta (es. Coratina).

L'esecuzione di una raccolta in epoca precoce o medio-precoce è, generalmente, consigliabile per la produzione di olio biologico, considerato che il consumatore di tale tipologia di prodotto, solitamente, richiede oltre alla sicurezza ed alla salubrità anche un elevato livello qualitativo del prodotto e che anticipando la raccolta si riducono i rischi connessi ad attacchi tardivi della mosca.

#### *Metodi di raccolta*

La qualità dell'olio è fortemente condizionata dallo stato d'integrità delle olive; pertanto, nell'esecuzione della raccolta occorrerà operare in maniera da limitare al minimo i danni ai frutti. In effetti, le ammaccature e le ferite possono mettere l'olio all'interno dei frutti in contatto con enzimi che possono catalizzare processi di alterazione del prodotto (inacidimento e ossidazione); inoltre, possono favorire lo sviluppo di microrganismi (es. muffe) se le olive non sono lavorate subito.

La raccolta delle olive da terra o da reti preventivamente stese sotto le piante è fortemente sconsigliata poiché con questi sistemi si ha un forte peggioramento nella qualità degli oli.

La raccolta deve essere eseguita dall'albero e può essere effettuata:

- a mano con l'ausilio di pettini manuali e reti stese sotto le piante per l'intercettazione del prodotto;
- con attrezzature agevolatrici per il distacco dei frutti, quali abbacchiatori/sferzatori, brucatori, ganci scuotitori, ecc., e reti stese a terra;
- con vibrator applicati al tronco o alle branche, in dipendenza della grandezza delle piante, che nel caso di applicazione al tronco possono essere anche dotati di telaio intercettatore, permettendo così di meccanizzare anche le operazioni successive al distacco dei frutti;
- con bacchiatori meccanici (aspi oscillanti o pannelli con aste vibranti) applicati a normali trattatrici per il distacco delle olive e reti stese a terra.

L'utilizzo delle macchine possono provocano significativi danneggiamenti agli alberi è consigliabile in questi casi limitare il loro uso. Tali situazioni non sono frequenti e possono essere rappresentate da scortecciamenti nel caso degli vibrator del tronco se le piante, a causa di un andamento stagionale molto favorevole, sono ancora in vegetazione al momento della raccolta e da numerose lesioni sulla vegetazione nel caso di attrezzature agevolatrici e di bacchiatori meccanici se la raccolta è eseguita molto precocemente, soprattutto in varietà caratterizzate da frutti piccoli e resistenza al distacco elevate che impongono un'azione prolungata delle macchine; in entrambi i casi, compatibilmente con l'obiettivo produttivo, gli inconvenienti descritti possono essere ridotti posticipando un po' la raccolta. Tuttavia, se con l'uso delle macchine agevolatrici e di bacchiatori meccanici si causano danni significativi alla vegetazione può essere opportuno, soprattutto in cultivar sensibili alla rogna, effettuare subito dopo la raccolta un trattamento con prodotti a base di rame.

Riguardo ai danni alle olive, quando si utilizzano attrezzature agevolatrici per il distacco dei frutti occorre fare attenzione a non pestare gli stessi sui teli. I bacchiatori meccanici in qualche caso provocano maggiori danni alle olive rispetto agli altri sistemi di raccolta, ma ciò, solitamente, non determina conseguenze significative sulla qualità dell'olio se la trasformazione del prodotto è effettuata in tempi brevissimi. Riguardo alla qualità dell'olio, generalmente, l'utilizzo delle macchine, soprattutto nel caso dei vibrator, consentendo di concentrare (per l'elevata capacità operativa che

determinano) la raccolta nel periodo che si è scelto per eseguire tale pratica e di avere quantitativi adeguati da portare al frantoio in tempi brevi, permettono di ottenere oli altamente rispondenti all'obiettivo produttivo.

## **Processi di trasformazione e caratteristica degli oli estratti**

Nell'area olivicola monitorata, in questi ultimi anni, al fine di migliorare la qualità degli oli destinati alla certificazione (DOP e BIO), oltre a quelli convenzionali, si assiste ad un radicale cambiamento dei metodi di trasformazione del prodotto. Infatti, il sistema tradizionale (molazza + presse) è stato progressivamente sostituito da impianti con frangitore e centrifugazione a due o tre fasi. Pertanto le tecnologie di estrazione, oggi mirano alla produzione di oli di qualità con l'esaltazione della tipicità del prodotto.

Analizzeremo le varie fasi che portano al prodotto finale (olio) evidenziando i metodi utilizzati in zona.

### **Frantumazione delle olive (molitura – frangitura)**

In funzione della tipologia di macchina utilizzata per la frantumazione, l'operazione viene denominata molitura o frangitura.

La molitura realizzata con l'ausilio della molazza, consente di ottenere una pasta omogenea e gli oli ottenuti risultano con un fruttato meno intenso, meno amari e piccanti e più armoniosi al palato. Queste caratteristiche organolettiche si raggiungono a patto che i tempi di molitura, non superano i 20-30 minuti al fine di evitare la frantumazione eccessiva del nocciolino.

La frangitura (a martelli e a dischi) presenta la caratteristica di elevare la capacità lavorativa riducendo i costi di gestione ma di contro, riscaldano la pasta. Gli oli ottenuti da questo sistema, risultano più ricchi di clorofilla (più verdi), più piccanti e amari a seguito della maggiore lacerazione in cui viene sottoposto l'epicarpo.

### **Gramolatura**

La gramolatura ha il compito di favorire l'unione di goccioline in gocce sempre di volume maggiore, favorendo il flavour dell'olio a seguito delle attività enzimatiche che si svolgono all'interno della pasta. I tempi di gramolatura risultano brevi (10'-15') con temperature comprese tra i 18° e i 20°C nelle paste provenienti da molazze, in quanto questa fase viene già avviata durante le operazioni di molitura. La pasta che proviene dai frangitori meccanici è sottoposta alla gramolatura in tempi più lunghi (30-50 min.) con una temperatura dell'acqua circolante nella camicia dai 25 a 30°C.

### **Estrazione dell'olio**

Nella estrazione per pressione, la pasta delle olive proveniente dalla gramola, attraverso un apposito dosatore stratificatore, viene distribuita su diaframmi impilati in una torre provvista di carrello. I diaframmi vengono posti in pressione dando luogo ad un mosto oleoso che viene raccolto sul piatto del carrello. La durata della spremitura varia dai 30 ai 60 minuti e la pressione massima che si raggiunge oscilla tra 300 e 450 kg/cmq.

Nel sistema continuo, la pasta delle olive viene avviata al decanter (centrifuga orizzontale) ottenendo la separazione dell'olio, della sansa e dell'acqua di vegetazione, per effetto della forza centrifuga e dei pesi specifici delle tre fasi.

La velocità di rotazione varia dai 3000 ai 4000 giri al minuto. Nel sistema continuo a tre fasi è necessario aggiungere acqua a temperatura compresa tra i 25 e 30° mentre nel sistema a due fasi, olio e sansa umida, la separazione dell'olio dalla pasta avviene senza aggiunta di acqua e questo consente

di ottenere oli più stabili nel tempo per un contenuto in polifenoli simili a quelli della pressione.

### Separatore (centrifuga verticale)

I mosti oleosi provenienti dalle presse o dalle centrifughe vengono avviate al separatore dove avviene la separazione dell'olio dall'acqua di vegetazione residua, mediante centrifugazione.

### Qualità nei diversi sistemi d'estrazione

Dal punto di vista qualitativo, i parametri chimico-fisici, acidità, N° di perossidi, esami spettrofotometrici, danno risultati molto simili. Per quanto concerne il livello di polifenoli totali, gli oli provenienti dalla pressione sono più ricchi rispetto a quelli da centrifugazione. Dal punto di vista organolettico gli oli ottenuti con il sistema tradizionale si presentano con fruttati più tenui, basso sentore di amaro e piccante, armonico in cui prevale il dolce. Oli ottenuti con la centrifugazione, presentano un fruttato più intenso e amaro e piccante più evidente, sensazioni che tendono ad attenuarsi nel tempo.

L'industria di estrazione dell'olio di oliva produce due tipi di sottoprodotti: le acque di vegetazione (refluo liquido) e la sansa vergine (refluo solido).

### Acque di vegetazione (A.V.)

Le A.V. derivano essenzialmente dall'acqua contenuta naturalmente nelle olive e, in molti casi, anche dall'acqua aggiunta in fase di lavaggio delle olive e degli impianti, nonché da quella eventualmente aggiunta nel processo di estrazione. La qualità e la quantità delle A.V. variano in base a:

1. composizione delle A.V., dipendente dalla qualità delle olive in funzione della varietà, del grado di maturazione, del contenuto in acqua e dalle condizioni pedo-climatiche;
2. processo di estrazione delle olive e acqua aggiunta nelle varie fasi (lavaggio, ecc.);
3. durata dello stoccaggio delle olive prima della molitura che può determinare, se prolungato, l'innescarsi di processi anaerobi ed anaerobici che portano ad una alterazione dei composti organici.

Per i motivi esposti, la quantità e la qualità delle A.V. possono variare notevolmente. La quantità prodotta varia mediamente da circa 40 a 60 litri negli impianti tradizionali discontinui, mentre negli impianti a tre fasi da 80 a 100 litri per ogni 100 kg di olive. L'ampio intervallo, per ognuna delle tecnologie, è funzione dell'acqua aggiunta e delle acque di lavaggio. In ogni caso, le A.V. prodotte dagli impianti a tre fasi sono più diluite rispetto a quelle prodotte dagli impianti tradizionali a pressione. Gli impianti di estrazione a due fasi non producono A.V.

Dal punto di vista microbiologico, nelle A.V. troviamo batteri, funghi e lieviti oltre a cellulosa litici, mentre sono assenti i nitrificanti.

Anche dal punto di vista qualitativo, le A.V. non contengono microrganismi patogeni o sostanze tossiche ma presentano un alto contenuto in sali e in S.O. sia un'elevata acidità. Nelle A.V. si riscontra una notevole variabilità: generalmente hanno un colore bruno-scuro, con un pH compreso tra 4.8 e 6.0, e un residuo secco compreso tra il 6 e il 17%. Circa l'85-88% del residuo è costituito da sostanza organica (con il 2% di azoto organico) mentre il 12-15% da composti inorganici tra cui potassio (6-12%) e fosforo (1-3%).

Dai dati esposti appare evidente il potenziale valore agronomico delle A.V.: supponendo di utilizzarne 50 m<sup>3</sup>/ha con un residuo secco del 10% si apportano al suolo circa 85 kg di azoto, 90 kg di potassio, 15 kg di fosforo e 4000 kg di sostanza organica. Purtroppo, il riutilizzo agronomico delle A.V. tal quali può causare dei problemi riconducibili, sostanzialmente, a quattro aspetti:

- a) potenziale effetto inquinante evidenziato dagli elevati valori di COD e BOD;
- b) elevato contenuto in sostanza organica fresca che apportata al suolo può causare alterazioni

della qualità della sostanza organica nativa del suolo nonché una diminuzione del contenuto in azoto (*priming effect*);

- c) elevato contenuto in sostanze fenoliche aventi effetto fitotossico;
- d) elevata salinità.

Nel tempo sono stati proposti diversi approcci tesi alla risoluzione del problema: da processi di depurazione veri e propri utilizzando tecnologie diverse (ultrafiltrazione, incenerimento, concentrazione, ecc.) che però non garantirebbero la riduzione del tasso inquinante ai livelli determinati dalle norme di Legge, a processi di recupero di sostanze di interesse alimentare o farmaceutico (in particolare sostanze fenoliche e zuccheri), fino a processi catalitici mirati a migliorare la qualità della sostanza organica e diminuire la fitotossicità. L'efficacia di questi processi si è però dimostrata bassa da un punto di vista economico, in quanto i benefici ottenuti comportavano un notevole dispendio economico, sia in termini di investimenti per impianti sia per una produzione elevata di consumi energetici nei diversi sistemi che costituirebbe di fatto una causa d'inquinamento.

Nel contempo numerose prove scientifico-sperimentali, condotte da numerosi ricercatori in vari paesi, dimostravano come le A.V., con modalità e dosi controllate, potevano essere utilizzate tal quali sul suolo come ammendanti.

In particolare, considerando impianti di estrazione di tipo tradizionale, dosi fino a 100-150 m<sup>3</sup>/ha per molte colture arboree e 50-80 m<sup>3</sup>/ha per numerose colture erbacee (in fase di pre-impianto) possono essere utilizzate senza ripercussioni negative sulla qualità del suolo e sulle produzioni.

Sulla base delle sperimentazioni scientifiche, in Italia a partire dal 1996 (legge 574 dell'11/11/1996 e successive modificazioni ed integrazioni) è stato consentito, lo spandimento delle A.V. tal quali sui suoli agricoli nel limite massimo di 50 m<sup>3</sup>/ha/anno per quelle provenienti da frantoi a ciclo tradizionale e di 80 m<sup>3</sup>/ha/anno quelle provenienti da frantoi a ciclo continuo, con prescrizioni relative alle modalità di spandimento e limitazioni rispetto alla durata dello stoccaggio, all'ubicazione dei suoli, al tipo di coltura in atto e all'eventuale presenza di falde. Al fine di evitare fenomeni di fitotossicità o di inquinamento del suolo, oltre che la quantità, assume una importanza fondamentale la fase di spandimento che deve mirare a ripartire in modo più uniforme possibile il volume di A.V. somministrata, per evitare situazioni di accumulo in determinate zone degli appezzamenti. Dopo la somministrazione è buona norma procedere alla lavorazione per l'interramento non prima di 20-30 giorni, in modo che il contatto con l'aria e i conseguenti fenomeni di ossidazione riducano ulteriormente il carico inquinante dovuto alla sostanza organica.

A tutt'oggi l'utilizzo dell'A.V. tal quali come ammendanti, con le limitazioni sopra esposte, rappresenta il metodo più razionale per risolvere il problema dello smaltimento.

### Sansa vergine (S.V.)

Il sistema di estrazione di estrazione dell'olio influenza in modo determinante la quantità di sansa prodotta. Infatti il contenuto in umidità della S.V. varia dal 20-25 % negli impianti tradizionali a pressione al 40-50% in quelli a tre fasi, fino ad arrivare al 55-70% in quelli a due fasi. La composizione qualitativa oltre che dal tipo di impianto è influenzata anche dalle caratteristiche delle olive. La S.V. ha una composizione media, sul peso secco, di oltre il 90% in sostanza organica, dell'1-1.5% di potassio e dello 0.2-0.4 % in fosforo. Anche per questo sottoprodotto, la potenzialità agronomica è in parte inficiata dalla stessa problematica vista per le A.V. (fitotossicità).

Attualmente la S.V. prodotta viene, per la maggior parte, conferita ai sansifici che procedono all'estrazione dell'olio residuo mediante solvente. La sansa "esausta" risultante dopo l'estrazione è generalmente utilizzata come combustibile, fermo restando alcuni vincoli di carattere legislativo e il problema dello smaltimento delle ceneri di combustione che rappresentano a tutti gli effetti un rifiuto. Oltre a questa modalità ricorrente di smaltimento del sottoprodotto sono possibili delle alternative:

- a) la legislazione vigente, già citata per le A.V., consente l'utilizzo delle S.V. tal quali sul suolo senza fissare limiti di quantità. E' evidente come, pur non essendoci un limite legislativo, la quantità da utilizzare deve essere attentamente valutata in base alle caratteristiche della sansa, dei suoli e delle colture.
- b) al fine di prevenire problemi, con l'utilizzo tal quale come ammendante, è prassi consolidata sottoporre, insieme ad altre matrici, la S.V. a processi di compostaggio in modo da "nobilitarla" agronomicamente ed ottenere un prodotto ad alto valore ammendante e basso impatto ambientale. Numerose sperimentazioni hanno dimostrato valida la formulazione in miscela con paglia e pollina, matrici di facile reperimento e a basso costo;
- c) utilizzo in bassa percentuale, unitamente a torba ed altre matrici, per la formulazione di substrati di crescita in ambito vivaistico;
- d) estrazione di composti di interesse alimentare o farmaceutico;
- e) produzione di nocciolino di sansa vergine ottenuto tramite delle macchine (separatrici di nocciolino) senza l'intervento di sostanze chimiche o solventi. Il prodotto che ne deriva, risulta un combustibile ad elevato potere calorifico, completamente ecologico e quindi, a differenza di quello prodotto dalla sansa esausta, può essere venduto per uso domestico con un ottimo rapporto potere calorifico/prezzo, di gran lunga più conveniente rispetto all'utilizzo del pellet (risparmio fino al 50%) La resa in nocciolino varia dal 12 al 20% (in base al tipo di macchina utilizzata) ed è leggermente più alto per le S.V. derivanti da impianti a tre fasi rispetto a quelli a due fasi. Dato il costo di acquisto della macchina e i relativi costi di gestione, questa soluzione è valida solo per frantoi con elevate produzioni.

## Bibliografia

- Del Fabro A., 1992 - Coltivare l'olivo. La casa verde editrice.
- Giannetti P. L., 1988 - Il sovescio. Demetra, 8: 24-26.
- Gregg R.B., Philbrick ., 1988 - Le consociazioni vegetali e loro impiego. Editrice Antroposofica Milano.
- Kabourakis M., 1995 - Corrette pratiche di olivicoltura ecologica a Creta. Cretan Enviromental Group.
- Lunetta M., 1997 - Olivicoltura biologica. Tecniche di coltivazione. Assolivo Sicilia.
- Vitetta G., Manuale di olivicoltura pratica. Casa Editrice Fratelli Marescalchi Casale Monferrato.
- Vizioli V., 1997 - Esperienze di olivicoltura biologica in Umbria. Seminario Internazionale Agricoltura Biologica e Sostenibile nel mediterraneo. CISS-AIAB Sicilia - IFOAM
- Fiorino P., 2003 - Olea Trattato di Olivicoltura. Edagricole
- Pannelli e Alfei 2008 - Olivo e Olio n.6
- Simeone V. et al. 2009. Linee guida per la coltivazione dell'olivo con il metodo biologico. In Filiere dell'olio di oliva e del vino con il metodo biologico. Programma Interreg III Grecia- Italia 2000-2006. pp. 104-147.

## Pubblicazioni

### Caratterizzazione preliminare dell' entofauna degli oliveti in Puglia 2011

Simeone, V.; El Hachem, N.; Tucci, M.; Lamaj, F.; Iannotta, N.; Scalercio, S., II° Convegno Nazionale dell' Olivo e dell'Olio, Perugia 21- 23 Settembre 2011

**Valorizzazione degli olivi secolari in Puglia**, 2011 Simeone, V.; Tucci, M.; Lamaj, F.; Viti, R.; Baser, N.; Santoro, F.; Calabrese, J.; Perrino, V.E.; Veronico, G.; Iannotta, N.; Scalercio, S. , Convegno scientifico finale RIOM Risorse Aggointive, Rende (CS), 8-9 novembre 2011



# La filiera olivicola-olearia pugliese: struttura, organizzazione e competitività

B. De Gennaro, L. Roselli

Dipartimento di Scienze agro-ambientali e territoriali  
Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"  
Bari - Italia

## Abstract

Con questo lavoro si intende contribuire a colmare le carenze conoscitive tuttora esistenti in merito alla struttura produttiva e alle capacità competitive della filiera olivicola-olearia della Puglia, un sistema produttivo che riveste una fondamentale importanza nella economia agroalimentare regionale e meridionale e che, nello stesso tempo, svolge un ruolo di primo piano nella organizzazione della intera filiera nazionale. L'analisi prende le mosse dallo studio della struttura produttiva e dei risultati economici della fase agricola elaborando i bilanci dei diversi sistemi olivicoli aziendali. La metodologia utilizzata ha permesso di tener conto del complesso "mosaico" di realtà territoriali che compongono la olivicoltura regionale, evidenziando l'articolazione e differenziazione territoriale dei risultati. L'analisi di bilancio ha permesso di documentare la situazione di assoluta insostenibilità economica degli attuali livelli di prezzo per quasi tutte le tipologie di aziende olivicole che utilizzano i mercati all'ingrosso del prodotto sfuso quale sbocco commerciale prevalente od esclusivo. L'analisi delle fasi successive della filiera ha permesso di ricostruire gli aspetti strutturali ed organizzativi delle fasi industriali della filiera analizzandone anche il grado di competitività attraverso lo studio degli scambi commerciali internazionali. Infine, una particolare attenzione è stata prestata ai possibili sentieri di adeguamento dell'olivicoltura regionale al mutato scenario competitivo e al ruolo delle politiche, valutando potenzialità e limiti sia delle strategie di differenziazione (certificazione biologica e DOP) sia delle strategie di intensificazione dei modelli produttivi (intensivo e superintensivo).

**Parole chiave:** olivicoltura, filiera, commercio estero, intensivo, superintensivo, denominazioni di origine, agricoltura biologica

## Introduzione

La filiera olivicola-olearia pugliese ha di fronte a sé importanti sfide da affrontare: dalla competizione dei sistemi produttivi concorrenti, sia interni alla UE che extra UE, all'aumento di potere di mercato delle imprese di confezionamento attive su scala multinazionale oltre che di quelle della distribuzione, sino ai recenti mutamenti della politica agricola comunitaria (PAC). Relativamente a questo punto, dopo il disaccoppiamento degli aiuti, attuato nel 2006, la proposta di riforma della PAC per il periodo 2014-2020, attualmente in discussione al Parlamento europeo, lascia prevedere la possibilità di una drastica riduzione degli aiuti disaccoppiati erogati alle imprese che coltivano l'olivo. La possibilità sia per gli attori del sistema produttivo regionale sia per i decisori politici di fronteggiare questi cambiamenti passa per una approfondita conoscenza delle caratteristiche

attuali del sistema produttivo e della sua capacità di adattamento al sempre più rapido mutare dello scenario competitivo.

Con questo obiettivo sono stati sviluppati due filoni di ricerca: il primo ha riguardato la struttura e la competitività dell'olivicoltura e della filiera produttiva regionale; il secondo ha preso in esame le possibili strategie di adattamento del settore olivicolo al nuovo scenario competitivo e l'adeguatezza degli strumenti di politica agraria. Per l'analisi dell'olivicoltura è stata definita una metodologia volta all'individuazione di sistemi aziendali rappresentativi per i quali sono state sviluppate successivamente le opportune analisi di bilancio. La filiera produttiva è stata studiata mediante l'analisi della configurazione strutturale e organizzativa e dei flussi di prodotti tra le diverse fasi, compresi i flussi di commercio con l'estero. Per quanto riguarda il secondo filone di ricerca sono state valutate la validità economica e il ruolo delle politiche a sostegno di strategie di differenziazione della produzione attraverso l'adesione al sistema di certificazione DOP (Roselli et al., 2009) o biologico (Cimino et al., 2009) oppure strategie volte all'intensificazione degli impianti olivicoli (De Gennaro et al., 2012).

Il lavoro è articolato in cinque paragrafi compresa la presente introduzione e le conclusioni. Nel secondo paragrafo sono presentati i risultati dell'analisi della competitività dell'olivicoltura; nel successivo viene sintetizzato lo studio dell'intera filiera olivicola-olearia regionale; nel quarto paragrafo sono valutati i possibili sentieri di aggiustamento per l'olivicoltura pugliese.

## Struttura e competitività dell'olivicoltura regionale

L'olivicoltura pugliese comprende, al suo interno, realtà produttive molto diversificate sotto vari aspetti: dalle condizioni naturali, sociali ed istituzionali, alle cultivar utilizzate, alle tecniche di produzione impiegate e conseguentemente alle caratteristiche qualitative dell'olio. In generale appare un'olivicoltura che vede la coesistenza di una parte dinamica, con impianti relativamente giovani (olivicoltura intensiva), con una più tradizionale basata su impianti plurisecolari che, soprattutto in alcune aree, assolvono, oltre che una funzione produttiva, un'importante funzione paesaggistica. In ragione dell'ampio polimorfismo di questo comparto, l'analisi economica della competitività dell'olivicoltura regionale è stata svolta prendendo in considerazione sia le caratteristiche di contesto (pedo-climatiche e socio-economiche) che i caratteri endogeni (dimensione aziendale, tipologia di impianti, tecniche colturali, strategie commerciali) delle principali tipologie di aziende olivicole presenti sul territorio regionale. Questo lavoro ha portato all'individuazione di 13 aree olivicole omogenee sub-provinciali e 52 tipologie aziendali (Sistemi Olivicoli Rappresentativi: SOR). La successiva analisi di bilancio ha consentito, tramite il calcolo di specifici indici, di valutare e confrontare le performance economiche di ciascuna tipologia aziendale (De Gennaro et al., 2010). I risultati ottenuti mostrano un'ampia variabilità nella produttività degli oliveti (produzione lorda vendibile per ettaro), nei costi di produzione (costo totale per kg di olio prodotto), nella redditività aziendale (reddito di impresa) e nel grado di dipendenza dagli aiuti erogati dalla PAC (rapporto percentuale tra gli aiuti percepiti e la PLV), sia tra zone olivicole, che tra tipologie aziendali. Il diverso grado di competitività è spiegato dalle differenze nelle caratteristiche strutturali delle aziende, nella produttività fisica degli oliveti e nella strategia di commercializzazione adottata. In particolare le aziende più competitive sono quelle di dimensioni medio-grandi e grandi ricadenti nell'area del Nord-barese, mentre quelle più deboli nell'affrontare le attuali condizioni di mercato sono le tipologie aziendali operanti in aree quali Gargano, Sub Appennino Dauno e zona orientale della provincia di Taranto. In linea generale, le aziende piccole spesso collocano la propria produzione attraverso la vendita diretta a prezzi più elevati rispetto alle altre tipologie aziendali, riuscendo in questo modo

a compensare i maggiori costi di produzione. Le aziende di medie e grandi dimensioni, viceversa, sono maggiormente esposte alla variabilità dei prezzi dell'olio sui mercati all'ingrosso. Il sistema olivicolo regionale mostra, infine una forte dipendenza dagli aiuti erogati dalla PAC il cui peso sulla PLV oscilla, in media a livello regionale, tra il 25% delle aziende piccole e il 15% di quelle grandi. Questo dato evidenzia quanto severe potrebbero essere le conseguenze sul settore olivicolo di una drastica riduzione degli aiuti così come prospettato dalla proposta di riforma della PAC.

## Organizzazione e performance della filiera

### La prima trasformazione

La molitura delle olive prodotte in regione è curata dall'industria di prima trasformazione (frantoi privati e oleifici cooperativi) che realizza come prodotto principale oli di pressione allo stato sfuso e come sottoprodotto le sanse vergini. Si tratta di più di un migliaio di frantoi, circa il 20% dei frantoi presenti in Italia (4.966), che trasformano poco più di 1 milione di tonnellate di olive realizzando in media 178 mila tonnellate di oli di oliva (resa media del 16%). Nel corso degli ultimi anni, a differenza di quanto accaduto nei decenni precedenti (De Gennaro, 1996), il numero di impianti è rimasto sostanzialmente stabile, con una dislocazione diffusa sull'intero territorio regionale.

L'assenza di dati aggiornati non consente di valutare il ruolo degli oleifici cooperativi nella fase di prima trasformazione. Tuttavia le indicazioni raccolte mediante interviste dirette a testimoni privilegiati hanno confermato le valutazioni effettuate in precedenti studi (De Gennaro, 2005) circa il fondamentale contributo che il settore cooperativo svolge nella organizzazione dell'offerta soprattutto in alcune province (Lecce, Bari e Brindisi), ma anche le problematiche storiche che tuttora lo affliggono. Le principali criticità riguardano la limitata dimensione economica delle imprese e il comportamento opportunistico dei soci in merito ai conferimenti delle olive che riduce l'efficienza di utilizzo degli impianti. Un'altra rilevante problematica che affligge gli oleifici cooperativi è la limitata dotazione finanziaria che ne condiziona le politiche gestionali e la competitività rispetto alla imprese private.

La qualità degli oli di pressione ottenuti è strettamente connessa alla qualità e alle caratteristiche varietali delle olive molite, all'andamento climatico e delle avversità fitopatologiche, alla modalità di raccolta e trasporto delle olive al frantoio e infine alla tecnologia di molitura utilizzata. A causa delle diverse tecniche produttive e in particolare alle modalità di raccolta (dall'albero o da terra) vi è un'ampia variabilità nella qualità degli oli prodotti nelle diverse aree di produzione regionali. Con riferimento alla distribuzione per categorie merceologiche è possibile distinguere due principali areali: il primo, che comprende le province di Foggia, Bari e la parte occidentale di Taranto, in cui si produce quasi esclusivamente extravergine, il secondo, che interessa le province di Brindisi e Lecce e la parte orientale di quella di Taranto. In questi territori sono gli oli vergini e lampanti a prevalere. Su una produzione regionale media di 178 mila tonnellate di oli di oliva, in base alle nostre valutazioni è possibile stimare che la produzione di extravergine ammonti a circa 110 mila tonnellate, il vergine a più di 28 mila tonnellate e il lampante a quasi 40 mila tonnellate. La produzione media annua di sanse vergini, che sono il principale sottoprodotto del processo di molitura delle olive, è stimata pari a circa 770 mila tonnellate. Queste sono destinate prevalentemente ai sansifici per la produzione di olio di sansa.

Per effetto della presenza di elevate barriere all'entrata legate all'elevato fabbisogno finanziario necessario per creare un'immagine di marca, differenziare il prodotto, acquisire la fiducia dei consumatori e creare un'efficiente rete distributiva, solo un numero limitato di frantoi riesce a valorizzare al meglio la propria produzione commercializzando olio confezionato con un proprio

marchio. La stragrande maggioranza degli operatori, invece, colloca il prodotto prevalentemente allo stato sfuso. Una parte della produzione regionale di olio extravergine e vergine è destinata all'autoconsumo e alla vendita diretta presso i frantoi o gli stessi produttori agricoli. La restante parte degli oli vergini commestibili viene ceduta alle industrie di confezionamento, regionali ed extra-regionali, direttamente dai frantoiani o tramite mediatori o grossisti dotati di strutture di stoccaggio. Gli oli vergini che per eccesso di acidità, o per difetti organolettici, sono classificati come lampanti vengono ceduti, direttamente o tramite l'intervento di intermediari commerciali, alle imprese di raffinazione.

### La seconda trasformazione

L'industria di seconda trasformazione comprende gli impianti per l'estrazione dell'olio greggio dalle sansi vergini (sansifici), gli impianti per la raffinazione dell'olio lampante e dell'olio di sansa greggio (raffinerie) e le imprese di confezionamento che curano l'eventuale miscelazione e il confezionamento degli oli di oliva da destinare al consumo finale. In Puglia risultano attualmente attivi 9 sansifici, dislocati esclusivamente nelle province di Bari (7 stabilimenti) e Brindisi (2). Quello della raffinazione, è un settore che ha subito nel corso degli ultimi anni un significativo ridimensionamento, sia nel numero di imprese, che nella capacità produttiva. Attualmente, sull'intero territorio regionale, risulta attiva una sola impresa localizzata nel barese, che lavora comunque quantitativi di lampante esigui. La quasi totalità degli oli di oliva da raffinare vengono, pertanto, inviati alle imprese localizzate nelle regioni centro-settentrionali (Umbria, Toscana e Liguria) o all'estero, in modo particolare in Spagna. Sia gli oli extravergine e vergine che gli oli raffinati vanno a rifornire gli imbottigliatori e in minima parte anche l'industria alimentare (ad es. l'industria delle conserve sott'olio). Per quanto riguarda l'industria di confezionamento regionale non sono disponibili dati ufficiali riguardanti le caratteristiche strutturali di questo fondamentale segmento della filiera. L'unico dato disponibile riguarda il numero di imprese di condizionamento iscritte nell'elenco regionale costituito ai sensi del Reg. CE 1019/2002 (riconoscimento per la produzione di olio 100% italiano). Dai dati forniti dalla Regione Puglia risulta che al 31 marzo 2009 vi erano ben 512 imprese regionali autorizzate. Tra queste solo 89 sono le società cooperative, localizzate prevalentemente nelle province di Bari (36), Brindisi (23) e Lecce (18). Va segnalata la grave carenza di informazioni circa i quantitativi lavorati dalle imprese confezionatrici che impedisce di garantire la necessaria trasparenza al mercato degli oli di oliva.

### I consumi regionali

I consumi domestici delle famiglie pugliesi secondo nostre stime su dati Nielsen (anni 2007 e 2008) si attestano intorno alle 30 mila tonnellate (il 16% circa della produzione oleicola regionale), per un valore al consumo finale di circa 144 milioni di euro. Ogni famiglia pugliese consuma in media in un anno circa 24 litri per una spesa media di 105 euro, pari ad un prezzo medio di 4,43 euro per litro di olio consumato. I consumi familiari domestici sono la somma di due componenti: l'autoconsumo delle famiglie che producono olio (olivicoltori e altri attori della filiera), che è possibile valutare in 12 mila tonnellate, e gli acquisti delle famiglie nei diversi canali di vendita (distribuzione moderna, dettaglio tradizionale, approvvigionamento diretto presso le aziende agricole o i frantoi, ecc.), pari a quasi 18 mila tonnellate. Secondo i dati forniti dalla Nielsen, le famiglie che acquistano oli di oliva sono 930 mila, pari a circa il 69% delle famiglie pugliesi. La struttura dei consumi regionali evidenzia l'elevata incidenza che conserva tuttora sia l'autoconsumo che l'acquisto di olio direttamente presso i frantoi o le aziende agricole. Complessivamente queste due modalità di approvvigionamento rappresentano circa i due terzi dei consumi di oli di oliva (66,5%). Le famiglie pugliesi dimostrano, inoltre, di preferire nettamente (72,2% degli acquisti complessivi) l'approvvigionamento presso

canali di vendita diretti diversi dalla GDO. I consumi extradomestici delle famiglie pugliesi, relativi ai pasti e alle consumazioni fuori casa presso la ristorazione commerciale (ristoranti, bar, caffetterie) e la ristorazione collettiva (mense aziendali, scolastiche, universitarie, ospedali etc.), possono essere valutate in maniera del tutto prudentiale intorno alle 4 mila tonnellate annue (ns. stime su dati Databank, 2007). Risulta piuttosto difficile stimare, invece, i quantitativi di oli di oliva destinati all'industria alimentare regionale. Oltre ai consumi domestici ed extradomestici regionali e agli utilizzi dell'industria alimentare, la produzione oleicola pugliese è destinata a varie tipologie di imprese extraregionali o estere (imprese di seconda trasformazione, grossisti, dettaglianti e importatori).

### I flussi extraregionali e il commercio con l'estero

La Puglia è al centro di un consistente flusso di scambi di oli di oliva sia sui mercati esteri sia con le altre regioni italiane. Per quanto riguarda gli scambi con l'estero, nel quadriennio 2003-2006 le importazioni si sono attestate in media intorno alle 88mila tonnellate a fronte di circa 38mila tonnellate esportate. Il flusso netto di importazioni, pari a circa 50mila tonnellate, si somma alla produzione regionale (178 mila tonnellate). La disponibilità complessiva di prodotto si attesta a 228mila tonnellate, a fronte di utilizzi finali pari a poco più di 34mila tonnellate (consumi domestici ed extradomestici) più gli utilizzi dell'industria alimentare regionale (industria conserviera, prodotti da forno, ecc.). Questi dati consentono di valutare in almeno 190mila tonnellate il flusso netto di oli di oliva verso altre regioni italiane.

L'analisi dei flussi commerciali con l'estero evidenzia che tanto le importazioni quanto le esportazioni sono costituite prevalentemente da oli extravergine e vergine. Fra i tre segmenti di mercato considerati (extravergine+vergine, lampante, altri oli di oliva) l'unico con un saldo commerciale positivo, in valore ma non in volume, è quello degli "altri oli di oliva". L'andamento degli scambi commerciali (decennio 1995-2006) indica complessivamente un sostanziale deterioramento della posizione competitiva della Puglia. Per quanto riguarda gli oli extravergine e vergine di oliva il deficit commerciale è di quasi 38 mila tonnellate. Le importazioni (55mila tonnellate) provengono principalmente da Spagna, Grecia e Tunisia. Le esportazioni (17mila tonnellate), invece, sono indirizzate per la gran parte in USA, Giappone, Spagna, Germania, Svizzera, Francia, Australia e Canada. Il deficit nel segmento dell'olio lampante è di circa 10 mila tonnellate. I principali mercati di approvvigionamento sono Tunisia, Spagna e Grecia, mentre il principale mercato di sbocco è la Spagna. In questo segmento di mercato si è registrato, nel periodo tra il 1999 e il 2006, una stabilizzazione dell'import a fronte di un marcato incremento delle vendite all'estero. Un trend che si può ricondurre al forte ridimensionamento della capacità produttiva dell'industria di raffinazione regionale. Negli scambi con l'estero degli "altri oli di oliva" vi è un sostanziale equilibrio tra import ed export. Il principale partner commerciale all'import è la Grecia, seguita da Spagna, Turchia, Tunisia, Portogallo e Marocco. Per le esportazioni vi sono due tipi di mercati di destinazione: i Paesi non produttori tradizionali (USA, Giappone, Australia e Germania) e i Paesi dell'area del Mediterraneo (Grecia, Tunisia, Spagna e Marocco). Questi ultimi importano "altri oli di oliva" dalla Puglia ad un prezzo medio unitario più basso rispetto ai primi. Un dato che probabilmente è determinato dal fatto che in gran parte si tratta di olio raffinato non destinabile direttamente al consumo finale. Dal confronto delle performance sui mercati internazionali dell'olio d'oliva della Puglia rispetto all'insieme delle altre regioni italiane emerge, infine, la debolezza del sistema produttivo regionale, come testimoniato dall'indicatore della propensione all'export, pari ad appena il 17% per la Puglia contro il 60,6% dell'insieme delle altre regioni italiane. Questo dato sintetizza tutte le difficoltà che il sistema produttivo regionale incontra nel cogliere le opportunità offerte dalla crescita della domanda

sui mercati internazionali (De Gennaro et al., 2009).

## Strategie di adattamento al nuovo scenario competitivo

### Intensificazione degli impianti produttivi

La letteratura agronomica, da diversi anni, suggerisce per l'ammmodernamento dei sistemi produttivi italiani e spagnoli l'adozione di oliveti a più alta densità d'impianto, progettati per la raccolta meccanica e capaci di garantire rese più elevate e costi di produzione più bassi, proponendo due modelli: intensivo (con oltre 200 piante/ha), già diffuso sia nei Paesi produttori tradizionali, che nei Paesi emergenti, e superintensivo (con oltre 1.500 piante/ha) introdotto in alcune regioni della Spagna (Aragona, Andalusia, ecc) e in altri paesi produttori di olio di oliva (Tunisia, Marocco, California, Australia, Portogallo, Francia, Cile, Argentina, Italia, ecc.). Il modello superintensivo sembra essere capace di garantire sia rese elevate dopo pochi anni dall'impianto, che la meccanizzazione completa della coltura, anche se alcune esperienze in Spagna segnalano problemi riguardanti l'efficiente gestione della chioma a partire dal 6°-7° anno dall'impianto che incidono negativamente sulle produzioni e rendono difficile prolungare la vita economica oltre il 15°-16° anno di età. La nostra analisi (De Gennaro et al., 2012) ha messo a confronto i due modelli, intensivo (OI) e superintensivo (OSI), basandosi sul confronto dei flussi dei costi e dei ricavi ad essi associati nel corso di un periodo di riferimento, pari all'intera vita economica dell'impianto di maggiore durata e dei relativi investimenti. La comparazione dei due modelli ha preso in considerazione l'area produttiva olivicola settentrionale della provincia di Bari, considerando un periodo di osservazione di 48 anni, pari alla presunta vita economica del modello intensivo e a tre volte quella ipotizzata per il modello olivicolo superintensivo. L'unità di analisi considerata è 1 ettaro di superficie coltivata ad oliveto. I dati tecnici di base, le tecniche standard di coltivazione per ogni fase del ciclo produttivo e le potenzialità produttive dei due modelli analizzati sono stati ottenuti dalla letteratura disponibile e, in assenza di riferimenti bibliografici, si è fatto affidamento sulle conoscenze di tecnici esperti in olivicoltura. La comparazione dei due modelli olivicoli è stata effettuata sviluppando l'analisi finanziaria dei flussi di cassa (*Cash Flow Analysis*) generati nell'intero periodo di riferimento. I criteri utilizzati per confrontare i due investimenti colturali olivicoli sono stati: il Valore Attuale Netto (VAN) e il Tasso di Rendimento Interno (TIR). Al fine di rendere più agevole la comparazione si è deciso di trascurare gli effetti generati da strategie aziendali che riguardino la fase di trasformazione delle olive in olio, così come le differenze qualitative delle rispettive produzioni olearie riconducibili alle diverse cultivar utilizzate. Le valutazioni effettuate hanno mostrato che l'investimento iniziale è più alto nel modello olivicolo superintensivo (OSI), a causa dei maggiori costi per la messa a dimora delle piantine, per l'allestimento del sistema di sostegno delle stesse e per l'installazione dell'impianto d'irrigazione. I costi annuali di gestione della coltura sono influenzati dal grado di meccanizzazione dell'oliveto. A questo riguardo, nonostante il maggiore impiego di fattori produttivi (fertilizzanti e pesticidi), il modello OSI ha evidenziato costi di esercizio inferiori rispetto al modello OI in tutte le fasi di produzione, esclusa la fase di allevamento, per effetto dei minori costi di potatura e di raccolta. Il calcolo degli indici di redditività dell'investimento (VAN e TIR) ha evidenziato che, considerando un prezzo delle olive sul mercato all'origine pari a 350 €/t, entrambi i modelli non sono in grado di garantire la convenienza economica dell'investimento. In definitiva i risultati ottenuti indicano che il rinnovamento degli oliveti rappresenta un'opzione strategica praticabile a condizione di un miglioramento delle attuali quotazioni di mercato delle olive; in particolare sono necessari prezzi delle olive uguali o superiori a 461 €/t per il modello intensivo e superiore a 493 €/t per quello superintensivo. In alternativa, il rinnovamento degli impianti olivicoli può essere realizzato solo a condizione che la politica agricola regionale definisca strumenti di sostegno diretto per tali investimenti.

Strumenti di differenziazione degli oli di oliva

### **Conversione al metodo di produzione biologico**

Una strategia di differenziazione a disposizione delle imprese olivicole è la conversione al metodo biologico. A tal fine abbiamo sviluppato un'analisi (Cimino et al., 2009) volta a valutare le condizioni alle quali l'adozione del metodo bio possa rappresentare una valida strategia competitiva per le imprese olivicole pugliesi e proporre alcune riflessioni sulla politica regionale a sostegno della diffusione dell'agricoltura bio. Partendo dai SOR individuati in precedenza per la zona del Nord barese, si è simulata la conversione al metodo biologico attraverso la modifica della dotazione di fattori produttivi e delle tecniche colturali. In particolare sono stati ipotizzati, oltre alla *baseline* convenzionale (CONV) due possibili scenari di conversione al metodo biologico che differiscono fra loro per le strategie di commercializzazione adottate dalle aziende. Nel primo scenario (BIO1) le aziende vendono le olive e/o l'olio negli stessi circuiti e agli stessi prezzi dello scenario convenzionale. Nel secondo scenario (BIO2) le aziende riescono a collocare i prodotti nei circuiti bio beneficiando di un premium price. I canali di vendita e i prezzi pagati nello scenario BIO2 sono stati identificati con riferimento alle condizioni più diffuse tra le imprese che già adottano il metodo biologico e commercializzano le loro produzioni nel mercato bio. Per ciascun SOR è stato stilato il bilancio economico nei tre scenari presi in esame (CONV, BIO1 e BIO2). Dalle analisi sviluppate è emerso che l'olivicoltura bio costituisce una valida strategia imprenditoriale per migliorare la redditività aziendale. Questo risultato, tuttavia, si basa su due condizioni fondamentali e cioè che dopo il periodo di conversione le rese produttive dell'oliveto biologico siano analoghe a quelle dell'oliveto convenzionale e che tutta la produzione ottenuta sia commercializzata nei canali di vendita del biologico. Circa la valutazione del sostegno dell'olivicoltura biologica prevista dalla Regione Puglia nell'ambito del Programma di Sviluppo Rurale (PSR 2007-2013), è emerso come l'erogazione del premio sia giustificata come compensazione dei maggiori costi di produzione soprattutto nel caso in cui le imprese non siano in grado di valorizzare la produzione immettendola nei circuiti dei prodotti bio. Nel caso in cui le imprese riescano a sfruttare le opportunità del mercato bio le giustificazioni del premio rappresentano soprattutto un compenso per le esternalità positive prodotte dalle aziende biologiche, quali la tutela dell'ambiente e del paesaggio agrario, la salvaguardia della biodiversità e il contributo allo sviluppo rurale.

### **Adozione del disciplinare di produzione DOP**

Nel settore degli oli extravergini di oliva la Puglia vanta ben cinque Denominazioni di Origine Protetta (DOP): Dauno, Terra di Bari, Collina di Brindisi, Terra d'Otranto, Terre Tarentine. Fra queste la DOP "Terra di Bari" rappresenta la denominazione più importante in ambito regionale, la seconda in Italia, con una produzione di olio extravergine di oliva certificata superiore alle 2mila tonnellate. Gli altri oli DOP pugliesi hanno una dimensione di mercato molto contenuta se non addirittura inesistente, come nel caso della DOP "Terre Tarentine".

L'analisi sviluppata (Roselli et al., 2009) ha riguardato la DOP "Terra di Bari" con l'obiettivo di studiare la struttura e l'organizzazione di questa specifica filiera e misurare la distribuzione del valore finale, ossia del prezzo del prodotto pagato dai consumatori finali degli oli a marchio DOP, tra i diversi attori che contribuiscono all'ottenimento di questo prodotto. Lo studio di filiera ha evidenziato l'esistenza di due differenti modelli organizzativi. Il primo coinvolge un gruppo maggioritario di imprese specializzate in una singola attività produttiva (produzione delle olive, molitura o confezionamento) e coordinate principalmente attraverso il mercato: le imprese olivicole specializzate conferiscono il prodotto certificato ai frantoi privati oppure a oleifici cooperativi che

a loro volta riforniscono grandi imprese dedite prevalentemente o esclusivamente all'attività di confezionamento dell'olio. Il secondo comprende le imprese di confezionamento verticalmente integrate che integrano una o entrambe le attività produttive a monte (coltivazione e/o molitura delle olive). Per la ricostruzione della catena del valore sono state prese in esame due imprese dedite all'attività di confezionamento e rappresentative dei due modelli organizzativi. Entrambe le imprese sono localizzate nella sottozona Castel del Monte e producono olio DOP con la medesima menzione geografica. Il punto di partenza per la concreta applicazione del modello è stata l'individuazione delle specifiche attività generatrici di valore; successivamente si è proceduto ad individuare le determinanti di costo e ad assegnare i costi operativi alle diverse attività. Il metodo di rilevazione dei dati è stato quello dell'intervista diretta mediante questionario strutturato.

La prima impresa considerata è quella che abbiamo definito "specializzata" nell'attività di confezionamento dell'olio DOP. Essa rappresenta l'anello finale della catena di imprese coordinate attraverso il mercato. La sua principale attività di business è lo stoccaggio e il confezionamento di oli di oliva (DOP ma anche bio e convenzionale). L'approvvigionamento di olio DOP sfuso è effettuato sia presso oleifici cooperativi che presso frantoi privati. L'olio sfuso viene acquistato ad un prezzo variabile di anno in anno, in funzione dell'andamento del prezzo del prodotto convenzionale e con margine positivo a favore del prodotto DOP che si aggira intorno all'8-10%. L'azienda opera sul mercato dell'olio DOP sfuso e confezionato. La strategia aziendale per la commercializzazione del prodotto confezionato è orientata prevalentemente alla vendita di olio DOP etichettato come *private label* a imprese della GDO tedesca. La catena del valore è stata, pertanto, ricostruita con riferimento a questo tipo di prodotto e canale di vendita. La seconda impresa intervistata è quella che abbiamo denominato "integrata" perché si occupa sia della produzione delle olive che delle attività di molitura e confezionamento. L'azienda può contare, infatti, sulla produzione olivicola certificata DOP ottenuta dai circa 40 ettari di oliveti di proprietà, sulla presenza di un frantoio aziendale e di una linea di confezionamento. Oltre alla produzione olivicola aziendale, l'azienda si approvvigiona di olive DOP presso altre imprese agricole della zona. Essa opera oltre che sul mercato dell'olio DOP anche sui mercati convenzionale e bio. Dell'olio DOP prodotto in azienda solo una quota (circa il 30%) è commercializzata in forma confezionata, di cui una parte a marchio proprio (34%) e una parte a marchio di altre imprese industriali (66%). Per il prodotto a marchio proprio i canali di vendita sono essenzialmente 2: imprese estere di distribuzione al dettaglio (Giappone, Germania) e vendita diretta a consumatori finali (mercato nazionale). La catena del valore è stata costruita con riferimento al prodotto etichettato a marchio proprio e commercializzato sui mercati esteri.

Dal confronto della catena del valore (Porter, 1987) delle due imprese di confezionamento considerate sono emerse differenze significative: nella struttura dei costi, nei prezzi di vendita aziendali, nei prezzi di vendita al consumatore finale, nell'entità dei margini aziendali e dei margini ottenuti dalle imprese della distribuzione. Il costo totale del kg di olio confezionato è risultato più elevato nell'impresa integrata (4,65 €/Kg) rispetto a quella specializzata (3,94 €/Kg). Tale risultato è determinato dai maggiori costi che la prima sopporta per tutte le attività (attività operative, logistica, approvvigionamento, sviluppo della tecnologia e amministrazione), fatta eccezione per le attività di marketing. Tuttavia l'impresa integrata mostra una maggiore capacità di generare valore (prezzo di vendita al dettaglio) e di beneficiare della strategia di differenziazione adottata, mostrando un più ampio margine aziendale (20% del prezzo al dettaglio) rispetto all'impresa specializzata (4%). Ma sono le imprese di distribuzione ad appropriarsi della quota maggiore del valore finale creato e pari al 33% per il prodotto dell'impresa specializzata e al 45% per quello dell'impresa integrata.

In conclusione si può affermare che la capacità del marchio "Terra di Bari" di generare valore è diversificata secondo le due strategie organizzative interne alla filiera. I benefici ottenuti dalle

aziende olivicole che si occupano esclusivamente della produzioni di olive certificate DOP sono estremamente limitati e consistono in un premium price rispetto al prodotto convenzionale di entità trascurabile e nella creazione di una possibilità aggiuntiva per la collocazione del prodotto sul mercato. Soltanto una minoranza di imprese olivicole, di grandi dimensioni e che integrano l'attività di confezionamento, sono in grado di appropriarsi di un margine più elevato. Nonostante la rapida espansione della produzione commercializzata registrata negli ultimi anni, trainata principalmente dall'espansione della domanda da parte della GDO tedesca, non sembra aver avuto significative ricadute positive sulla redditività dell'olivicoltura. La crescita dell'offerta, in mancanza di adeguate forme di organizzazione e coordinamento dell'intera filiera produttiva ha determinato, invece, forti spinte competitive, in particolare tra le imprese specializzate nel confezionamento. Per conseguire una maggiore creazione di valore e una sua più equa distribuzione, in particolare a favore della fase agricola, è necessario intervenire sull'organizzazione dell'offerta e avviare attività di promozione collettiva capaci di dischiudere nuove e migliori opportunità di mercato.

## Conclusioni

La grave crisi finanziaria che ha colpito l'intera economia mondiale, divenuta poi crisi economica e sociale, ha determinato anche un crollo dei prezzi delle produzioni agricole e certamente il settore dell'olio di oliva appare tra quelli più colpiti dalla caduta delle quotazioni nei mercati all'origine. Questa situazione di mercato insieme alla accentuarsi della concorrenza, sia sui mercati nazionali che internazionali, sta mettendo ancora più in risalto, ed aggravando, i problemi di carattere strutturale e organizzativo che caratterizzano la filiera olivicola-olearia regionale. L'analisi dettagliata della sostenibilità economica delle diverse tipologie aziendali della fase agricola della filiera ha ben messo in evidenza le ragioni della "resistenza" di un certo numero di aziende di ridotte dimensioni che, tramite i meccanismi della cosiddetta "filiera corta" (vendita diretta) e l'utilizzazione di solo lavoro familiare, riescono ancora a garantire un ragionevole livello di redditività ad un lavoro familiare che, al di fuori dell'azienda, non avrebbe altre possibilità di valorizzazione economica. Al contrario, le aziende più collegate ai mercati, e soprattutto quelle di medie dimensioni collocate in territori marginali, appaiono incapaci di garantire soddisfacenti livelli di reddito con i prezzi attuali.

L'analisi delle fasi successive della filiera ha riproposto l'irrisolto problema della mancanza di informazioni e dati certi in ambito regionale sui livelli produttivi, articolati per qualità, e soprattutto sui flussi di produzione tra fasi successive della filiera. Manca anche qualsiasi informazione ufficiale sull'attività delle aziende che operano nella fase della miscelazione e confezionamento del prodotto, quella più rilevante dal punto di vista della valorizzazione delle produzioni regionali. Tutte informazioni che sono indispensabili per garantire un minimo di trasparenza ad un mercato che appare sempre più imprevedibile e concentrato nelle mani di pochi soggetti che godono di un crescente potere di mercato. La progressiva globalizzazione dei mercati e delle imprese che governano la filiera accresce, ancora di più che in passato, l'importanza strategica di strutture e organizzazioni realmente capaci di realizzare processi di integrazione verticale in modo efficace ed efficiente, garantendo la presenza degli olivicoltori anche nelle fasi in cui si genera maggiore valore aggiunto. Per fare ciò sono necessarie politiche in grado di creare o rafforzare il reticolo di servizi e strutture di supporto alle aziende olivicole che siano in grado di offrire alle imprese una gamma di servizi ormai indispensabili per migliorare la redditività aziendale, sia nella fase della produzione agricola, che nella trasformazione, come nella valorizzazione dei sottoprodotti. A questo riguardo appare utile e necessaria una sempre maggiore interazione tra mondo della ricerca e quello delle imprese. Ma ancora più importante appare la necessità di operare per rafforzare ed incoraggiare i rapporti

di collaborazione tra le imprese rompendo il circolo vizioso contraddistinto da un elevato tasso di concorrenza tra le imprese, bassa redditività delle stesse, basso tasso di investimenti e conseguente riduzione della capacità competitiva. In questa direzione appare orientato il nuovo PSR regionale (programmazione 2007-2013) che intende incoraggiare i rapporti di collaborazione tra imprese, sia in una logica di filiera che di progettualità territoriale. Ma tutti gli sforzi possono rivelarsi inutili senza l'introduzione e il rispetto rigoroso da parte di tutti i soggetti della filiera di chiare norme che disciplinino l'attività di ciascuna fase produttiva della filiera e soprattutto i rapporti tra di esse garantendo alla produzione agricola la giusta remunerazione del lavoro agricolo attraverso una equa distribuzione del valore generato lungo la filiera.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato realizzato nell'ambito del Progetto "Ricerca ed Innovazione per l'Olivicoltura Meridionale" (RIOM), finanziato dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali.

## Riferimenti bibliografici

- Cimino, O., De Gennaro, B. and Roselli, L. 2009. Capacità competitiva dell'olivicoltura biologica e adeguatezza delle politiche di sostegno. p. 189-194. In: Crescimanno, M. and Schifani, G. (eds.), *Agricoltura Biologica: sistemi produttivi e modelli di commercializzazione e di consumo*, Atti del IV Workshop GRAB-IT. Palermo, Italia 26-27 Oct.
- Databank 2007. Dati e analisi. *Olio di oliva*, Databank, Milano.
- De Gennaro, B., Notarnicola, B., Roselli, L. and Tassielli, G. 2012. Innovative olive-growing models: an economic and environmental assessment. *Journal of Cleaner Production*. 28:70-80.
- De Gennaro, B., Casieri, A., Cimino, O. and Roselli, L. 2010. Organizzazione e performance aziendali nella filiera olivicola - olearia pugliese. In: *Atti del Convegno internazionale e finale del Progetto Ricerca ed innovazione per l'Olivicoltura Meridionale (RIOM)*, F.lli Guido Arti Grafiche Edizioni, Rende (CS), p. 275-291.
- De Gennaro, B., Roselli, L. and Medicamento U. 2009. Il commercio internazionale degli oli di oliva italiani e pugliesi: un'analisi comparata. *Economia Agro-alimentare*.3:79-101.
- De Gennaro, B. 1996. La prima trasformazione. p. 61-94. In: De Meo, G. (eds.), *La filiera olivicolo-olearia in Puglia*, Puglia Grafica Sud, Bari.
- De Gennaro, B., Casieri, A. and Roselli, L. 2007. Struttura e competitività della filiera olivicola - olearia in Puglia. In: *Progetto RIOM, Sottoprogetto 1: OLIVICOLTURA - Relazioni sull'attività svolta nel primo anno del progetto RIOM - Tomo I*, F.lli Guido Arti Grafiche Edizioni, p. 249-298.
- De Gennaro, B. 2005. Olive e olio: un'analisi di filiera in Puglia. p. 163-212. In: Marengo, G. (eds.), *Lo sviluppo dei sistemi agricoli locali. Strumenti per l'analisi delle politiche*, Edizioni Scientifiche Italiane, Napoli.
- Porter, M. E. 1987. *Il vantaggio competitivo*. Edizioni di Comunità, Milano.
- Roselli, L., Casieri, A., De Gennaro, B. and Medicamento U. 2009. Olive oils protected by the EU geographical indications: creation and distribution of the value-adding within supply chains. *Proceeding of the 113th EAAE Seminar: A resilient European food industry and food chain in a challenging world*, Chania, Greece, 3-6 Sept.

# Il mercato mondiale delle olive da mensa: produzione, consumo e prospettive

B. Lanza

CRA-OLI Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia  
Città Sant'Angelo (PE)  
Italy

## Abstract

Table olives are greatly consumed mainly by Mediterranean Sea area populations and their consumption is expanding, due to the increasing popularity of the Mediterranean diet. In Italy, during the last three years, the average consumption of table olives was approximately 125.000 tonnes/year with a *pro-capite* assumption of 2.1 kg/year. The Italian production covers only 48% of the consumers demand, the remaining part is imported from Spain, Greece, Tunisia and Moroc. Among the over 500 varieties of *Olea europaea* on the national territory only a fraction is specifically suitable for processing as table olives. Italy is rich in typical table olive products, obtained by traditional methods, many of which have obtained or aspired to the recognition of trademarks (PDO, PGI, TAP).

**Keywords:** olive da tavola, DOP, prodotti agroalimentari tradizionali.

## Le olive da tavola nel mondo: consumi e produzione

Il consumo di olive da tavola a livello mondiale, negli ultimi 5 anni, ha fatto registrare un andamento in forte crescita (fonte COI novembre 2011), confermando tra i maggiori consumatori i paesi del bacino del Mediterraneo come l'Egitto (300.000 ton), la Turchia (290.000 ton), la Spagna (200.000 ton), l'Algeria (137.000 ton), l'Italia (125.000 ton) e la Siria (125.000 ton) e d'oltreoceano come gli USA (240.000 ton) e il Brasile (87.000 ton), ma anche mercati nuovi come la Russia (75.000 ton) e la Germania (72.000 ton). Per quanto riguarda la situazione Italiana, il 48% circa del consumo totale stimato è rappresentato da olive di produzione nazionale mentre il restante 52% è costituito da olive di importazione semilavorate o già confezionate, provenienti da Spagna, Grecia, Tunisia e Marocco, paesi che a detta degli operatori del settore assicurano qualità, disponibilità costante e buoni prezzi. Da fonti diverse e con larga approssimazione si può stimare che in Italia operino circa 300 industrie di trasformazione delle olive da mensa, di queste circa il 30% confeziona il prodotto. Nella maggioranza dei casi si tratta di imprese di ridotte dimensioni: circa il 60% degli impianti ha una potenzialità di lavorazione e di stoccaggio sotto i 2.000 quintali, mentre solo una percentuale intorno al 10% supera capacità maggiori di 5.000 quintali (fonte Unaprol 2012). Sono parecchi anni che si parla di rilancio dell'olivicoltura da mensa in Italia, ma non si sono registrati ancora significativi miglioramenti, per motivi che riguardano principalmente aspetti produttivi legati alla dispersione territoriale, allo scarso valore merceologico del prodotto lavorato, alla carenza organizzativa lungo l'intera filiera, alla cattiva organizzazione commerciale (oltretutto poco trasparente), ai modesti livelli produttivi. I dati relativi a produzione e consumi dimostrano che l'Italia, pur essendo uno dei principali Paesi consumatori, il secondo in ambito UE dopo la Spagna, attribuisce al settore olive da mensa un ruolo piuttosto marginale. Il quadro produttivo nazionale vede il ruolo

di Sicilia, Puglia e Calabria quali principali aree di produzione di olive da mensa: la Sicilia si attesta su una quota del 41%, mentre la Puglia rappresenta il 24.7% e la Calabria il 18%, raggiungendo complessivamente l'84% circa della produzione nazionale. La restante parte vede nell'ordine Sardegna (4.1%), Lazio (3.6%), Toscana (2%), Campania (1.9%), Abruzzo (1.9%), Marche (1.2%), Liguria (1.1%) e le altre regioni con produzioni <1% (fonte Istat maggio 2012).

Il settore delle olive da tavola rappresenta in Italia una realtà interessante per la presenza di varietà di pregio che hanno ottenuto riconoscimenti comunitari, come le Dop "Nocellara del Belice" (Reg. CE 134/1998 in G.U. Ce L 15/6 del 21.1.1998; cultivar *Nocellara del Belice*), "Bella della Daunia" (Reg. CE 1904/2000 in G.U. Ce L 228/57 dell' 8.9.2000; cultivar *Bella di Cerignola*) e "Oliva Ascolana del Piceno" (Reg. CE 1855/2005 in G.U. Ue L 297/5 del 15.11.2005; cultivar *Ascolana tenera*) (Tabella 1).

A livello nazionale, il Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, di concerto con le Regioni, ha attivato gli strumenti necessari a salvaguardare i suoi prodotti tradizionali, tra cui anche molte olive da tavola, conservandone le metodiche tradizionali di produzione, ricchezza dell'agricoltura e della cultura italiana, assicurando nel contempo ai consumatori le necessarie condizioni di igiene e sicurezza alimentare. Ha così istituito un Elenco Nazionale dei Prodotti Agroalimentari Tradizionali (D.M. 18 luglio 2000; XII Revisione del 7.6.2012 pubblicata in G.U.R.I. n.142 del 20.6.2012, supplemento ordinario n.124) (Tabella 2).

## Strategie per il rilancio

Si tratta di un patrimonio di alto valore che però non riesce a trovare adeguata collocazione sul mercato. Inoltre, è un settore che soffre in modo particolare la vicinanza con il settore dell'olio di oliva, che assorbe la quasi totalità dell'attenzione sia delle politiche sia degli interventi. Soltanto recentemente, con la separazione delle olive da tavola nell'ambito dell'OCM e la sua introduzione come settore specifico negli interventi previsti da molti Programmi di sviluppo regionali, si può registrare una inversione di tendenza. Tuttavia, lo sviluppo del settore è legato alla possibilità di valutarne la dinamica dei principali fattori di natura socio-strutturale ed economica che lo caratterizzano e che rendono il prodotto nazionale poco competitivo rispetto a quello estero. Tali fattori sono:

- un'eccessiva polverizzazione dell'offerta. In Italia si utilizzano molte varietà di olive ed i metodi di lavorazione sono differenti a seconda del luogo di produzione. Questo è sicuramente un pregio, in quanto esprime un patrimonio culturale che caratterizza la nostra società alimentare; diventa un elemento negativo nel momento in cui l'offerta finale su scala nazionale risulta, anche a causa della bassa dimensione media delle aziende olivicole, incapace di garantire una massa critica minima; a ciò si aggiungono i problemi relativi alla mancata standardizzazione del prodotto;
- la mancata concentrazione dell'offerta non consente di garantire al produttore redditi tali da consentirgli le necessarie soddisfazioni economiche, a fronte degli investimenti di capitale e di lavoro che la coltivazione richiede;
- la forte utilizzazione di varietà a duplice attitudine rallenta lo sviluppo di un'olivicultura da mensa specializzata nei territori vocati;
- inadeguatezza dell'industria di trasformazione. E' dovuta a cause diverse: modeste dimensioni degli impianti, tecnologie di lavorazione obsolete, confezionamento del prodotto non sempre rispondente agli standard richiesti dal mercato;
- limitata attenzione degli operatori verso il settore. Se si escludono gli ultimi anni, in Italia sono mancate azioni strategiche finalizzate alla riqualificazione del settore, attraverso misure mirate al riordino produttivo, alla riduzione della frammentazione colturale, alla valorizzazione e promozione della produzione.

L'apertura progressiva dei mercati richiede la definizione di regole per una leale concorrenza, in grado di fare emergere le peculiarità degli alimenti che, pur avendo un elevato indice di somiglianza, differiscono in realtà significativamente nei loro requisiti impliciti che concorrono a determinare la qualità globale di un'offerta. A livello mondiale, gli standard commerciali internazionali e di sicurezza, sono oggetto di negoziati e accordi e parallelamente a livello comunitario nuove norme vengono adottate oltre che per l'Organizzazione Comune di Mercato, per i temi emergenti della sicurezza alimentare e per la tutela del consumatore attraverso una leale informazione documentata che accompagna gli alimenti e che parte dalla loro etichettatura. Sul piano nazionale, l'intervento pubblico tende a promuovere un andamento disciplinato del mercato, tutelare e promuovere la qualità del prodotto, dei processi e dell'ambiente nelle diverse fasi del ciclo agroalimentare, valorizzare le vocazioni territoriali distinguendo la provenienza dei prodotti, favorire il riequilibrio delle relazioni tra le imprese della filiera agroalimentare, ridurre le asimmetrie informative esistenti nel ciclo produttivo ed assicurare al consumatore informazioni in grado di consentirgli acquisti consapevoli. Con l'adozione del recente Regolamento EU 1169/2011, l'etichettatura nutrizionale diventerà obbligatoria (il termine ultimo per mettersi in regola è fissato per il 13 dicembre 2016). Le indicazioni nutrizionali riportate in etichetta consentiranno al consumatore di identificare un alimento e di effettuare scelte adatte alle esigenze dietetiche individuali, prevenendo rischi di allergie o intolleranze.

Di fronte alla crescente sensibilità dei consumatori nei confronti della sicurezza alimentare e alla necessità per il produttore di valorizzare la qualità, il sistema di rintracciabilità diventa un potente strumento competitivo per le filiere perchè fornisce alle produzioni agroalimentari un'identità legata al territorio e al produttore. Le filiere possono avere dimensioni diverse a seconda del numero di attori che vi partecipano e delle trasformazioni sia fisiche, sia temporali, sia infine spaziali che il prodotto agricolo subisce per raggiungere il consumatore. L'incremento del numero e delle tipologie di prodotti alimentari, nonché la diversificazione dei canali distributivi, stanno portando ad ulteriori allungamenti delle filiere ma soprattutto alla presenza, all'interno di uno stesso comparto, di un numero piuttosto elevato di microfiliere, nelle quali i comportamenti degli attori delle varie fasi possono essere molto diversi creando delle vere e proprie barriere all'ingresso e all'uscita dalla singola filiera. Nel caso delle olive da tavola, il prodotto, per giungere al consumatore, passa per un numero piuttosto elevato di fasi che possono essere controllate da operatori diversi. Facciamo un esempio concreto: in Italia non tutta la materia prima "olive" viene prodotta dagli olivicoltori italiani perchè una parte viene importata da Paesi terzi. Vi è poi una fase di prima trasformazione che è quella del "semilavorato" e che solo nel caso di grandi gruppi è internalizzata dall'impresa di seconda trasformazione. La produzione vera e propria avviene all'interno degli impianti di seconda trasformazione che, tuttavia, difficilmente ne controllano direttamente la distribuzione. Dagli stabilimenti, quindi, le olive raggiungono i grossisti/piattaforme di distribuzione e successivamente il distributore e quindi il consumatore. Poiché parte della produzione nazionale viene esportata, vi è un'ulteriore fase che è quella della spedizione e trasporto nei Paesi destinatari. Non possiamo che auspicarci l'affermazione della "filiera corta" (azienda agricola e/o di trasformazione > consumatore), conciliando le nuove tecnologie con la tradizione e l'identità del territorio!

### Bibliografia citata:

<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>

<http://www.unaprol.it/images/stories/Lo%20Scenario%20Economico%20di%20Settore%202012.pdf>

<http://agri.istat.it/jsp/dawinci.jsp?q=p1C270000010000013000&an=2011&ig=1&ct=311&i-d=15A|21A|32A>

Tabella 1. Olive da tavola DOP e IGP nel mondo.

<b>Paese</b>	<b>DOP e IGP</b>	<b>Cultivar</b>
<b>Italia</b>	Nocellara del Belice	<i>Nocellara del Belice</i>
	La Bella della Daunia	<i>Bella di Cerignola</i>
	Oliva Ascolana del Piceno	<i>Ascolana tenera</i>
<b>Francia</b>	Olives cassées de la Vallée des Baux-de-Provence	<i>Salonenque/Berugnette</i>
	Olive de Nice	<i>Cailletier</i>
	Olive noires de la Vallée des Baux-de-Provence	<i>Grossane</i>
	Olives noires de Nyons	<i>Tanche</i>
<b>Grecia</b>	Konservolia Amfissis	<i>Konservolia</i>
	Konservolia Artasd (IGP)	<i>Konservolia</i>
	Konservolia Atalantis	<i>Konservolia</i>
	Konservolia Piliou Volou	<i>Konservolia</i>
	Konservolia Rovion	<i>Konservolia</i>
	Konservolia Stylidas	<i>Konservolia</i>
	Throumpa Ampadias Rethymnis Kritis	<i>Throumpa</i>
	Throumpa Chiou	<i>Throumpa</i>
	Throumpa Thassou	<i>Throumpa</i>
	Elia Kalamata	<i>Kalamata</i>
<b>Spagna</b>	Aceituna Aloreña de Malaga	<i>Aloreña</i>
<b>Portogallo</b>	Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Major	<i>Azeiteira/Conseroa/ Carrasquenha/Retondil</i>
	Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo	<i>Negrinha</i>
<b>Turchia</b>	Gemlik zeytini	<i>Gemlik</i>

Tabella 2. Olive da tavola come Prodotti Agroalimentari Tradizionali.

<b>Regione</b>	<b>Prodotto</b>	<b>Cultivar</b>
<b>Sicilia</b>	oliva nebba, oliva nera passuluni	Nocellara del Belice
<b>Calabria</b>	olive alla calce, olive in salamoia, olive nella giara, olive nere infornate, olive schiacciate, olive sotto sale	Carolea, Tonda di Strongoli, Cassanese, Borgese
<b>Basilicata</b>	olive nere secche, oliva da forno di Ferrandina	Majatica
<b>Puglia</b>	oliva da mensa (mele di bitetto, ualie dolce), olive cazzate o schiacciate, olive celline di Nardò in concia tradizionale - olive in concia (ciline alla capàsa - volie alla capàsa), olive in salamoia, olive verdi, Peranzana da mensa di Torremaggiore	Termite di Bitetto, Ogliarola leccese, Bella di Cerignola, Cellina di Nardò, Peranzana
<b>Campania</b>	olive pisciottane schiacciate sott'olio, oliva caiaz-zara, oliva vernacciola di Melizzano	Pisciottana, Caiazzana, Vernacciola
<b>Lazio</b>	olive da mensa bianche e nere (olive calce e cenere, olive di Gaeta, oliva bianca di Itri, olive al fumo, olive sott'olio, olive spaccate e condite, olive in salamoia, olive essiccate), pestato di olive di Gaeta	Itrana, Carboncella
<b>Abruzzo</b>	olive Intosso (olive n'dosse, olive in salamoia)	Intosso
<b>Molise</b>	olive al naturale (live curvate, olive all'acqua e sale)	Sperone di gallo, Olivone, Olivoncello, Leccino
<b>Marche</b>	olive nere marinate (olive nere strinate), salsa di olive	Raggiola, Raggia, Piantone di Falerone, Leccino
<b>Toscana</b>	olive in salamoia	Leccino, Frantoio
<b>Liguria</b>	olivo taggiasca	Taggiasca
<b>Sardegna</b>	olive a scabecciu, olive verdi in salamoia	Tonda di Cagliari, Pizz'e Carroga



# Analytical and organoleptic parameters for the differentiation of olive oils According to the areas of origin, healthy and nutritional properties

C. Benincasa, E. Romano, M. Pellegrino, E. Perri

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), C.da Li Rocchi, 87036 Rende (CS), Italy

## ABSTRACT

The market for premium priced foods has increased dramatically over recent years, as consumers become ever more aware of products originating from around the world. There are many food products that are of superior quality (taste, texture, fragrance) because of the locale in which they are cultivated. Environmental conditions, such as local climate and soil characteristics, combine to yield crops that exhibit specific traits. Olive oil is a commodity for which high value is attached to the region of its origin. In Italy, higher prices can be asked for extra-virgin olive oils depending on the region of origin. Recently, the European law (EC Reg. 182/2009) requires the indication of the geographical origin for all extra-virgin olive oils, irrespective than protected denomination of origin (PDO) and/or protected geographic indication (PGI) of origin. Therefore, in the last few years attention has been focused on authentication methods for the geographical origin of olive oils.

In this work, a review of some analytical methods applied to assess and investigate the quality of selected olive oils produced in areas with different climatic and geological characteristics is presented. All data obtained by analyzing the methyl esters of fatty acids, trace element profiles and carbon isotope ratios were treated by means of proper chemometric procedures.

**Keywords:** olive oil, traceability, phenols, isotopes ratio analysis, methyl esters fatty acids, chemometric analysis

## Introduction

The increase in the demand for high-quality olive oils has led to the appearance in the market of olive oils elaborated with specific characteristics. Regulation 2081/92 promotes and protects food products creating the systems known as: Protected Designation of Origin (PDO); Protected Geographical Indication (PGI) and "Traditional Speciality Guaranteed" (TSG). The introduction of certifications of origin and quality for virgin olive oil as PDO makes necessary the implementation of traceability procedures. Any research dealing with olive oil traceability is focused on investigating the botanical or geographical origin (Perri et al., 2012).

Among the components of olive oil, fatty acid profiles are extremely useful for characterization and discrimination of an olive cultivar or its geographical location (Aparicio and Aparicio-Ruiz, 2000; Vichi et al., 2003; Lopez Ortiz et al., 2006; Temime et al., 2006; Canabate-Diaz et al., 2007; Cavaliere et al., 2007; Haddada et al., 2007; Lazzez et al., 2008).

Stable isotope techniques, also, enable differentiation of chemically identical substances through alterations in their isotopic fingerprint, and have been used in authenticity studies for many food products (Camin et al., 2007; Rapisarda et al., 2010).

Multi-element concentration profiles is very useful in the determination of food authenticity, either alone or in combination with chromatographic or stable isotope ratio data (Benincasa et al., 2007; 2012; Gharsallaoui et al., 2011; Martin et al., 1999; Latorre et al., 2000; Rebolo et al., 2000).

In this review, some researches performed at CRA-OLI located in Rende (CS) under the project "Riom" and "Riom additinal funds", designed to create and validate analytical methods for the characterization of the origin of extra virgin olive oils are presented. The aim of all the studies was to investigate if selected olive oils produced in areas with different climatic and geological characteristics could be discriminated on the basis of the chosen analytical methods.

## Materials and methods

The olive oils analysed during the research activities were both produced in situ (CRA-OLI), or from Italy and abroad. Olive oil samples were of extra virgin type obtained from a single variety or a blend of different cultivars. They were produced in situ and from commerce and farming source.

*Methyl ester of fatty acids (FAMES)* were determined according the Official methods of analysis stated by the European Regulation (UE Reg. 61/2011). Briefly, after performing an alkaline treatment (Christie, 1998), FAMES were analysed by gas chromatography. The identification of the peaks were achieved by comparing their retention times with those of authentic reference compounds.

*Carbon isotope ratio analysis* were conducted by means of a Delta V plus (ThermoFinnigan, Bremen, Germany). Samples were analyzed by combustion in a Flash EA 2000 Series elemental analyzer. In this method, the olive oil was directly placed into a silver capsules and then dropped into a temperature conversion/elemental analysis (TC/EA) generating the product gases. These gases (CO, H<sub>2</sub>) are separated using a gas chromatograph, sent to an open split interface and then to the Isotope ratio mass spectrometer (IRMS) for analysis (TC/EA-IRMS). The isotopic values were calculated using urea as standard calibrated with the international reference materials (potassium nitrate USGS 34 and ammonium sulfate IAEA-N-1-International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria).

*Multielement analysis* were carried out using the following system for the microwave digestion: Milestone MLS-1200 MEGA oven with programmable power control; segmented rotor MPR-600/10M. The determination of the elements of interest was carried out utilizing an Elan DRC-e ICP-MS instrument (Perkin-Elmer SCIEX, Canada). Oil samples were introduced by means of a quartz nebulizer. The ICP torch was a standard torch (Fassel type torch) with platinum injector.

All data collected were subsequently statistically processed through PCA (principal component analysis), LDA (linear discriminant analysis) and ANOVA (analysis of variance) using "StatGraphics 5 plus".

## Results and discussion

*Methyl ester of fatty acids (FAMES)*. From the results obtained, analysing 577 olive oils becoming from the northern and the southern hemisphere produced during the crop years 2006/2011, it was evidenced that the oleic acid content was higher in oils coming from the southern hemisphere (74-77%) as well as the ratio of unsaturated-saturated (5.4-6.2). The ratio of oleic-linoleic acid was higher in the oils of the southern hemisphere (8.7-12) as well as the content of palmitic acid (11-13%). Linoleic acid is rather higher in the oils of the northern hemisphere (6.3-19.4%). The plot of the discriminant functions (Fig. 1) obtained by LDA showed a clear discrimination between the olive oils under investigation.

*Carbon isotope ratio analysis.* The aim of this research was to classify, by a chemometric approach, Italian virgin olive oils whose geographic origin was authenticated by levies specifically made in the areas of origin (Calabria, Puglia, Umbria, Basilicata, Abruzzo) (Fabroni et al., 2011). Virgin olive oils cv. "Carolea", "Coratina", "Leccino" and "Frantoio", sampled in two years (2009-2010; 2010-2011) in Bari (BA), Cosenza (CS), Catanzaro (CZ), Matera (MT), Pescara (PE) and Perugia (PG) districts, have been analysed respect to the standard quality parameters (Jaen index, % fat, dry matter, umidity, % fat in dry matter, acidity, peroxide No.,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$ ,  $\Delta K$  and fatty acids methyl esters profile) and the  $\delta^{13}C$ . Then the collected data have been statistically processed through LDA. In particular, by Function 1 it was possible to discriminate olive oils sampled in the PG district from those sampled in the PE district and in the southern Italy, while by Function 2 it was possible to discriminate olive oils sampled in the PE district from those sampled in CS, CZ, MT and BA districts (Fig. 2). These latter, from the southern Italy, were classified into overlapped and thus not discriminable groups. In conclusion, the joint use of chemical and isotopic markers has revealed that 98.8% of cases have been correctly classified, showing a clear discrimination between olive oils from the south of Italy (Calabria, Basilicata, Puglia) from those of northern origin (Umbria, Abruzzo).

*Multielement analysis.* In this work the use of treated wastewater (TWW) to irrigate olive plants was monitored (Benincasa et al., 2012). This type of water is characterized by high salinity and retains a substantial amount of trace elements, organic and metallic compounds that can be transferred into the soil and into the plants and fruits. In order to evaluate the impact of TWW on the overall quality of the oils, the time of contact of the olives with the soil has been taken into account. Multi-element data were obtained using ICP-MS. Nineteen elements (Li, B, Na, Mg, Al, K, Ca, Sc, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Mo, Ba and La) were submitted for statistical analysis. Using analysis of variance, linear discriminant analysis and principal component analysis it was possible to differentiate between oils produced from different batches of olives whose plants received different types of water (Fig. 3). Also, the results showed that there was correlation between the elemental and mineral composition of the water used to irrigate the olive plots and the elemental and mineral composition of the oils.

## Acknowledgements

This research work was supported under research projects QUASIORA, GERMOLI and RIOM additional funds.

## Citations and Literature Cited

Aparicio, R. and Aparicio-Ruiz, R. 2000. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881 (1-2): 93-104, ISSN 0021-9673.

Benincasa, C., Gharsallaoui, M., Perri, E., Briccoli Bati, C., Ayadi, M., Khlif, M. and Gabsi, S. 2012. Quality and Trace Element Profile of Tunisian Olive Oils Obtained from Plants Irrigated with Treated Wastewater. *The ScientificWorld Journal*, vol. 2012, Article ID 535781, 11 pages doi:10.1100/2012/535781.

Benincasa, C., Lewis, J., Perri, E., Sindona, G. and Tagarelli, A. 2007. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis, *Analytica Chimica Acta*, 585: 366-370.

Camín, F.; Moschella, A.; Miselli, F.; Parisi, B.; Versini, G.; Ranalli, P.; Bagnaresi, P. Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic versus conventional regime. *J. Sci.*

Food Agric. 87: 1330–1336.

Canabate-Diaz, B., Segura Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martinez Vidal, J. L., & Duran Martos, J. (2007). Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*, 102 (3): 593-598, ISSN 0308-8146.

Cavaliere B., De Nino A., Hayet F., Lazez A., Macchione B., Moncef C., Perri E., Sindona G., Tagarelli A. 2007. A metabolomic approach to the evaluation of the origin of extra virgin olive oil: a conventional statistical treatment of mass spectrometric analytical data. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1454-1462.

Christie, W.W., 1998. The preparation of derivatives of fatty acids. In: *Gas Chromatography and Lipids*. The Oily Press, Ayr, Scotland, pp. 64–84.

Council Regulation (EEC) No. 2081/92 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Off. J. European Union* 1992, L 208, 1–15.

Fabroni, S., Benincasa, C., Muzzalupo, I., Rapisarda, P., Romano, E. and Perri, E. 2011. Classificazione chemiometrica di oli di oliva vergini di provenienza nazionale mediante markers isotopici e chimici. II Convegno Nazionale dell'olivo e dell'olio. Perugia, Italy 21-23 September. p. 115.

Gharsallaoui, M., Benincasa, C., Ayadia, M., Perri, E., Khelif, M. and Gabsi, S. 2011. Study on the impact of wastewater irrigation on the quality of oils obtained from olives harvested by hand and from the ground and extracted at different times after the harvesting *Scientia Horticulturae*, 128: 23–29.

Haddada, F. M., Manai, H., Daoud, D., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., & Zarrouk, M. (2007). Profiles of volatile compounds from some monovarietal Tunisian virgin olive oils. Comparison with French PDO. *Food Chemistry*. 103 (2): 467- 476, ISSN 0308-8146

Latorre, M.J. Pena, R. Garcia S. and Herrero, C. 2000. *Analyst*, 125: 307.

Lazzez, A., Perri, E., Caravita, M. A., Khelif, M., and Cossentini, M. 2008. Influence of Olive Maturity Stage and Geographical Origin on Some Minor Components in Virgin Olive Oil of the Chemlali Variety. *J. Agric. Food Chem.* 56: 982–988.

Lopez Ortiz, C. M., Prats Moya, M. S., & Berenguer Navarro, V. 2006. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of  $\beta$ -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19 (2-3): 141-149, ISSN 0889-1575.

Martín, G.J., Mazure, M., Jouitteau Martin, Y-L., Anguile, L. and Allain, P. 1999. Characterization of the geographic origin of Boudreaux wines by a combined use of isotopic and trace element measurements. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 409 - 417.

Perri, E., Benincasa, C. and Muzzalupo, I. 2012. Olive Oil Traceability in Olive Germplasm - The Olive Oil Industry in Italy. In press.

Rapisarda, P., Camin, F., Fabroni, S., Perini, M., Torrisi, B. and Intrigliolo, F. 2010. Influence of Different Organic Fertilizers on Quality Parameters and the  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ , and  $\delta^{18}\text{O}$  Values of Orange Fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Agric. Food Chem.* 58: 3502–3506.

Rebolo, S. Pena, R.M. Latorre, M.J. Garcia, S. Botana, A.M. and Herrero, C. 2000. Characterisation of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra wines using pattern recognition techniques. *Anal. Chim. Acta.* 417: 211 - 220.

Temime, S. B., Campeol, E., Cioni, P. L., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2006). Volatile compounds from Chétoui olive oil and variations induced by growing area. *Food Chemistry*. 99 (2): 315-325, ISSN 0308-8146.

UE Reg. 61/2011.

Vichi, S.; Pizzale, L.; Conte, L. S.; Buxaderas, S.; Lopez-Tamames, E. 2003. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6572-6577.

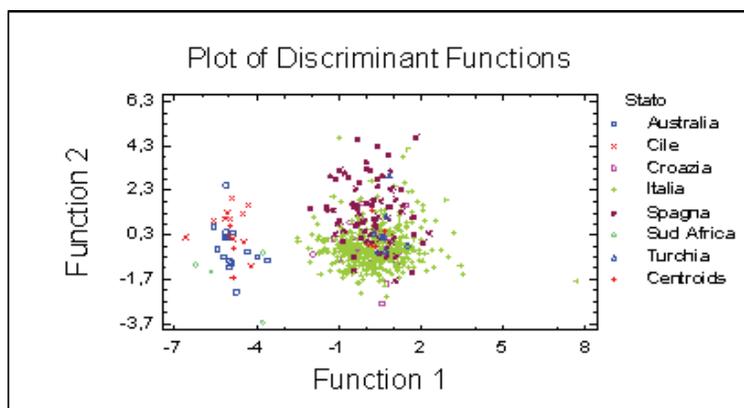


Fig. 1. Plot of discriminant functions obtained by analyzing 577 olive oils, considering the methyl esters of fatty acids as independent variables and the area of origin as category. The samples correctly classified were 62.05%

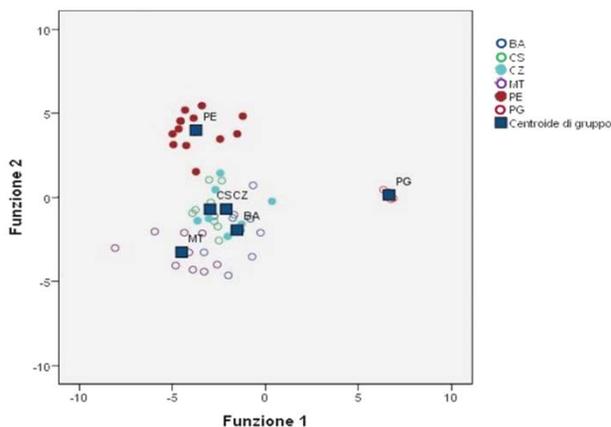


Fig. 2. Plot of discriminant functions obtained by analyzing 50 olive oils, considering all the standard quality parameters and the  $\delta^{13}\text{C}$  as independent variables and the area of origin as category. The samples correctly classified were 98.8%.

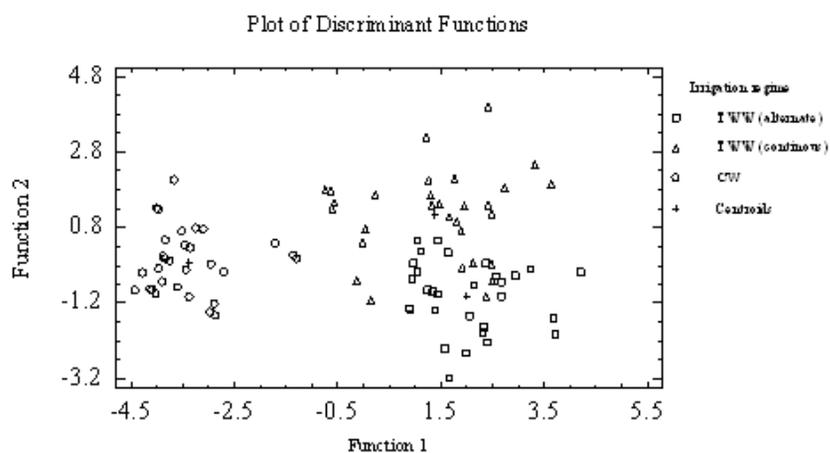


Fig. 3. Plot of discriminant functions obtained by analyzing 90 olive oil samples based on the concentration of 19 elements and using as input a priori three groups, i.e. those corresponding to the irrigation regimes: alternate and continuous using TWW and CW.

# Oleuropein olive oil compound in acute and chronic inflammation models: facts and perspectives

D. Britti, D. Impellizzieri, A. Procopio, S. Cuzzocrea

Prof. Domenico Britti, Department of Health Sciences, University of Catanzaro, Viale Europa, Campus "Salvatore Venuta" Germaneto - 88100 Catanzaro Italy; Tel.: +39 0961 369 4283; Fax: + 39 0961 369 5031; Email: britti@unicz.it

Dr. Daniela Impellizzieri, Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology, School of Medicine, University of Messina, Torre Biologica - Policlinico Universitario Via C. Valeria - Gazzi - 98100 Messina Italy; Tel.: +39 090 2213644, Fax: +39 090 2213300; Email: dimpellizzieri@unime.it

Prof. Antonio Procopio, Department of Health Sciences, University of Catanzaro, Viale Europa, Campus "Salvatore Venuta" Germaneto - 88100 Catanzaro Italy; Tel.: +39 0961 369 4120; Fax: + 39 0961 369 5031; Email: procopio@unicz.it

Prof. Salvatore Cuzzocrea, Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology, School of Medicine, University of Messina, Torre Biologica - Policlinico Universitario Via C. Valeria - Gazzi - 98100 Messina Italy; Tel.: +39 090 2213644, Fax: +39 090 2213300; Email: salvator@unime.it

## Abstract

The regular consumption of olive oil has been suggested to be one of the factors associated with a lower incidence of several disease in Mediterranean countries. A group of olive oil phenolic compounds, such as oleuropein has attracted considerable attention because of its antioxidant activity, anti-atherosclerotic and anti-inflammatory properties. We illustrate the effects of oleuropein aglycone (3,4-DHPEA-EA), a hydrolysis product of oleuropein, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy (acute inflammation model) and on the modulation of the inflammatory response in mice subjected to collagen-induced arthritis (CIA) (chronic inflammation model).

*Acute inflammation model.* Mice were anaesthetized and subjected to a skin incision at the level of the left sixth intercostal space. The underlying muscle was dissected and saline or saline containing 2%  $\lambda$ -carrageenan was injected into the pleural cavity. Injection of carrageenan elicited an acute inflammatory response characterized by: infiltration of neutrophils in lung tissues and subsequent lipid peroxidation, increased production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ , increased expression of adhesion molecules, increased synthesis of nitric oxide, nitrotyrosine and poly-ADP-ribose. Administration of 3,4-DHPEA-EA 30 min after the challenge with carrageenan, caused a significant reduction of all the parameters of inflammation measured.

*Chronic inflammation model.* CIA was induced in mice by an intradermally injection of 100  $\mu$ l of the emulsion (containing 100  $\mu$ g of bovine type II collagen) (CII) and complete Freund's adjuvant (CFA) at the base of the tail. On day 21, a second injection of CII in CFA was administered. Mice developed erosive hind paw arthritis when immunized with CII in CFA. Macroscopic clinical

evidence of CIA first appeared as peri-articular erythema and edema in the hind paws. The incidence of CIA was 100% by day 27 in the CII challenged and the severity of CIA progressed over a 35-day period with a resorption of bone. The histopathology of CIA included erosion of the cartilage at the joint. Treatment with 3,4-DHPEA-EA starting at the onset of arthritis (day 25), ameliorated the clinical signs at days 26-35 and improved histological status in the joint and paw. The degree of oxidative and nitrosative damage was significantly reduced in 3,4-DHPEA-EA - treated mice as indicated by elevated expression of inducible oxide nitric synthase (iNOS), nitrotyrosine and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). Plasma levels of the pro-inflammatory cytokines were also significantly reduced by 3,4-DHPEA-EA.

#### Conclusions:

In the mammal body the normal production of oxidants is counteracted by several antioxidative mechanisms. Food constituents are the normal substrate for energy generation but a hypercaloric diet may result in higher production of oxidants thus inducing oxidative stress. Epidemiological studies have shown that populations consuming a predominantly olive oil-based Mediterranean-style diet exhibit lower incidences of various diseases. In our study, we confirm that habitual intakes of olive oil provide a continuous supply of antioxidants and anti-inflammatory substances which may be protective in acute and chronic inflammation.

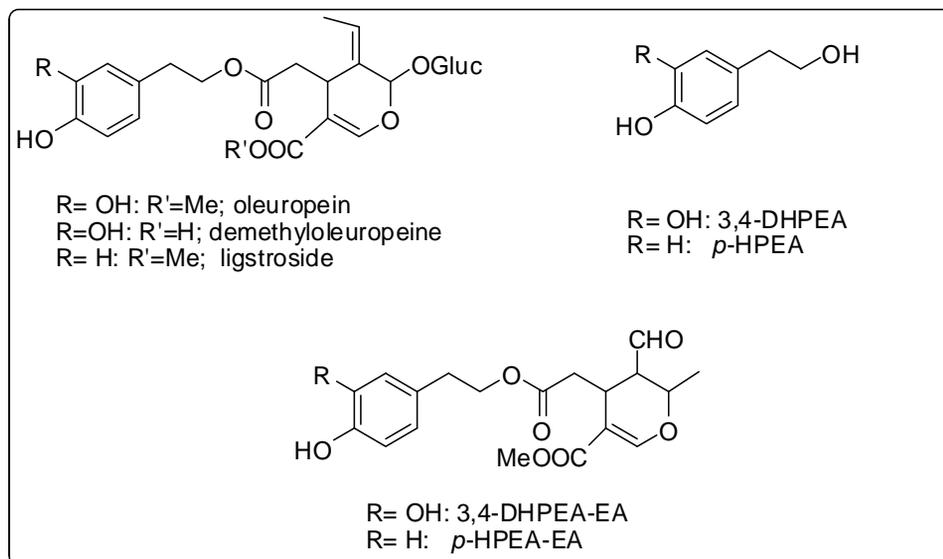
## Introduction

A large mass of research has been accumulating to provide evidence for the health benefits of olive oil feeding and to scientifically support the widespread adoption of traditional Mediterranean diet as a model of healthy eating (Menendez et al., 2007).

This evidence has been attributed to the fact that olive oil, the predominant source of fat in the Mediterranean diet (Petroni et al. 1995), contains several minor non-nutrients chemicals such as  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols and  $\beta$ -carotene, phytosterols, pigments, terpenic acids, flavonoids such as luteolin and quercetin, squalene, and phenolic compounds, usually and incorrectly termed polyphenols (Menendez et al., 2007; Trichopoulou et al., 2003; , 348: 2599-2608; Visioli et al., 2002; Tripoli et al., 2005; Serviliet al., 2004).

The main phenolic compounds in virgin olive oil are secoiridoid derivatives of 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol (3,4-DHPEA) and 2-(4-hydroxyphenyl)-ethanol (*p*-HPEA) that occur as either simple phenols or esterified with elenolic acid to form, respectively, oleuropein and its derivative demethyloleuropein, and ligstroside, their aglycones 3,4-DHPEA-EA and *p*-HPEA-EA (Figure 1). (Bendini et al., 2007; Suárez et al., 2009).

The aglyconic form of oleuropein and ligstroside, 3,4-DHPEA-EA and *p*-HPEA-EA respectively, were reported for the first time by Montedoro et al, who also assigned their chemical structures, later confirmed by other (Montedoro et al., 1992; Angerosa et al. 1996; Owen et al., 2000). 3,4-DHPEA-EA and *p*-HPEA-EA, associated to the intense sensory of bitterness and pungency respectively attribute in VOO (Gutierrez-Rosales et al. 2003), is endowed with numerous beneficial effects on human health (Esti et al., 1998; Della Ragione et al., 2000; Paiva-Martins and Gordon 2001; Fabiani et al., 2002; Serviliet al., 2004; Carasco-Pancorbo et al., 2005; Artajo et al., 2006; Fabiani et al., 2006; Bendini et., 2007; Fabiani et al., 2008; Paiva-Martins et al., 2009).



**Figure 1** - Chemical structures. Oleuropein, ligstroside and their derivatives: 3,4-dihydroxyphenylethanol (3,4-DHPEA), *p*-hydroxyphenylethanol (*p*-HPEA), 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid (3,4-DHPEA-EA),

In particular, the anti-inflammatory properties of olive oil phenolic compounds seem to overlap with those attributed to non-steroidal anti-inflammatory drugs. (Procopio et al, 2009).

The majority of phenolic compounds found in olive oil or table olives are derived from the hydrolysis of oleuropein, the major phenolic constituent of the leaves and unprocessed olive drupes of *Olea europaea* and responsible for the bitter taste of immature and unprocessed olives. Concentrations of up to 9 mg/l of Ole and 5.6 mg/l of its hydrolysis product hydroxytyrosol, have been detected in some preparations of olive oil (Montedoro et al., 1992).

Oleuropein, a glucoside with hydroxyaromatic functionality, has recognized several pharmacological properties including antioxidant, anti-inflammatory, anti-atherogenic, anti-cancer, antidiabetic, antimicrobial, and antiviral, and for these reasons, it is commercially available as food supplement in Mediterranean countries (Miles et al., 2005; Covas MI, 2008; Omar SH, 2010).

A more efficient anti-inflammatory role of the aglyconic 3,4-DHPEA-EA compared with the glycosidic form of oleuropein possibly derives from the greater lipophilicity of the former, a property that should allow better cell membrane incorporation and/or interaction with other lipids (Saija et al., 1998).

We focused on the anti-inflammatory properties of 3,4-DHPEA-EA, a hydrolysis product obtained from Oleuropein by the action of  $\beta$ -glucosidase on the parent glucoside, has been evaluated in a mice model of acute inflammation (carrageenan-induced pleurisy) and in a mice model of chronic inflammation (collagen-induced arthritis) (Impellizzeri et al, 2011a; Impellizzeri et al, 2011b).

### 3,4-DHPEA-EA and Acute inflammation

#### Premise

The inflammatory reaction is characterized by an initial increase in blood flow to the site of injury, enhanced vascular permeability, production of mediators such as prostaglandins, leukotrienes,

histamine, bradykinin, platelet-activating factor (PAF) and the ordered and directional influx and selective accumulation of different effector cells from the peripheral blood at the site of injury. Influx of antigen non-specific but highly destructive cells (neutrophils) is one of the earliest stages of the inflammatory response.

Carrageenan-induced local inflammation is commonly used to evaluate anti-inflammatory effects of non-steroidal drugs (NSAIDs). Therefore, carrageenan-induced local inflammation (pleurisy) is a useful model to assess the contribution of mediators involved in cellular alterations during the inflammatory process.

In particular, the initial phase of acute inflammation (0-1h) which is not inhibited by NSAIDs such as indomethacin or aspirin, has been attributed to the release of histamine, 5-hydroxytryptamine and bradykinin, followed by a late phase (1-6h) mainly sustained by prostaglandin release and attributed to the induction of inducible cyclo-oxygenase (COX-2) in the tissue. (Nantel et al, 1999). It appears that the onset of the carrageenan-induced acute inflammation has been linked to neutrophil infiltration and the production of neutrophil-derived free radicals, such as hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical, as well as the release of other neutrophil-derived mediators.

Free radicals are produced in small amounts by normal cellular processes as part of the mitochondrial electron transport chain and the microsomal cytochrome P-450 system. They are formed during traumatic or hypoxic injuries as a consequence of insufficient oxygenation. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) can react with and subsequently damage proteins, nucleic acids, lipids, and extracellular matrix proteins. During the inflammatory response, ROS and RNS modulate phagocytosis, secretion, gene expression, and apoptosis. Indeed, under pathological circumstances such as acute lung injury and sepsis, excess production of neutrophil-derived ROS and RNS may influence neighbouring endothelial or epithelial cells, contributing to the amplification of inflammatory tissue injury. (Fialkow et al, 2007). Furthermore, oxidative stress elicits the activation of the redox-sensitive transcription factors such as nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and AP-1, that play a central and crucial role in inducing the expression of inflammatory cytokines and intercellular adhesion molecule (ICAM-1) (Chen et al, 2004) and the activation of the redox-sensitive protein kinases such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily. (Li et al, 2002).

Thus, the study model was designed to evaluate the effects of 3,4-DHPEA-EA in a mice model of acute inflammation (0.1 ml of saline containing 2%  $\lambda$ -carrageenan was injected into the pleural cavity). In particular, we investigated the effects of 3,4-DHPEA-EA on the lung injury associated with carrageenan induced pleurisy. In order to gain a better insight into the mechanism of action of 3,4-DHPEA-EA, we have also investigated the effects on: 1) lung damage (histology), 2) polymorphonuclear (PMN) infiltration (myeloperoxidase [MPO] activity), 3) ICAM-1 and platelet-adhesion-molecule (P-selectin) expression, 4) nitrotyrosine and poly-ADP-ribose (PAR) formation, 5) pro-inflammatory cytokines production, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 6) lipid peroxidation (malondialdehyde [MDA] levels), and 7) nitric oxide (NO) synthesis (nitrite-nitrate concentration).

## Materials and methods

### Animals

Male CD mice, weight 20-25 g; Harlan Nossan, Milan, Italy, were used in these studies. The animals were housed in a controlled environment and provided with standard rodent chow and water. Animal care was in compliance with Italian regulations on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (D.lgs 116/92) as well as with EEC regulations (O.J. of E.C. L358/1 12/18/1986).

### Carrageenan-induced pleurisy

Carrageenan-induced pleurisy was induced as previously described (Cuzzocrea et al, 2000). Mice were anaesthetized with isoflurane and subjected to a skin incision at the level of the left sixth intercostals space. The underlying muscle was dissected and saline (0.1 ml) or saline containing 2%  $\lambda$ -carrageenan (0.1 ml) was injected into the pleural cavity. The skin incision was closed with a suture and the animals were allowed to recover. At 4 h after the injection of carrageenan, the animals were killed by inhalation of CO<sub>2</sub>. The chest was carefully opened and the pleural cavity rinsed with 1 ml of saline solution containing heparin (5 U ml<sup>-1</sup>) and indomethacin (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). The exudate and washing solution were removed by aspiration and the total volume measured. Any exudate, which was contaminated with blood, was discarded.

### Experimental Design

Mice were randomly allocated into the following groups:

- (i) CAR + saline group. Mice were subjected to carrageenan-induced pleurisy (N = 10).
- (ii) CAR + 3,4-DHPEA-EA group (100  $\mu$ M/kg). Same as the CAR + saline group but 3,4-DHPEA-EA (100  $\mu$ M/kg, i.p.) were administered 30min after to carrageenan (N = 10).
- (iii) CAR + 3,4-DHPEA-EA group (40  $\mu$ M/kg). Same as the CAR + saline group but 3,4-DHPEA-EA (40  $\mu$ M/kg, i.p.) were administered 30min after to carrageenan (N = 10).
- (iv) Sham+saline group. Sham-operated group in which identical surgical procedures to the CAR group was performed, except that the saline was administered instead of carrageenan (N = 10).
- (v) Sham + 3,4-DHPEA-EA group. Same as the Sham+saline group but 3,4-DHPEA-EA (100  $\mu$ M/kg, i.p.) were administered 30min after to carrageenan (N = 10).

The doses of 3,4-DHPEA-EA (40 and 100  $\mu$ M /kg, i.p.) used here were based on previous *in vivo* studies. (Procopio et al, 2009)

### Histological examination

Lung tissues samples were taken 4 h after injection of carrageenan. Lung tissues samples were fixed for 1 week in 10 % (w/v) PBS-buffered formaldehyde solution at room temperature, dehydrated using graded ethanol and embedded in Paraplast (Sherwood Medical, Mahwah, NJ, USA). Sections were then deparaffinized with xylene, stained with hematoxylin and eosin. All sections were studied using Axiovision Zeiss (Milan, Italy) microscope.

### Measurement of cytokines

TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were evaluated in the exudate 4 h after the induction of pleurisy by carrageenan injection as previously described (Cuzzocrea et al., 1999). The assay was carried out using a colorimetric commercial ELISA kit (Calbiochem-Novabiochem Corporation, Milan, Italy).

### Measurement of nitrite-nitrate concentration

Total nitrite in exudates, an indicator of NO synthesis, was measured as previously described (Cuzzocrea et al., 2001). Briefly, the nitrate in the sample was first reduced to nitrite by incubation with nitrate reductase (670 mU/ml) and  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide 3'-phosphate (NADPH) (160  $\mu$ M) at room temperature for 3 h. The total nitrite concentration in the samples was then measured using the Griess reaction, by adding 100  $\mu$ l of Griess reagent (0.1% w/v naphthylethylenediamide-dihydrochloride in H<sub>2</sub>O and 1% (w/v) sulphanilamide in 5% (v/v) concentrated H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; vol. 1:1) to the 100  $\mu$ l sample. The optical density at 550 nm (OD<sub>550</sub>) was measured using ELISA microplate reader (SLT-Lab Instruments, Salzburg, Austria). Nitrite concentrations were calculated by comparison

with OD<sub>550</sub> of standard solutions of sodium nitrite prepared in H<sub>2</sub>O.

#### Immunohistochemical localization of ICAM-1, P-selectin, nitrotyrosine and PAR

At the end of the experiment, the tissues were fixed in 10% (w/v) PBS-buffered formaldehyde and 8 µm sections were prepared from paraffin embedded tissues. After deparaffinization, endogenous peroxidase was quenched with 0.3% (v/v) hydrogen peroxide in 60% (v/v) methanol for 30 min. The sections were permeabilized with 0.1% (w/v) Triton X-100 in PBS for 20 min. Non-specific adsorption was minimized by incubating the section in 2% (v/v) normal goat serum in PBS for 20 min. Endogenous biotin or avidin binding sites were blocked by sequential incubation for 15 min with biotin and avidin, respectively. Sections were incubated overnight with anti-nitrotyrosine rabbit polyclonal antibody (Upstate, 1:500 in PBS, v/v), anti-PAR antibody (BioMol, 1:200 in PBS, v/v), anti-ICAM-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, 1:500 in PBS, v/v) or with anti-P-selectin polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, 1:500 in PBS, v/v). Sections were washed with PBS, and incubated with secondary antibody. Specific labeling was detected with a biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG and avidin-biotin peroxidase complex (Vector Laboratories, DBA). In order to confirm that the immunoreaction for the nitrotyrosine was specific, some sections were also incubated with the primary antibody (anti-nitrotyrosine) in the presence of excess nitrotyrosine (10 mM) to verify the binding specificity. To verify the binding specificity for PAR, ICAM-1, P-selectin, some sections were also incubated with only the primary antibody (no secondary) or with only the secondary antibody (no primary). In these situations no positive staining was found in the sections indicating that the immunoreaction was positive in all the experiments carried out.

#### MPO activity

MPO activity, an indicator of PMN accumulation, was determined as previously described (Mullane et al., 1985). At the specified time following injection of carrageenan, lung tissues were obtained and weighed, each piece homogenized in a solution containing 0.5% (w/v) hexadecyltrimethyl-ammonium bromide dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7) and centrifuged for 30 min at 20,000 × g at 4° C. An aliquot of the supernatant was then allowed to react with a solution of tetramethylbenzidine (1.6 mM) and 0.1 mM hydrogen peroxide. The rate of change in absorbance was measured spectrophotometrically at 650 nm. MPO activity was defined as the quantity of enzyme degrading 1 µmol of peroxide min<sup>-1</sup> at 37° C and was expressed in milliunits per gram weight of wet tissue.

#### MDA measurement

MDA levels in the lung tissue were determined as an indicator of lipid peroxidation as previously described (Ohkawa et al., 1979). Lung tissue collected at the specified time, was homogenized in 1.15% (w/v) KCl solution. A 100 µl aliquot of the homogenate was added to a reaction mixture containing 200 µl of 8.1% (w/v) SDS, 1.5 ml of 20% (v/v) acetic acid (pH 3.5), 1.5 ml of 0.8% (w/v) thiobarbituric acid and 700 µl distilled water. Samples were then boiled for 1 h at 95°C and centrifuged at 3,000 × g for 10 min. The absorbance of the supernatant was measured using spectrophotometry at 650 nm.

#### Materials

Unless otherwise stated, all compounds were obtained from Sigma-Aldrich Company Ltd. (Poole, Dorset, U.K.). 3,4-DHPEA-EA was obtained from the controlled hydrolysis of oleuropein extracted from olive leaves by means the patented method reported by Procopio et al. (2009). All other chemicals were of the highest commercial grade available. All stock solutions were prepared in non-pyrogenic saline (0.9% NaCl; Baxter, Italy, UK).

### Statistical evaluation

All values in the figures and text are expressed as mean  $\pm$  standard error (s.e.m.) of the mean of *n* observations. For the *in vivo* studies *n* represents the number of animals studied. In the experiments involving histology or immunohistochemistry, the figures shown are representative of at least three experiments (histological or immunohistochemistry coloration) performed on different experimental days on the tissue sections collected from all the animals in each group. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. A *p*-value less than 0.05 were considered significant. and individual group means were then compared with Student's unpaired *t* test. A *P*-value of less than 0.05 was considered significant.

## Results

### Effects of 3,4-DHPEA-EA on carrageenan-induced pleurisy

When compared to lung sections taken from saline-treated animals (sham group Fig. 2A, see histological score 2D) histological examination of lung sections taken from mice treated with carrageenan revealed significant tissue damage and edema (Fig. 2B, see histological score 2D) as well as infiltration of neutrophils (PMNs) within the tissues (Fig. 2B). 3,4-DHPEA-EA (100  $\mu$ M/kg) reduced the degree of lung injury (Fig. 2C, see histological score 2D).

The pleural infiltration with PMN appeared to correlate with an influx of leukocytes into the lung tissue, thus we investigated the effect of 3,4-DHPEA-EA on neutrophil infiltration by measurement of MPO activity. MPO activity was significantly elevated at 4 h after carrageenan administration in vehicle-treated mice (Fig. 2E). Treatment with 3,4-DHPEA-EA significantly attenuated neutrophil infiltration into the lung tissue (Fig. 2E).

### Effects of 3,4-DHPEA-EA on the expression of adhesion molecules (ICAM-1, P-selectin)

Staining of lung tissue sections obtained from saline-treated mice with anti-ICAM-1 antibody showed a specific staining along bronchial epithelium demonstrating that ICAM-1 is constitutively expressed (Fig. 3A). No positive staining for P-selectin was found in lung tissue sections from saline-treated mice (Fig. 3D). At 4 h after carrageenan injection, the ICAM-1 staining intensity increased in the vascular endothelium (Fig. 3B). Lung tissue sections obtained from carrageenan-treated mice showed positive staining for P-selectin localized in the vessels (Fig. 3E). No positive staining for ICAM-1 or P-selectin was observed in the lungs of carrageenan-treated mice treated with 3,4-DHPEA-EA (Fig. 3C and 3F respectively).

### Effects of 3,4-DHPEA-EA on the release of pro-inflammatory cytokine and nitrite–nitrate concentration

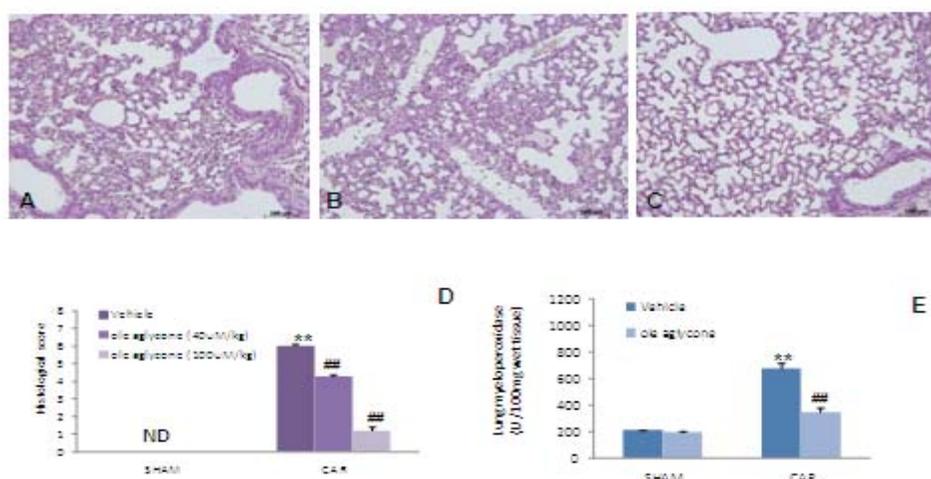
When compared to sham animals, injection of carrageenan resulted in an increase in the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the pleural exudates (Fig. 4A,B). The release of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was significantly attenuated by treatment with 3,4-DHPEA-EA (Fig. 4A,B). No significant increase of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  exudates levels was found in the sham animal (Fig. 4A,B).

NO levels were also significantly increased in the exudate obtained from mice administered carrageenan (Fig. 4C). Treatment of mice with 3,4-DHPEA-EA significantly reduced NO exudates levels (Fig. 4C). No significant increase of NO exudates levels was found in the sham animal (Fig. 4C).

### Effects of 3,4-DHPEA-EA on carrageenan-induced nitrotyrosine formation, lipid peroxidation and

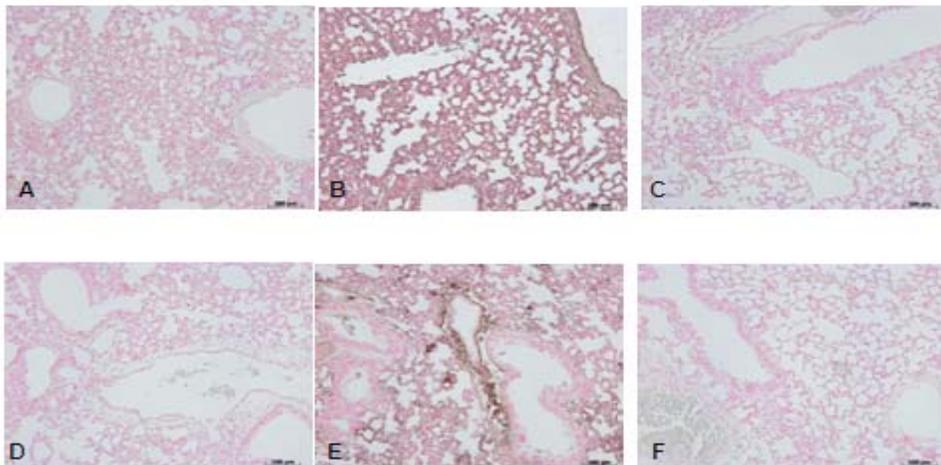
**poly-ADP-ribosyl polymerase (PARP) activation**

Immunohistochemical analysis of lung sections obtained from mice treated with carrageenan revealed positive staining for nitrotyrosine (Fig. 5B). In contrast, no positive staining for nitrotyrosine was found in the lungs of carrageenan-treated mice, which had been treated with 3,4-DHPEA-EA (100  $\mu$ M/kg) (Fig. 5C). In addition, at 4 hours after carrageenan-induced pleurisy, MDA levels were also measured in the lungs as an indicator of lipid peroxidation. As shown in Figure 5D, MDA levels were significantly increased in the lungs of carrageenan-treated mice. Lipid peroxidation was significantly attenuated by the intraperitoneal injection of 3,4-DHPEA-EA (Fig. 5D). At the same time point (4 h after carrageenan administration), lung tissue sections were taken in order to determine the immunohistological staining for poly ADP-ribosylated proteins (an indicator of PARP activation). A positive staining for the PAR (Fig. 5F) was found primarily localized in the inflammatory cells present in the lung tissue from carrageenan-treated mice. 3,4-DHPEA-EA treatment reduced the degree of PARP activation (Figure 5G). Please note that there was no staining for either nitrotyrosine (Fig. 5A) or PAR (Fig. 5E) in lung tissues obtained from the sham group of mice.



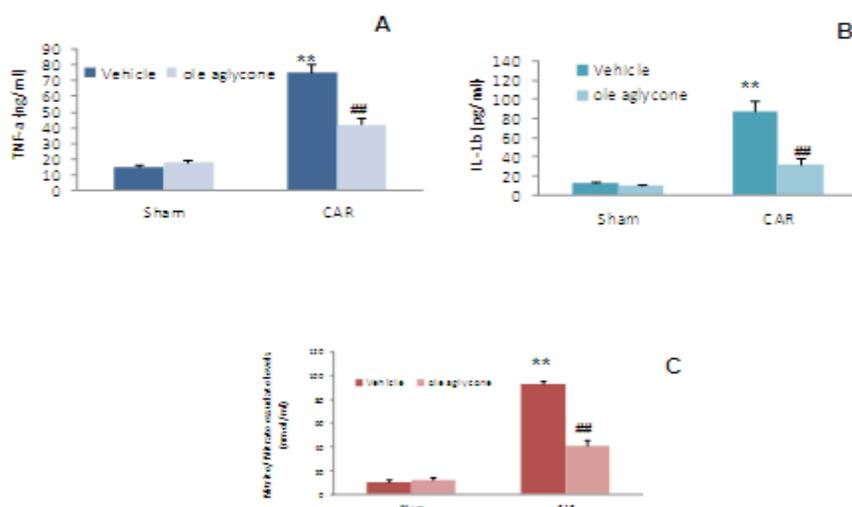
**Figure 2**

Effect of 3,4-DHPEA-EA on histological alterations of lung tissue 4 h after carrageenan-induced injury and on PMN infiltration in the lung. Lung sections taken from carrageenan-treated mice treated with vehicle demonstrated edema, tissue injury (B) as well as infiltration of the tissue with neutrophils (B). Carrageenan-treated animals treated with 3,4-DHPEA-EA (C) demonstrated reduced lung injury and neutrophil infiltration. Section from sham animals demonstrating the normal architecture of the lung tissue (A). The histological score (D) was made by an independent observer. MPO activity, index of PMN infiltration, was significantly elevated at 4 h after carrageenan (CAR) administration in vehicle-treated mice (E), if compared with sham mice (E). 3,4-DHPEA-EA significantly reduced MPO activity in the lung (E). The figure is representative of at least 3 experiments performed on different experimental days. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. from  $n = 10$  mice for each group. \*\*,  $P < 0.01$  versus sham group. °,  $P < 0.01$  versus carrageenan.



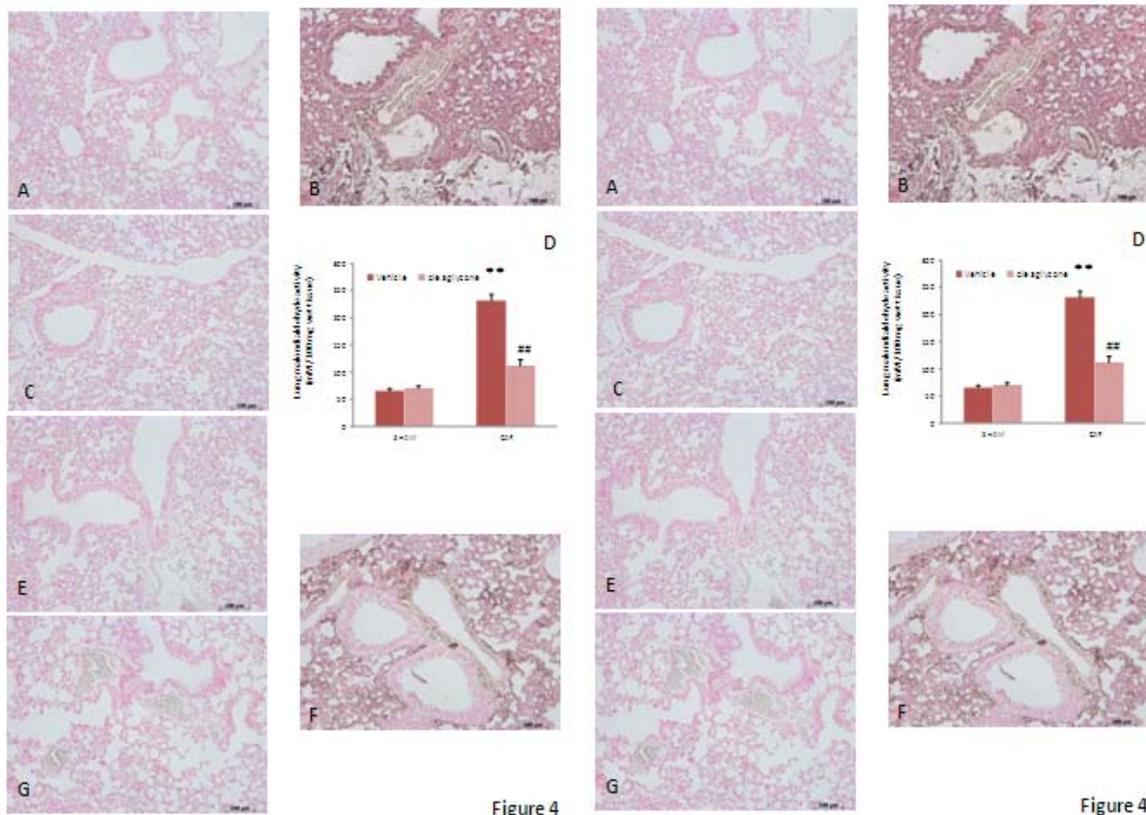
**Figure 3**

Effect of 3,4-DHPEA-EA on the immunohistochemical localization of ICAM-1 and P-selectin in the lung after carrageenan injection. No positive staining for ICAM-1 was observed in lung sections taken from sham mice (A). Lung sections taken from carrageenan-treated mice showed intense positive staining for ICAM-1 along the vessels (B). The degree of positive staining for ICAM-1 was markedly reduced in lung sections obtained from mice treated with 3,4-DHPEA-EA (C). No positive staining for P-selectin was observed in lung sections taken from sham mice (D). Lung sections taken from carrageenan-treated mice treated with vehicle showed intense positive staining for P-selectin along the vessels (E). The degree of positive staining for P-selectin was markedly reduced in tissue sections obtained from mice treated with 3,4-DHPEA-EA (F). The figure is representative of at least three experiments performed on different experimental days.



**Figure 4**

Effect of 3,4-DHPEA-EA on carrageenan-induced pro-inflammatory cytokine release and NO formation in the lung. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were significantly elevated at 4 h after carrageenan administration in vehicle-treated mice (A and B respectively), if compared with sham mice (A and B respectively). 3,4-DHPEA-EA significantly reduced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels (A and B respectively). Moreover nitrite and nitrate levels, stable NO metabolites, were significantly increased in the pleural exudates at 4 h after carrageenan administration (C) if compared with sham mice (C). 3,4-DHPEA-EA significantly reduced the carrageenan-induced elevation of nitrite and nitrate exudates levels (C). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. from n 10 mice for each group. \*\*, P < 0.01 versus sham group. #, P < 0.01 versus carrageenan.



**Figure 5**

Effect of 3,4-DHPEA-EA on carrageenan-induced nitrotyrosine formation, lipid peroxidation and PARP activation in the lung. No staining for nitrotyrosine is present in lung section from sham mice (A). Lung sections taken from carrageenan-treated mice treated with vehicle showed positive staining for nitrotyrosine, localized mainly in inflammatory cells (B). There was a marked reduction in the immunostaining for nitrotyrosine in the lungs of carrageenan-treated mice treated with 3,4-DHPEA-EA (C). Malondialdehyde (MDA) levels, an index of lipid peroxidation, were significantly increased in lung tissues 4 h after carrageenan administration (D), if compared with lung from sham mice (D). 3,4-DHPEA-EA significantly reduced the carrageenan-induced elevation of MDA tissues levels (D). Lung sections taken from carrageenan-treated mice showed positive staining for PAR (F). There was a marked reduction in the immunostaining for PAR in the lungs of carrageenan-treated mice treated with 3,4-DHPEA-EA (G). Lung section from sham mice showed no staining for PAR (E). The figure is representative of at least 3 experiments performed on different experimental days. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. from n 10 mice for each group.

\*\* $P < 0.01$  versus sham group. ° $P < 0.01$  versus carrageenan.

## Discussion

All of the above findings are in support of the view that 3,4-DHPEA-EA attenuates the degree of acute inflammation in the mouse. What, then, is the mechanism by which ole reduces acute inflammation?

One consequence of increased oxidative stress is the activation and inactivation of redox-sensitive proteins. (Bowie et al, 2000) Recent studies have observed that the acute consumption of olive oil decreased the activation of NF- $\kappa$ B system on mononuclear cells from healthy men (Perez-Martinez et al, 2007) and that 3,4-DHPEA-EA, trans-resveratrol, and hydroxytyrosol incubated with human umbilical vein endothelial cells inhibit LPS-triggered NF- $\kappa$ B and AP-1 activation. (Carluccio et al, 2003)

Moreover, various experimental evidence have clearly suggested that NF- $\kappa$ B plays a central role in the regulation of many genes responsible for the generation of mediators or proteins in acute lung inflammation associated with carrageenan administration (Cuzzocrea et al, 2006) such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , nitric oxide synthase inducible (iNOS) and COX-2. By inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B, the production of joint destructive inflammatory mediators may be reduced as well. In this regard, Miles et al., demonstrated that ole glycoside significantly decreased the concentration of IL-1 $\beta$  in LPS-stimulated human whole blood cultures.<sup>24</sup> Therefore, this study also demonstrates that 3,4-DHPEA-EA attenuates the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production in the lung of carrageenan-treated mice. In addition, recent studies also showed that the potential cardioprotective activity of oleuropein in acute cardiotoxicity induced by doxorubicin treatment was determined in vivo in rats (Andreau et al, 2007) by inhibiting lipid peroxidation products, decreasing oxidative stress and reducing iNOS in cardiomyocytes. We show here that NO levels, evaluated as NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> and MDA levels which is the products of lipid peroxidation, were increased at 4h after carrageenan injection while 3,4-DHPEA-EA decreased the levels of NO and MDA.

For many years, much attention has been paid to the effects of NO in respiratory diseases<sup>26</sup> but recently, the focus has been shifted toward RNS in general, and to peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) in particular. (Sadeghi-Hashjin et al, 1998) To probe the pathological contributions of ONOO<sup>-</sup> to acute lung injury we have used the appearance of nitrotyrosine staining in the inflamed tissue. We have observed here that the immunoassaying of nitrotyrosine is reduced in the lung of carrageenan-treated mice and treated with 3,4-DHPEA-EA. Therefore, the inhibition of nitrotyrosine formation by oleuropein described in the present study is most likely attributed to the strong antioxidant activity of ole.

During inflammation initiation, circulating leukocytes must first be able to adhere selectively and efficiently to vascular endothelium. This process is facilitated by induction of vascular cell adhesion molecules on the inflamed endothelium, such as vascular cell adhesion molecule VCAM-1, ICAM-1, E-selectin. Carluccio et al. (2003) demonstrated that 3,4-DHPEA-EA was a more potent inhibitor of adhesion molecule expression on cultured human endothelial cells than was the glycoside. Furthermore, the absence of an increased expression of the adhesion molecule in the lung from CAR mice treated with 3,4-DHPEA-EA was correlated with the reduction of leukocyte infiltration as assessed by the specific granulocyte enzyme MPO and with the attenuation of the lung tissue damage as evaluated by histological examination. Several studies also showed that in the auricular edema induced by either arachidonic acid (AA) or 12-O-tetradecanoylphorbol acetate (TPA), the topical application of the olive oil compounds such as ole also produced an inhibition of the MPO in the inflamed tissue. (de la Puerta et al, 2000)

Various studies have demonstrated that PARP activation after single DNA strand breakage induced by ROS plays an important role in the process of acute lung injury. (Szabo et al, 1998) In this study we confirm the increase in PAR formation in the lung tissues from carrageenan-treated mice as well as that 3,4-DHPEA-EA treatment attenuates PARP activation. In this regard, several studies demonstrated that hydroxytyrosol, a hydrolysis product of 3,4-DHPEA-EA, also exerts an inhibitory effect on peroxyni-

trite-dependent DNA base modifications and tyrosine nitration. (Deiana et al, 1999) Similarly, Salvini et al. (2006) showed a 30% reduction of oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes during intervention on postmenopausal women with virgin olive oil containing high amounts of phenols.

In conclusion, concomitant with inflammation is the generation of free radicals, which increase oxidation of proteins and lipids, resulting in signals that trigger more inflammation.

Taken together, the results of the present study enhance our understanding of the role of ROS generation in the pathophysiology of carrageenan-induced pleurisy implying that olive oil compounds such as 3,4-DHPEA-EA may be useful in the therapy of inflammation.

## 3,4-DHPEA-EA AND CHRONIC INFLAMMATION

### Premise

Reactive oxygen species (ROS) are produced in cells by several physiological and environmental stimulations, such as infections, ultraviolet radiation and pollutants, known collectively as oxidants. Interestingly, ROS have also been considered as risk and enhancer factors for autoimmune diseases (Filippin et al, 2008) as there is a significant relation between the oxidative stress and such diseases (Avalos et al, 2007; Filippin et al, 2008;). Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterised by the sequestration of various leukocyte subpopulations within both the developing pannus and synovial space. The chronic nature of this disease results in multiple joint inflammation with subsequent destruction of joint cartilage and erosion of bone. While this disease has a worldwide distribution, its pathogenesis is not clearly understood (Harris ED, Jr, 1990). Type II collagen-induced arthritis (CIA) in the mouse has proven to be a useful model of RA, as it possesses many of the cell and humoral immunity characteristics found in human RA (Holmdahl et al, 1990). The pathogenesis of CIA is dependent upon the host's response to type II collagen challenge and the subsequent generation of antibodies that recognises collagen rich joint tissue (Holmdahl et al, 1990). The chronic activities initiated by immune complexes trigger a variety of cell-mediated and humoral events. Moreover, the recruitment and activation of neutrophils, macrophages, and lymphocytes into joint tissues and the formation of the pannus are hallmarks of the pathogenesis of both CIA and human RA. Recently, it has been demonstrated that interleukin (IL)-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and RANTES are differentially chemotactic for lymphocyte subsets (Taub et al, 1993). Chemokines may play prominent roles in RA, as neutrophil and mononuclear cell stimulation and activation are prevalent in this disease. Concomitant with inflammation is the generation of ROS (Trichopoulou et al, 2003) which increase oxidation of proteins and lipids, resulting in signals that trigger more inflammation.

Thus, the study model was designed to evaluate the effects of 3,4-DHPEA-EA in a mice model of chronic inflammation (development of CIA in the mice).

We have evaluated the following endpoints of the inflammatory process:

- (1) clinical score;
- (2) body weight;
- (3) inducible oxide nitric synthase (iNOS) and cyclooxygenase expression (COX-2);
- (4) nitrotyrosine formation and activation of the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP);
- (5) cytokine and chemokines production;
- (6) neutrophil infiltration;
- (7) joint histopathology.

## Animals

DBA/1J mice (9 weeks, Harlan Nossan, Italy) were used for these studies. The animals were housed in a controlled environment and provided with standard rodent chow and water. Animal care was in compliance with Italian regulations on protection of animals used for experimental and other scientific purposes (D.M. 116192) as well as with the EEC regulations (O.J. of E.C. L 358/1 12/18/1986).

## Experimental Design

Mice were divided into the following four experimental groups:

- (i) CIA-Control; mice were subjected to collagen-induced arthritis (as described below) and administered 200  $\mu$ l of 10% ethanol solution (i.p., vehicle for 3,4-DHPEA-EA) every 24 h, starting from day 25 (n = 20).
- (ii) CIA-3,4-DHPEA-EA; mice subjected to collagen-induced arthritis (as described below) were administered 3,4-DHPEA-EA (40  $\mu$ M/kg, i.p.) every 24 h, starting from day 25 (n = 20).
- (iii) Sham-Control; mice subjected to an intradermal injection at the base of the tail of 100  $\mu$ l of 0.01 M acetic acid instead of the emulsion containing 100  $\mu$ g of CII, were treated with 200  $\mu$ l of 10% ethanol solution (i.p., vehicle for 3,4-DHPEA-EA), every 24 h starting from day 25 (n = 20).
- (iv) Sham-3,4-DHPEA-EA; mice subjected to an intradermal injection at the base of the tail of 100  $\mu$ l of 0.01 M acetic acid instead of the emulsion containing 100  $\mu$ g of CII, were administered 3,4-DHPEA-EA (40  $\mu$ M/kg, i.p.), every 24 h starting from day 25 (n = 20).

The dose of 3,4-DHPEA-EA used here to reduce joint injury was chosen based on a previous study (Procopio et al, 2009).

Collagen-induced arthritis (CIA) is induced in mice by two consecutive (interval 21 days) intradermal injection of 100  $\mu$ l of the emulsion (containing 100  $\mu$ g of bovine type II collagen) (CII) and complete Freund's adjuvant (CFA) at the base of the tail.

Mice develop erosive hind paw arthritis with macroscopic clinical evidence of CIA as peri-articular erythema and edema in the hind paws. The incidence of CIA is 100% by day 27 in the CII challenged and the severity of CIA progressed over a 35-day period with a reabsorption of bone. The histopathology of CIA include erosion of the cartilage at the joint .

## Induction of CIA

Bovine CII was dissolved in 0.01 M acetic acid at a concentration of 2 mg/ml by stirring overnight at 4°C. Dissolved CII was frozen at -70°C until use. Complete Freund's adjuvant (CFA) was prepared by addition of Mycobacterium tuberculosis H37Ra at a concentration of 5 mg/ml. Before injection, CII was emulsified with an equal volume of CFA. CIA was induced as previously described (Szabo et al., 1998). On day 1, mice were injected intradermally at the base of the tail with 100  $\mu$ l of the emulsion containing 100  $\mu$ g of CII. On day 21, a second injection of CII in CFA was administered.

## Clinical assessment of CIA

The development of arthritis in mice in all experimental groups was evaluated daily starting from day 20 after the first intradermal injection by using a macroscopic scoring system: 0 = no signs of arthritis; 1 = swelling and/or redness of the paw or one digit; 2 = two joints involved; 3 = more than two joints involved; and 4 = severe arthritis of the entire paw and digits (Szabo et al., 1998). Arthritic index for each mouse was calculated by adding the four scores of individual paws. Clinical severity was also determined by quantitating the change in the paw volume using plethysmometry (model 7140; UgoBasile).

### Histological examination

On day 35, animals were sacrificed while they were under anesthesia (sodium pentobarbital, 45 mg/kg, i.p), and paws and knees were removed and fixed in 10% formalin. The paws were then trimmed, placed in decalcifying solution for 24 h, embedded in paraffin, sectioned at 5  $\mu$ m, stained with hematoxylin/eosin and Masson's trichrome stain and studied using light microscopy (Dialux 22 Leitz).

### Immunohistochemical localization of nitrotyrosine, Poly ADP Ribose (PAR), iNOS, and COX-2.

On day 35, the joints were trimmed, placed in decalcifying solution for 24 h and 8  $\mu$ m sections were prepared from paraffin embedded tissues. After deparaffinization, endogenous peroxidase was quenched with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 60% methanol for 30 min. The sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 min. Non-specific adsorption was minimized by incubating the section in 2% normal goat serum in phosphate buffered saline for 20 min. Endogenous biotin or avidin binding sites were blocked by sequential incubation for 15 min with avidin and biotin. Sections were incubated overnight with 1) anti-rabbit polyclonal antibody directed at iNOS (1:1000 in PBS, v/v) (DBA, Milan, Italy) or 2) anti-COX-2 goat polyclonal antibody (1:500 in PBS, v/v) or 3) anti-nitrotyrosine rabbit polyclonal antibody (1:1000 in PBS, v/v) or 4) with anti-PAR goat polyclonal antibody rat (1:500 in PBS, v/v) or 5). Controls included buffer alone or non-specific purified rabbit IgG. Specific labeling was detected with a biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (for nitrotyrosine and iNOS) or with a biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (for PAR and COX-2) and avidin-biotin peroxidase complex. In order to confirm that the immunoreaction for the nitrotyrosine was specific some sections were also incubated with the primary antibody (anti-nitrotyrosine) in the presence of excess nitrotyrosine (10mM) to verify the binding specificity. To verify the binding specificity for PAR, COX-2 and iNOS, some sections were also incubated with only the primary antibody (no secondary) or with only the secondary antibody (no primary). In these situations, no positive staining was found in the sections indicating that the immunoreaction was positive in all the experiments carried out. Immunocytochemistry photographs (N=5) were assessed by densitometry by using OptilabGraftek software on a Macintosh personal computer.

### Measurement of cytokines

Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels were evaluated in the plasma from CIA and sham mice as previously described (Cuzzocrea et al., 2006). The assay was carried out using a colorimetric commercial ELISA kit (Calbiochem-Novabiochem Corporation, Milan, Italy) with a lower detection limit of 10 pg/ml.

### Measurement of chemokines

Levels of chemokines MIP-1 $\alpha$  and MIP-2 were measured in the aqueous joint extracts. Briefly, joint tissues were prepared by first removing the skin and separating the limb below the ankle joint. Joint tissues were homogenized on ice in 3 ml lysis buffer (PBS containing: 2 mM PMSF, and 0,1 mg/ml [final concentration], each of aprotinin, antipain, leupeptin, and pepstatin A) using Polytron (Brinkinarm Instruments, Westbury, NY). The homogenized tissues were then centrifuged at 2,000 g for 10 min. Supernatant were sterilized with a millipore filter (0.2  $\mu$ m) and stored at -80°C until analyzed. The extracts usually contained 0.2-1.5 mg protein/ml, as measured by protein assay kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). The levels of MIP-1 $\alpha$  and MIP-2 were quantified using a modification of a double ligand method, as previously described (Kasama et al., 1994). Briefly, flat-bottomed 96-well microtiter plates were coated with 50  $\mu$ l/well of rabbit anti-cytokine antibodies (1  $\mu$ g/ml in 0.6 mol/liter NaCl, 0.26 mol/liter H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> and 0.08 N NaOH, pH 9.6) for 16 h at 4°C, and then washed with PBS, pH 7.5, 0.05% Tween 20 (wash buffer). Nonspecific binding sites on microtiter plates were blocked with 2% BSA in PBS and incubated for 90

min at 37°C. Plates were rinsed four times with wash buffer, and diluted aqueous joint samples (50 µl) were added, followed by incubation for 1 h at 37°C. After washing of plates, chromogen substrate was added. The plates were incubated at room temperature to the desired extinction, after which the reaction was terminated with 50 µl/well of 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. The plates were then read at 490 nm in an ELISA reader. This ELISA method consistently had a sensitivity limit of ~30 pg/ml.

### Myeloperoxidase (MPO) assay

Neutrophil infiltration to the inflamed joints was indirectly quantitated using an MPO assay, as previously described for neutrophil elicitation (Mullane et al., 1986). Tissue was prepared as described above and placed in a 50 mM phosphate buffer (pH = 6.0) with 5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (Sigma Chemical Co.). Joint tissues were homogenized, sonicated, and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were assayed for MPO activity using a spectrophotometric reaction with O-dianisidine hydrochloride (Sigma Chemical Co.) at 460 nm.

### Materials

3,4-DHPEA-EA was obtained from Merck Biosciences (Calbiochem, Beecham, Nottingham, UK). Unless otherwise stated, other compounds were obtained from Sigma-Aldrich Company (Milan, Italy). All chemicals were of the highest commercial grade available. All stock solutions were prepared in nonpyrogenic saline (0.9% NaCl; Baxter Healthcare Ltd., Thetford, Norfolk, U.K.) or 10% ethanol (Sigma-Aldrich).

### Data analysis

All values in the figures and text are expressed as mean ± standard error (s.e.m.) of the mean of *n* observations. For the *in vivo* studies *n* represents the number of animals studied. In the experiments involving histology or immunohistochemistry, the figures shown are representative of at least three experiments (histological or immunohistochemistry coloration) performed on different experimental days on the tissue sections collected from all the animals in each group. Data sets were examined by one- or two-way analysis of variance, and individual group means were then compared with Student's unpaired *t* test. For the arthritis studies, Mann-Whitney U test (two-tailed, independent) was used to compare medians of the arthritic indices (Szabo et al., 1998). A *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

## Results

### Effect of 3,4-DHPEA-EA on joint injury during experimental arthritis

To imitate the clinical scenario of RA, mice were subjected to CIA. CIA developed rapidly in mice immunized with CII and clinical signs (periarticular erythema and edema) (Fig. 6B) of the disease first appeared in hind paws between 24 and 26 days post-challenge (Fig. 6D) leading to a 100% incidence of CIA at day 28 (Fig. 6D). Hind paw erythema and swelling increased in frequency and severity in a time-dependent mode with maximum arthritis indices of approximately 10 observed between day 29 to 35 post immunization (Fig. 6D) in CIA-control mice. 3,4-DHPEA-EA treatment demonstrated a significant reduction of joint inflammation, as identified by a significant reduction in the incidence of arthritis (Figure 1C). CIA-3,4-DHPEA-EA mice showed a 40% reduction in the development of arthritis and a significantly lower arthritis index compared to CIA-control mice (Fig. 6D). There was no macroscopic evidence of either hind paw erythema or edema in the sham-control group mice (Fig. 6A and D).

The data in Figure 1E demonstrate a time-dependent increase in hind paw volume (each value

represents the mean of both hind paws). The CIA-3,4-DHPEA-EA mice showed a significant reduction of paw edema formation when compared to CIA-control mice (Fig. 6E). No increase in hind paw volume over time was observed in the sham-control mice (Fig. 6E).

The rate and the absolute gain in body weight were comparable in sham-control and CIA-control mice in the first week (Fig. 6F). From day 25, the CII-challenged mice gained significantly less weight than the sham-control mice, and this trend continued through to day 35. 3,4-DHPEA-EA treatment determined a significant increase of the weight gain compared with the vehicle-treatment in CIA-control mice (Fig. 6F).

The histological evaluation (on day 35) of the joint from CIA-control mice (Fig. 7B) revealed signs of severe arthritis, with inflammatory cell infiltration and bone erosion. The histological alterations of joint were significantly reduced in 3,4-DHPEA-EA -treated mice (Fig. 7C). Moreover Masson's trichrome stain reveals decreased collagen (blue stain) in bone and cartilage of arthritic joint due to bone erosion and cartilage degradation in CIA-control mice (Fig. 7E). The alterations of joint were significantly reduced in 3,4-DHPEA-EA -treated mice (Fig. 7F). There was no evidence of pathology in the sham-control mice (Fig. 7A and D). The histological score (Fig. 7G) was determined by an independent observer.

#### Effect of 3,4-DHPEA-EA on cytokines, chemokine expression and neutrophil infiltration

We initiated studies to assess the effect of 3,4-DHPEA-EA on the expression of chemokines in the aqueous joint extracts during the development of CIA. As shown in Fig. 8, A and B, the expression of MIP-1 $\alpha$  and MIP-2, measured by ELISA, was significantly increased in the joint 35 days after CII immunization. MIP-1 $\alpha$  and MIP-2 levels in CIA-3,4-DHPEA-EA mice on day 35 were significantly reduced in a dose-dependent manner in comparison with those in vehicle treated CIA-control mice. Assessment of neutrophil infiltration into the inflamed joint tissue was performed by measuring the activity of MPO. It was significantly elevated 35 days after CII immunization in vehicle-treated CIA-control mice (Fig. 8F), whereas in the CIA-3,4-DHPEA-EA group, MPO activity was markedly reduced in a dose-dependent manner (Fig. 8F). To test whether 3,4-DHPEA-EA modulates the inflammatory process through the regulation of cytokine secretion, we analyzed the plasma levels of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6. A substantial increase in TNF- $\alpha$ , (Fig. 8C), IL-1 $\beta$  (Fig. 8D), and IL-6 (Fig. 8E) production was found in CIA-control mice 35 days after CII immunization. Levels of TNF- $\alpha$  (Fig. 8C), IL-1 $\beta$  (Fig. 8D), and IL-6 (Fig. 8E) were significantly reduced in a dose-dependent manner in CIA-3,4-DHPEA-EA mice in comparison to CIA-control mice.

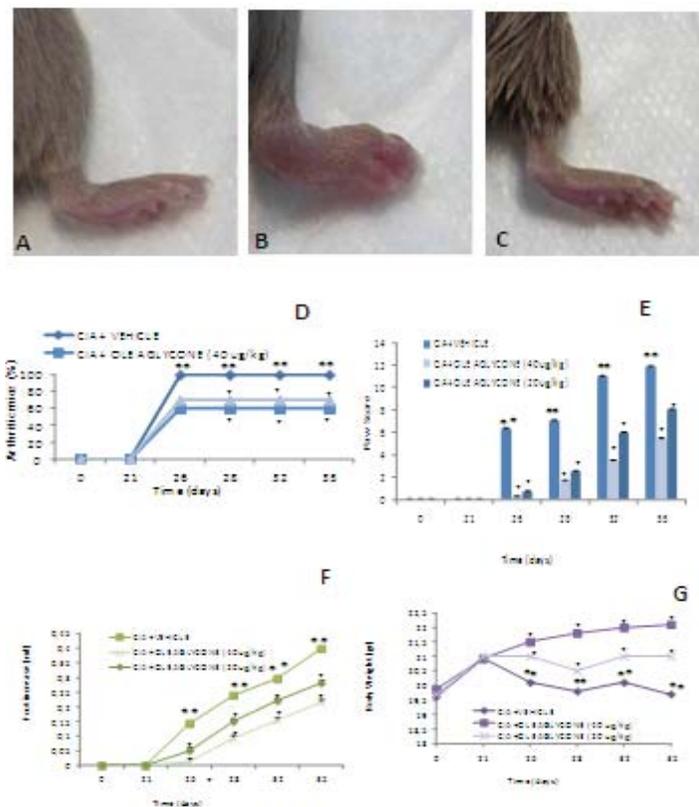
#### Effect of 3,4-DHPEA-EA treatment on iNOS, COX-2, PGE<sub>2</sub>, nitrotyrosine, and PAR formation

Immunohistochemical analysis of the tibiotarsal joint sections obtained from CIA-control mice revealed positive staining for iNOS (Fig. 9, A and A1) and COX-2 (Fig. 9, A and A1), which were primarily localized in inflammatory cells. In contrast, staining for iNOS (Fig. 9B) and COX-2 (Fig. 4B) was markedly reduced in the tibiotarsal joints of CIA-3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg) mice. No staining for either iNOS or COX-2 was detected in the tibiotarsal joints obtained from sham control mice (data not shown). Moreover, we also evaluated the levels of PGE<sub>2</sub>, the metabolite of COX-2, in the serum during the development of CIA. A substantial increase in PGE-2 production was found in CIA-control mice 35 days after CII immunization (Fig. 9E). Levels of PGE-2 were significantly reduced in CIA-3,4-DHPEA-EA mice in a dose dependent manner compared with those in CIA-control mice (Fig. 9E). The release of free radicals and oxidant molecules during chronic inflammation has been suggested to contribute significantly to the tissue injury (Cuzzocrea et al., 2001). On day 35, positive staining for nitrotyrosine, a marker of nitrosative injury, was found in the tibiotarsal joints

of vehicle-treated CIA-control mice (Fig. 10, A and A1). 3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg) treatment significantly reduced the formation of nitrotyrosine (Fig. 10B). Immunohistochemical analysis of joint sections obtained from CII-challenged mice revealed positive staining for PAR (Fig. 11, A and A1). In contrast, no positive PAR was found in the tibiotarsal joints of CII-challenged mice treated with 3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg) (Fig. 11B). There was no staining for either nitrotyrosine or PAR in the tibiotarsal joints obtained from sham-control mice (data not shown).

### 3,4-DHPEA-EA Inhibits the Progression of Established Arthritis.

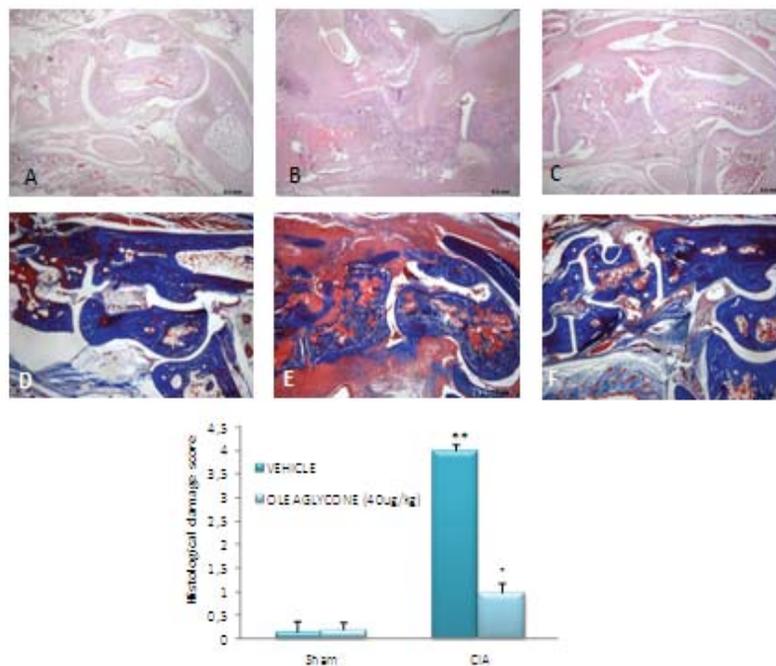
To confirm that 3,4-DHPEA-EA exerts beneficial effects in the experimental model of collagen-induced arthritis, we have also evaluated its effect in a therapeutic regimen of post-treatment (40 mg/kg), starting the treatment at day 28. CIA-3,4-DHPEA-EA post-treatment mice also showed a reduction in the development of arthritis and a significantly lower arthritis score compared with those in CIA-control mice as shown in Fig. 8A. 3,4-DHPEA-EA post-treatment also significantly reduced paw edema formation (Fig. 12B). In addition, 3,4-DHPEA-EA post-treated mice showed significantly reduced histological alterations of the tibiotarsal joint as shown in the histological score (Fig. 12C) and increased body weight (Fig. 12D).



**Figure 6**

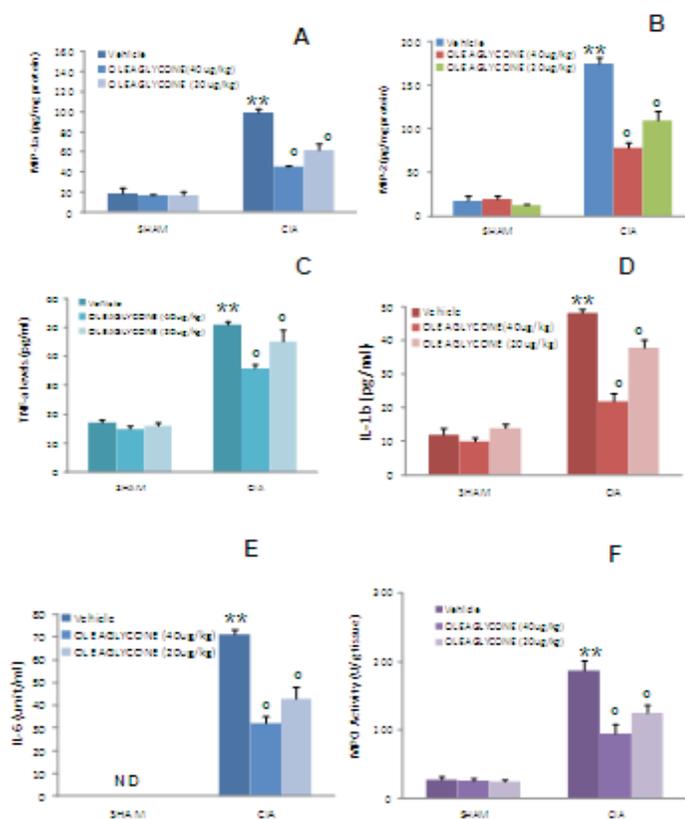
Effect of 3,4-DHPEA-EA on the clinical expression of CIA and on body weight. A, no clinical signs were observed in sham mice. CIA developed rapidly in mice immunized with CII and clinical signs

such as periarticular erythema and edema (B) were seen with a 100% incidence of CIA at day 28 (D). E, hind paw erythema and swelling increased in frequency and severity in a time-dependent mode. CIA-3,4-DHPEA-EA mice demonstrated a significant reduction in the clinical signs of CIA (C), leading to a decrease in the incidence of arthritis in a dose-dependent manner (D). Swelling of hind paws (F) over time was measured at 2-day intervals. G, beginning on day 25, the CIA-challenged mice gained significantly less weight and this trend continued through day 35. CIA-3,4-DHPEA-EA mice demonstrated a significant reduced incidence of weight loss (G) as well as less paw edema in a dose-dependent manner (F). The figure is representative of all the animals in each group. Values are means  $\pm$  S.E.M. of 20 animals for each group. \*\*,  $P < 0.01$  versus sham-control; °,  $P < 0.01$  versus CIA.



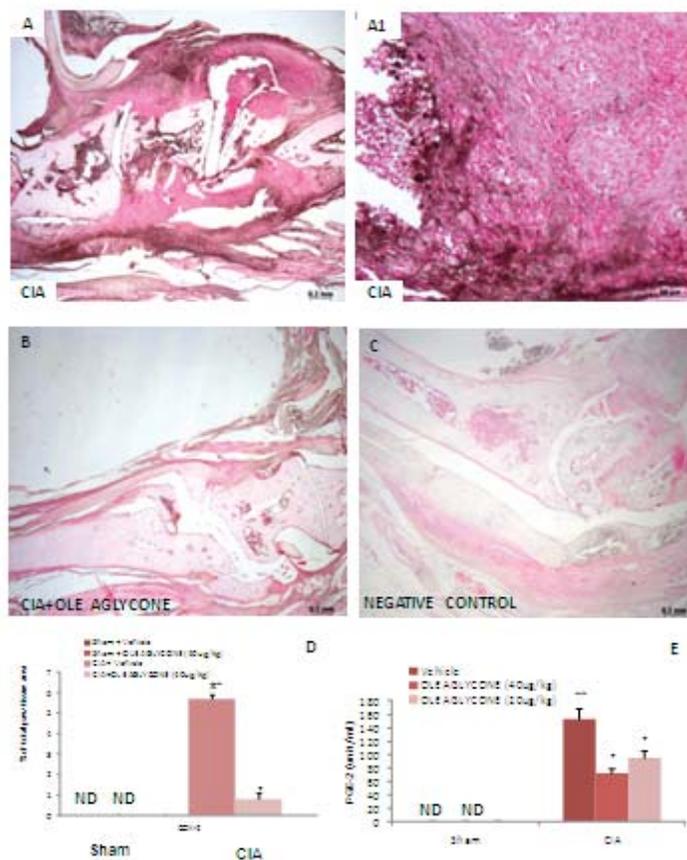
**Figure 7**

Morphological changes of CIA. Representative hematoxylin and eosin-stained section of joint was examined by light microscopy. The histological evaluation (on day 35) of joint from CIA-control mice (B and G) revealed signs of severe arthritis, with inflammatory cell infiltration and bone erosion. The histological alterations of the joint were significantly reduced in the tissues from CIA-3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg)-treated mice (C and G). Masson's trichrome stain reveals decreased collagen in bone and cartilage of arthritic joint due to bone erosion and cartilage degradation in CIA-control mice (E and G). The alterations of joint were significantly reduced in 3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg)-treated mice (F and G). There was no evidence of pathology in the sham-control mice (A, D, and G). The histological score (G) was made by an independent observer. The figure is representative of at least three experiments performed on different experimental days. Values are means  $\pm$  S.E.M. of 20 animals for each group. \*\*,  $P < 0.01$  versus sham-control; °,  $P < 0.01$  versus CIA.



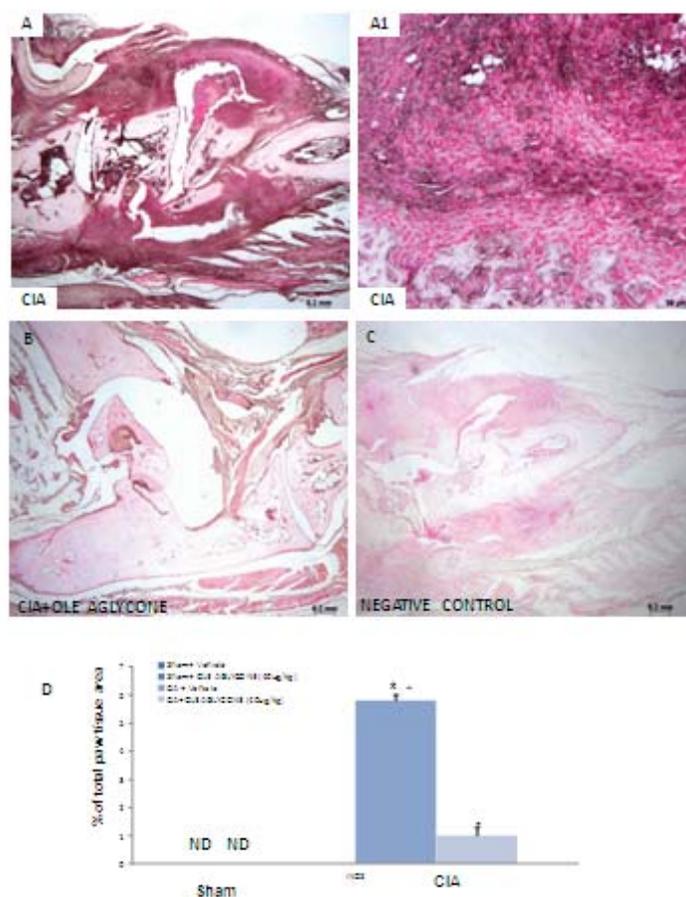
**Figure 8**

Effect of 3,4-DHPEA-EA treatment on cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. A substantial increase in the expression of MIP-1(A), MIP-2 (B), MPO activity (F), plasma TNF- $\alpha$ (C), IL-1 $\beta$  (D), and IL-6 levels (E) was found in CIA-control mice 35 days after CII immunization. CIA-3,4-DHPEA-EA mice demonstrated a significant reduction in the expression of MIP-1(A), MIP-2 (B), MPO activity (F), plasma TNF- $\alpha$  (C), IL-1 $\beta$  (D), and IL-6 levels in a dose-dependent manner (E). Values are means  $\pm$  S.E.M. of 20 animals for each group. \*\*, P < 0.01 versus sham control;  $\circ$ , P < 0.01 versus CIA-control. ND, not detectable.



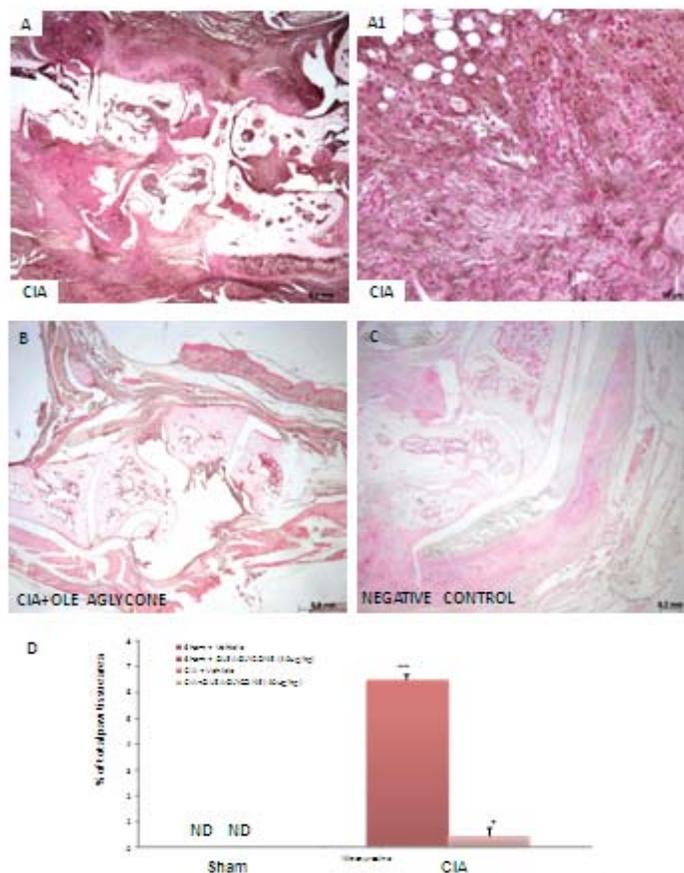
**Figure 9**

Effect of 3,4-DHPEA-EA treatment on COX-2 immunostaining and on serum PGE<sub>2</sub> levels. A marked increase in COX-2 (A and in particular A1) staining was evident in the paw 35 days after initiation of CIA. There was a marked reduction in the immunostaining for COX-2 (B) in the paw of CIA-3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg) mice. To verify the binding specificity for COX-2, some sections were also incubated with only the secondary antibody (no primary antibody). No positive staining for COX-2 was found in the sections indicating that the immunoreaction was positive (see negative control C). In addition, a marked increase of PGE<sub>2</sub> levels was found in the serum of CIA control mice 35 days after CIA immunization (E). The treatment with 3,4-DHPEA-EA also caused a significant reduction in a dose-dependent manner of the serum levels of the metabolite of COX-2 (E). The figure is representative of at least three experiments performed on different experimental days. Densitometry analysis of immunocytochemistry photographs ( $n = 5$ ) for COX-2 from paw section was assessed (D). The assay was performed by using Optilab Graftek software on a Macintosh personal computer (CPU G3-266). Data are expressed as a percentage of total tissue area. \*\*,  $P < 0.01$  versus sham control; °,  $P < 0.01$  versus CIA. ND, not detectable.



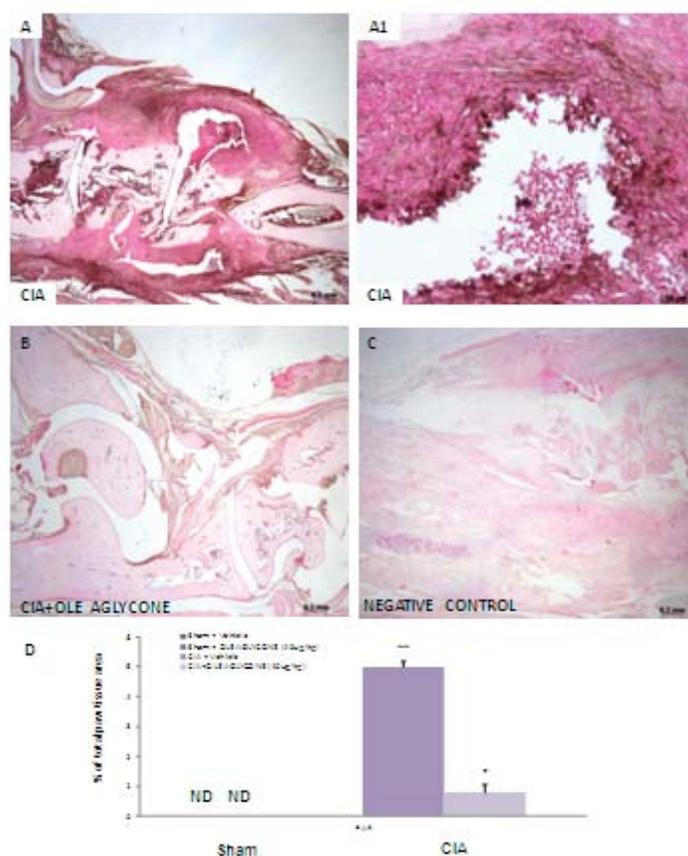
**Figure 10**

Effect of 3,4-DHPEA-EA treatment on iNOS immunostaining. A marked increase in iNOS (A and in particular A1) staining was evident in the paw 35 days after initiation of CIA. There was a marked reduction in the immunostaining for iNOS (B) in the paw of CIA-3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg) mice. To verify the binding specificity for iNOS, some sections were also incubated with only the secondary antibody (no primary antibody). No positive staining for iNOS was found in the sections, indicating that the immunoreaction was positive (see negative control C). The figure is representative of at least three experiments performed on different experimental days. Densitometry analysis of immunocytochemistry photographs (n = 5) for iNOS from paw section was assessed (D). The assay was performed by using OptilabGraftek software on a Macintosh personal computer (CPU G3-266). Data are expressed as a percentage of total tissue area. \*\*, P < 0.01 versus sham-control; °, P < 0.01 versus CIA. ND, not detectable.



**Figure 11**

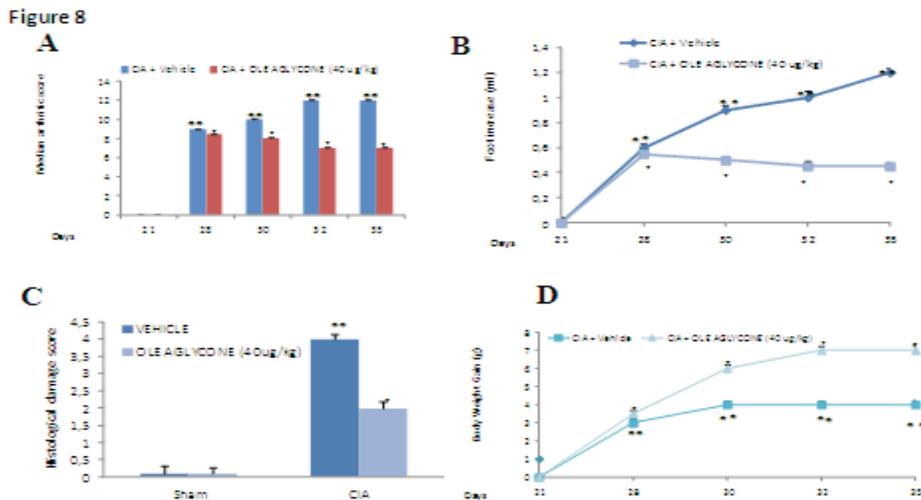
Effect of 3,4-DHPEA-EA treatment on nitrotyrosine immunostaining. A marked increase in nitrotyrosine (A and in particular A1) staining was evident in the paw 35 days after initiation of CIA. There was a marked reduction in the immunostaining for nitrotyrosine (B) in the paw of CIA-3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg)-treated mice. To verify the binding specificity for nitrotyrosine, some sections were also incubated with only the secondary antibody (no primary antibody). No positive staining for nitrotyrosine was found in the sections, indicating that the immunoreaction was positive (see negative control C). The figure is representative of at least three experiments performed on different experimental days. Densitometry analysis of immunocytochemistry photographs ( $n = 5$ ) for nitrotyrosine from paw section was assessed (D). The assay was performed by using OptilabGraftek software on a Macintosh personal computer (CPU G3-266). Data are expressed as a percentage of total tissue area. \*\*,  $P < 0.01$  versus sham control; °,  $P < 0.01$  versus CIA. ND, not detectable.



**Figure 12**

Effect of 3,4-DHPEA-EA treatment on PARP immunostaining. A marked increase in PARP (A and in particular A1), staining was evident in the paw 35 days after initiation of CIA. There was a marked reduction in the immunostaining for PARP (B) in the paw of CIA-3,4-DHPEA-EA (40 mg/kg)-treated mice. To verify the binding specificity for PARP, some sections were also incubated with only the secondary antibody (no primary antibody).

No positive staining for PARP was found in the sections, indicating that the immunoreaction was positive (see negative control C). The figure is representative of at least three experiments performed on different experimental days. Densitometry analysis of immunocytochemistry photographs (n = 5) for PARP from paw section was assessed (D). The assay was performed by using OptilabGraftek software on a Macintosh personal computer (CPU G3-266). Data are expressed as a percentage of total tissue area. \*\*, P < 0.01 versus sham-control; °, P < 0.01 versus CIA. ND, not detectable.



**Figure 13**

Effect of 3,4-DHPEA-EA post-treatment on joint inflammation. Starting the treatment at day 28, we have also demonstrated that 3,4-DHPEA-EA post-treatment (40 mg/kg) caused a significantly lower arthritis score (A) and a reduction of foot increase (B) compared with the CIA-control. In addition, we have also shown a reduction in the histological damage (C) and increased body weight (D) in 3,4-DHPEA-EA-treated mice. Data are expressed as a percentage of total tissue area. \*\*,  $P < 0.01$  versus sham-control; °,  $P < 0.01$  versus CIA.

## Discussion

Rheumatoid arthritis is an inflammatory disease characterized by chronic inflammation of the synovial joints associated with proliferation of synovial cells and infiltration of activated immunoinflammatory cells, including memory T cells, macrophages, and plasma cells, leading to progressive destruction of cartilage and bone (Hitchon and El-Gabalawy 2004). Another central feature of RA synovitis is the transformation of fibroblast-like synovial cells into autonomously proliferating cells with a tissue-infiltrating nature, forming hyperplastic tissue with the potential for bone erosion and cartilage degradation known as pannus (Filippin et al.,

2008). Therefore, it is necessary to establish and characterize experimental animal models to assess cellular and molecular events that contribute to the pathogenesis of joint inflammation. Of interest, CII-induced arthritis in the mouse has proven to be a useful model, because it possesses many of the cellular and humoral immune events found in human rheumatoid arthritis.

Oxidative stress describes an imbalance between ROS synthesis and antioxidants. Many studies have demonstrated a role of ROS in the pathogenesis of inflammatory chronic arthropathies, such as rheumatoid arthritis (Filippin et al., 2008).

In this regard, we investigate here the effects of 3,4-DHPEA-EA, a hydrolysis product of oleuropein, in a mouse model of CII-induced arthritis. Although T-cell and antibody responses against CII are a crucial event for the initiation of CIA (Holmdahl et al., 1989), it has been demonstrated that

several cytokines also appear to direct cell-to-cell communication in a cascade fashion during the progression of CIA such as IL-1 (Hom et al., 1992), TNF- $\alpha$  (Dong et al., 2010), and IL-6 (Ferraccioli et al., 2010). In addition, it has been demonstrated that monocyte chemoattractant protein-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and regulated on activation normal T cell expressed and secreted are differentially chemotactic for lymphocyte subsets and are expressed in tissue from the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis (Koch et al., 1994). In this study, we have confirmed that the cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6) as well as the chemokines (MIP-1 $\alpha$  and MIP-2) are expressed at sites of inflamed joints and probably contribute in different capacities to the progression of chronic joint inflammation. Several cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , are known initiators of the nuclear factor (NF- $\kappa$ B) activation cascade (Filippin et al., 2008) and are under its transcriptional control, constituting a positive feedback loop. Recent studies have observed that the acute consumption of olive oil decreased the activation of the NF- $\kappa$ B system on mononuclear cells from healthy men (Perez-Martinez et al., 2007) and that 3,4-DHPEA-EA, *trans*-resveratrol, and hydroxytyrosol incubated with human umbilical vein endothelial cells inhibit lipopolysaccharide-triggered NF- $\kappa$ B and activator protein-1 activation (Carluccio et al., 2003). Of interest, using 3,4-DHPEA-EA, we have demonstrated an inhibition of the release of proinflammatory cytokines and chemokines and a reduction of leukocyte infiltration measured by MPO activity. Several studies also showed that the potential cardioprotective activity of oleuropein in acute cardiotoxicity induced by doxorubicin treatment was determined in vivo in rats (Andreadou et al., 2007) by inhibiting lipid peroxidation products, decreasing oxidative stress, and reducing iNOS in cardiomyocytes and that the olive oil polyphenols are capable of down-regulating COX-2 expression in colonic cancer cells by a mechanism involving the early inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and downstream inhibition of the transcription factor cAMP response element-binding protein (Corona et al., 2007). We show here that 3,4-DHPEA-EA decreased iNOS and COX-2 expression by immunohistochemical staining and also reduced the levels of the metabolite of COX-2, PGE<sub>2</sub>, in the serum of 3,4-DHPEA-EA treated mice. Reactive nitrogen species, such as the peroxynitrite radical (ONOO $\cdot$ ) generated by the reaction between O<sub>2</sub> $\cdot$  and nitric oxide, can also cause oxidative damage (Soneja et al., 2005). The addition of ONOO $\cdot$  to body cells, tissues, and fluids leads to fast protonation, which may result in the depletion of -SH groups and other antioxidants, oxidation and nitration of lipids, DNA disruption, and nitration and deamination of DNA bases (Filippin et al., 2008). In this report, an intense immunostaining of nitrotyrosine formation also suggested that a structural alteration of joint had occurred, most probably due to the formation of highly reactive nitrogen derivatives ROS produce strand breaks in DNA, which triggers energy-consuming DNA repair mechanisms and activates the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). There is various evidence that the activation of PARP may also play an important role in inflammation (Genovese et al., 2005). Continuous or excessive activation of PARP produces extended chains of ADP-ribose (PAR) on nuclear proteins and results in a substantial depletion of intracellular NAD and subsequently, ATP, leading to cellular dysfunction and, ultimately, cell death (Chiarugi, 2002).

We demonstrate here that 3,4-DHPEA-EA treatment reduced the activation of PARP with a decrease in PAR expression in the joint during CIA. In this regard, several studies demonstrated that hydroxytyrosol, a hydrolysis product of 3,4-DHPEA-EA, also exerts an inhibitory effect on peroxynitrite-dependent DNA base modifications and tyrosine nitration (Deiana et al., 1999). Likewise, Salvini et al. (2006) showed a 30% reduction of oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes during intervention in postmenopausal women with virgin olive oil containing high amounts of phenols. Thus, 3,4-DHPEA-EA, given at the onset of the disease, reduced paw swelling, clinical score, and the histological severity of the disease when injected after the onset of clinical arthritis. Amelioration of joint disease was associated with near to full inhibition of cytokines as well as in-

hibition of neutrophil infiltration, which is a key player in RA. Therefore, 3,4-DHPEA-EA was also administered from day 28 after collagen immunization, targeting this early initiation phase of CIA. Then, with treatment starting at day 28, 3,4-DHPEA-EA post-treatment caused a significant reduction of inflamed joints collected at day 35.

In conclusion, RA is a complex chronic inflammatory disease dependent on multiple interacting environmental and genetic factors, making it difficult to understand its pathogenesis and thereby to find effective therapies. Taken together, the results of the present study enhance our understanding of the role of ROS generation in the pathophysiology of CII-induced arthritis, implying that olive oil compounds such as 3,4-DHPEA-EA may be useful in the therapy of inflammation.

## Overall conclusion

Oxidative stress is described as an imbalance between ROS synthesis and antioxidant system in the mammal body where the normal production of oxidants is counteracted by several antioxidative mechanisms. Food constituents are the normal substrate for energy generation but a hypercaloric diet may result in higher ROS, thus inducing oxidative stress.<sup>16</sup> Epidemiological studies have shown that populations consuming a predominantly olive oil-based Mediterranean-style diet exhibit lower incidences of breast cancer and other chronic diseases than those eating a northern European or North American diet.<sup>5</sup> Habitual high intakes of olive oil, especially virgin olive oil, provide a continuous supply of antioxidants, which may reduce oxidative stress via inhibition of lipid peroxidation, a factor that is currently linked to a host of diseases such as cancer, heart disease, and ageing.

## References

- Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos D T. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:549-558.
- Angerosa F, d'Alessandro N, Corana F, Mellero G. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycones present in virgin olive oil. *J Chromatogr* 1996; 736: 195-203.
- Artajo LS, Romero MP, Morello JR, Motilva MJ. Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds: Evaluation of Their Antioxidant Activity and Their Effect on the Bitter Index. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 6079-6088;
- Avalos I, Chung CP, Oeser A, Milne GL, Morrow JD, Gebretsadik T, Shintani A, Yu C, Stein CM: Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. *Lupus* 2007, 16:195-200.
- Bendini A, Cerratani L, Carasco-Pancorbo A, Gomez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Lerker G. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 2007, 12: 1679-1719.
- Bitler CM, Viale TM, Damaj B, Crea R. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *J Nutr* 2005;135:1475-9.
- Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000;59:13-23.
- Carluccio M A, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanto A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiath-

erogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2003;23:622-629.

Carasco-Pancorbo A, Cerratani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, Lerkker G, Compagnoni D, Fernandez-Gutierrez A. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 8918-8925.

Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol-Pharmacol* 2004;66:683-693.

Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends PharmacolSci* 2002; 23:122-129.

Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessi MA, Spencer JP: Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *BiochemBiophys Res Commun* 2007, 362:606-611.

Covas MI. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology*2008; 16: 216-218.

Cuzzocrea S, Sautebin L, De Sarro G, Costantino G, Rombolà L, Mazzon E, Ialenti A, De Sarro A, Ciliberto G, Di Rosa M, Caputi A P, Thiemermann C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Immunol* 1999;163:5094-5104.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Calabro G, Dugo L, De Sarro A, van De LOO F A, Caputi A P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J RespirCrit Care Med* 2000;162:1859-1866.

Cuzzocrea S, Riley D P, Caputi A P, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135-159.

Cuzzocrea S, Crisafulli C, Mazzon E, Esposito E, Muià C, Abdelrahman M, Di Paola R, Thiemermann C. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Br J Pharmacol* 2006;149:687-702.

de la Puerta R, Martinez-Dominguez E, Ruiz-Gutierrez V. Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z Naturforsch C* 2000;55:814-819.

Deiana M, Aruoma O I, Bianchi M L, Spencer J P, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi M A, Corongiu F P. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free RadicBiolMed* 1999;26:762-769.

Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, Della Pietra V, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biophys Res Commun* 2000; 278: 733-739.

Dong J, Gao Y, Liu Y, Shi J, Feng J, Li Z, Pan H, Xue Y, Liu C, Shen B et al: The protective antibodies induced by a novel epitope of human TNF-alpha could suppress the development of collagen-induced arthritis. *PloS one* 2010, 5:8920.

Edgecombe S C, Stretch G L, Hayball P J. Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J Nutr* 2000;130:2996-3002.

Ebaid G M, Seiva F R, Rocha K K, Souza G A, Novelli E L. Effects of olive oil and its minor phenolic constituents on obesity-induced cardiac metabolic changes. *Nutr J* 2010;9:46.

Esti M, Cinquanta L, La Notte E. Phenolic compounds in different olive varieties. *J Agric Food Chem*. 1998; 46: 32-35.

Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis.

Eur J Cancer Prev 2002; 11: 351-358.

Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Di Saverio C, Morozzi G. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr* 2006; 136: 614-619.

Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fucelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr* 2008; 138: 1411-1426.

Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Toluoso B, De Benedetti F. Interleukin-1beta and Interleukin-6 in arthritis animal models. Roles in the early phase of transition from the acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med* 2010, 16:552-7.

Fialkow L, Wang Y, Downey G P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007;42:153-164.

Filippini LL, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM: Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *ClinExpImmunol* 2008, 152:415-422.

Genovese T, Mazzon E, Muia` C, Patel NS, Threadgill MD, Bramanti P, De Sarro A, Thiemermann C, Cuzzocrea S. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma. *J PharmacolExpTher* 2005; 312:449-457.

Gutierrez-Rosales F, Rios JJ, Gomez-Rey ML. Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 6021-6025.

Hamid Q, Springall D R, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak J M. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342:1510-1513.

Harris ED, Jr.: Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990, 322:1277-1289.

Hitchon CA, El-Gabalawy HS: Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004, 6:265-278.

Holmdahl R, Mo J, Nordling C, Larsson P, Jansson L, Goldschmidt T, Andersson M, Klareskog L. Collagen induced arthritis: an experimental model for rheumatoid arthritis with involvement of both DTH and immune complex mediated mechanisms. *ClinExpRheumatol* 1989; 7:S51-55.

Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Jansson L, Mo JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev* 1990;118:193-232.

Hom JT, Cole H, Estridge T, Gliszczyński VL. Interleukin-1 enhances the development of type II collagen-induced arthritis only in susceptible and not in resistant mice. *ClinImmunolImmunopathol* 1992; 62: 56-65.

Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL: Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 1994, 152:3559-3569

Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Mazarakis DD, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM: Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994; 93:21-928.

Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K: Inhibition of arachidonate lipooxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *BiosciBiotechnolBiochem* 1997, 61:347-350.

Kremastinos DT. Olive and oleuropein. *Hellenic J Cardiol* 2008;49:295-296.

Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Britti D, Cuzzocrea S. The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *ClinNutr* 2011; 30:533-540.

Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Morittu VM, Procopio A, Britti D, Cuz-

- zocrea S. Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *J PharmacolExpTher.* 2011; 339: 859-69
- Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002;40:477-484.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite- induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr* 1997, 127:286-292.
- Menendez J A, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007;7:80.
- Miles E A, Zoubouli P, Calder P C. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005;21:389-394.
- Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1571-1577; *ibidem* 1578-1580.
- Mullane K M, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 1985;14:157-167.
- Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM, Chan CC. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* 1999;128:853-859.
- Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm* 2010;78:133-54.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 647-659.
- Paiva-Martins F, Gordon MH. Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 4214-4219.
- Paiva-Martins F, Fernandes J, Rocha S, Nascimento H, Vitorino R, Amado F, Borges F, Belo L, Santos-Silva A. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53: 609-616.
- Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, Bellido C, Jimenez Y, Moreno JA, Delgado-Lista J, Egido J, Perez-Jimenez F. The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis* 2007;194: 141-146.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995; 78:151-160.
- Procopio A, Alcaro S, Nardi M, Oliverio M, Ortuso F, Sacchetta P, Pieragostino D, Sindona G. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of oleuropein and its semisynthetic derivatives as cyclooxygenase inhibitors. *J Agric Food Chem* 2009;57:11161-11167.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
- Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks P A, Muijsers R B, Nijkamp F P. Peroxynitrite in airway diseases. *ClinExpAllergy* 1998;28:1464-1473.
- Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Rapisarda P, Dederen JC. In vitro antioxidant activity and in vivo photoprotective effect of a red orange extract. *Int J CosmetSci* 1998;20:331-342.
- Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Pitozzi V, Galli C, Romani A, Mulinacci N, Bortolomeazzi R, Dolara P, Palli D. Daily consumption of

a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr* 2006;95:742-751.

Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro GF, Morozzi G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A*. 2004; 1054: 113-27.

Soneja A, Drews M, Malinski T: Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 2005, 57:108-119.

Suárez M, Romero M-P, Macià A, Valls RM, Fernández S, Solà R, Motilva M-J. Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2009; 877: 4097-4106.

Szabo C, Dawson V L. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends PharmacolSci* 1998;19:287-298.

Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ: Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993, 260:355-358.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D: Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003, 348:2599-2608.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 2005; 18: 98-112.

Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995;117:25-32.

Visioli F, Galli C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci* 1994;55:1965-1971.

Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *BiochemBiophys Res Commun* 1998;247:60-64.

Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 2002; 22: 65-75.

Vissers M N, Zock P L, Roodenburg A J, Leenen R, Katan M B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* 2002;132:409-417.

Walter W M, Jr, Fleming H P, Etchells J L. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl Microbiol* 1973;26:773-776.

Wiseman S., Mathot J., de Fouw N., Tijburg L. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 1996;120:15-23.



# Breve rassegna sull'indicazione di origine dell'olio extravergine di oliva

E.Toti

In questo documento verrà illustrata la situazione normativa relativa all'indicazione geografica in etichetta dell'olio extravergine di oliva.

In Italia vigeva la Legge 313 del 3 agosto 1998 relativa a "*Disposizioni per l'etichettatura di origine dell'olio extravergine di oliva, dell'olio di oliva vergine e dell'olio di oliva*" che voleva garantire le ragioni dei produttori ed offrire una forma di tutela per il consumatore attraverso una informazione precisa sull'origine dell'olio commercializzabile. Infatti era previsto che l'olio di oliva, l'olio extra vergine di oliva e l'olio vergine potessero essere venduti con le diciture "*prodotto in Italia*" o altre diciture similari relative all'origine, solo se l'intero ciclo di raccolta, produzione, lavorazione e condizionamento fosse svolto nel territorio nazionale. La normativa italiana creò un contrasto con la normativa comunitaria soprattutto nella fase iniziale della regolamentazione del settore; infatti diversa fu la posizione intrapresa dal Regolamento 2815/1998 recante "*Norme commerciali dell'olio di oliva*", che facendo riferimento al codice doganale comunitario, collegava l'origine del prodotto "*olio*" al luogo ove è sito il frantoio, con ciò spezzando ogni legame con il luogo di coltivazione e produzione delle olive. Ne derivava quindi la possibilità di classificare come "*prodotto in Italia*" un olio ottenuto solo lavorando sul territorio nazionale olive provenienti da Paesi terzi. Con tale regolamentazione avvenne una svalutazione sia dei criteri di trasparenza delle informazioni fornite al consumatore che della valorizzazione dell'identità territoriale del prodotto.

Sul territorio nazionale, il D.M. del 9 ottobre 2007 del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, introduce l'obbligo di indicare l'origine dell'olio di oliva vergine ed extravergine commercializzato in Italia. Il Decreto, ispirandosi proprio al principio comunitario della rintracciabilità degli alimenti, rende obbligatoria l'indicazione in etichetta del Paese di coltivazione delle olive e di quello dove è sito il frantoio. Stabilisce, inoltre, che nel caso di provenienza delle olive da più Paesi, l'etichetta avrebbe dovuto riportare l'elenco di tutti gli Stati membri e/o Paesi terzi di coltivazione, in ordine decrescente per quantità utilizzate. Il provvedimento nazionale fu, tuttavia, oggetto di una dura contrapposizione con la Commissione Europea che lo interpretò come atto protezionistico ed in contrasto con la normativa comunitaria (il Regolamento 1019/2002, che come detto in precedenza, stabiliva come facoltativa l'indicazione dell'origine). Fu pertanto avviata una procedura di infrazione nei confronti del nostro Paese che limitò, fino a sospendere, l'applicazione del citato Decreto.

Un traguardo significativo è stato raggiunto con il Regolamento 182/2009 che, modificando il precedente Regolamento 1019/2002, presenta importanti novità ed è considerato come un'affermazione del *Made in Italy*. Infatti introduce significative modifiche relative all'obbligo di indicare in etichetta l'origine del prodotto, in accordo con la politica italiana che, come accennato, già da tempo aveva reso obbligatoria tale informazione. L'indicazione dell'origine diventa quindi obbligatoria per l'olio extravergine di oliva e per l'olio di oliva vergine, e deve figurare sull'imballaggio e/o sull'etichetta del prodotto, mentre ne rimangono esclusi gli oli di oliva DOP o IGP, disciplinati da una specifica normativa.

Per indicare l'origine nel Regolamento 182/2009 vengono contemplate le seguenti fattispecie:

- olio ottenuto nello stesso Stato Membro di raccolta delle olive: in questo caso è possibile far

richiamo all'origine indicando il nome del Paese seguito da diciture quali "Prodotto in...", "Ottenuto in ...", ma anche indicazioni del tipo "100% prodotto in ...". Il nome dello Stato Membro può essere sostituito da un riferimento alla Comunità;

- olio ottenuto in uno Stato Membro con olive provenienti da altri Stati Membri/Paesi terzi: in questo caso l'indicazione dell'origine deve essere apposta attraverso la seguente dicitura "Olio (extra) vergine di oliva ottenuto in .... da olive raccolte in ...". Anche in questo caso il nome dello Stato Membro può essere sostituito da un riferimento alla Comunità. Nel caso in cui fosse necessario indicare più Stati Membri/Paesi terzi, questi devono essere menzionati in ordine ponderale decrescente in relazione alla quantità apportata;
- miscele di oli comunitari e/o non comunitari: in questo caso le modalità di indicazione dell'origine sono una delle seguenti, da utilizzarsi in relazione alla tipologia di prodotto: "Miscela di oli di oliva comunitari", oppure un riferimento alla Comunità; "Miscela di oli di oliva non comunitari", oppure un riferimento all'origine non comunitaria; "Miscela di oli di oliva comunitari e non comunitari", oppure un riferimento all'origine comunitaria e non comunitaria.

A livello nazionale è stata recentemente pubblicata la Legge n.9 del 14 gennaio 2013, relativa alle norme sulla qualità e la trasparenza della filiera degli oli vergini, legge nata proprio per far fronte alla necessità di una normativa che si contrapponesse al fenomeno del falso *Made in Italy*. In sintesi questa legge prevede un forte inasprimento delle sanzioni per frodi e contraffazioni e nuove norme per le etichette e i marchi ingannevoli. Sebbene questa previsione normativa sia di straordinaria importanza per la tutela del vero *Made in Italy*, si è aperto l'ennesimo contenzioso con la Commissione Europea, la quale ha sospeso l'applicazione di questa importantissima legge almeno fino alla fine del 2013.

### Riferimenti normativi comunitari e nazionali

- Legge 313 del 3 agosto 1998, Disposizioni per la etichettatura d'origine dell'olio extravergine di oliva, dell'olio di oliva vergine e dell'olio di oliva.
- Legge 9 del 14 gennaio 2013, Norme sulla qualità e la trasparenza della filiera degli oli vergini.
- Reg. 2815/1998, relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva.
- Reg. 1019/2002, relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva.
- D.M. del 9 ottobre 2007 del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, relativo alle norme in materia di indicazioni obbligatorie nell'etichetta dell'olio vergine ed extravergine di oliva.
- Reg. 182/2009, che modifica il Regolamento 1019/2002 relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva.

# Certificazione dell'olio di oliva biologico

M. Sciarroni

Foro di Roma

E- mail sciarroni.m@libero.it

L'olio di oliva riveste un ruolo primario nell'ambito della dieta mediterranea, ciò in ragione del suo prezioso ruolo salutistico e di prevenzione di talune malattie croniche. In particolare, negli ultimi anni ha avuto grande risalto la produzione effettuata attraverso il metodo biologico.

Le aziende che adottano tale metodo devono attenersi a specifiche e rigorose norme che assicurano una serie di caratteristiche, tra queste si segnalano: l'assenza di sostanze di sintesi e di additivi nella coltivazione delle olive, l'utilizzo di tecniche volte a mantenere inalterate le proprietà salutari e organolettiche dell'olio, l'uso di olive locali, autoctone, le quali garantiscono l'origine delle stesse e la loro tracciabilità. Appare pacifico, dunque, che i produttori dell'olio biologico debbano rispettare i dettami previsti dal Regolamento CE 834/2007 e dal Regolamento di Attuazione 889/2008 in tema di produzione e di commercializzazione di prodotti biologici. La mancata conformità alle disposizioni suindicate determina, ai sensi dell'articolo 23 del Reg. CE del 2007, l'impossibilità di avvalersi del termine " biologico" e suoi similari. Detto ciò risulta fondamentale il controllo inerente il rispetto della predetta normativa. A tale proposito ciascun Stato dell'Unione Europea è tenuto ad adottare un complesso sistema di ispezioni che garantiscano e vigilino sull'osservanza dei dettami di legge.

Al proposito, si osserva che prima di immettere sul mercato un prodotto biologico, nel nostro caso l'olio, è richiesta una certificazione regolamentata che documenti e attesti la produzione biologica dello stesso.

Anteriormente alla predetta immissione tutti i produttori, nonché coloro i quali immagazzinano e importano l'olio biologico devono notificare all'Autorità competente la propria attività e, si ribadisce, sottoporre lo stesso olio al controllo certificativo e, quindi, assoggettarsi al sistema previsto secondo le modalità illustrate dall'articolo 27 del Reg. CE 834/2007. Tale articolo stabilisce che tutti gli Stati membri designino le Autorità competenti quali soggetti responsabili dei controlli volti al rilascio della certificazione.

Le stesse Autorità possono poi delegare le proprie competenze ad organismi pubblici o privati.

Quest'ultimi rivestono il ruolo di certificatori terzi, obiettivi e imparziali. Siffatti soggetti devono possedere, oltre una specifica esperienza, anche le attrezzature necessarie per svolgere accuratamente i compiti loro delegati, nonché disporre, altresì, di personale tecnico e qualificato in grado di esercitare adeguatamente le proprie funzioni. Gli organismi certificatori devono essere accreditati in base ai requisiti previsti dall'Unione Europea e secondo lo Standard EN45011. Sono, inoltre, obbligati a comunicare e a trasmettere regolarmente le risultanze dei controlli e delle ispezioni alla competente Autorità al fine del suo costante aggiornamento. In capo alle medesime Autorità permane un potere di vigilanza e di verifica sull'attività posta in essere dagli organismi delegati, con particolare riguardo al fatto che le ispezioni debbano essere realizzate in maniera indipendente e libera.

Speciale attenzione è rivolta agli organismi privati di controllo per i quali viene stabilito che la delega debba prescrivere dettagliatamente le attività e le modalità operative dei stessi.

In merito all'olio biologico gli accertamenti e le ispezioni suindicate si articolano in varie fasi, ovvero: controllo del terreno e relative analisi di laboratorio allo scopo di assicurare l'utilizzo di

sostanze naturali nella coltivazione; controlli dei frantoi e delle sue strutture, nonché controlli al momento dell'imbottigliamento. Soltanto all'esito positivo di tali ispezioni l'organismo accreditato rilascia la certificazione di cui il consumatore viene edotto attraverso l'etichetta.

### **Bibliografia**

**Reg. CE 834/2007;**

**Reg. di Attuazione 889/2008;**

**eu.europa.eu**

[www.aiab.it](http://www.aiab.it)

[www.accredia.it](http://www.accredia.it)

# Storia, miti e leggende dell'olio d'oliva

R. Pellati

Fra gli alimenti che caratterizzano la dieta Mediterranea, l'olio extravergine di oliva è senz'altro in cima alla graduatoria.

Il merito di aver valorizzato questo alimento presso la comunità scientifica mondiale è del fisiologico americano Ancel Keys il quale alla fine degli anni '50, grazie alle ricerche effettuate di carattere epidemiologico (Seven Country Study), ha messo a confronto le diete di 7 paesi (Stati Uniti, Finlandia, Olanda, Italia, Grecia, in particolare isola di Creta, ex Jugoslavia, Giappone) ed è giunto alla conclusione che il modello alimentare mediterraneo è quello più adatto per intervenire positivamente nella maggior parte delle malattie dell'epoca contemporanea rappresentante soprattutto da quelle metaboliche e degenerative.

A questo proposito ricordo che nel piccolo e bellissimo borgo marino di Pioppi (nel Cilento, a sud di Salerno) è stato aperto il Museo della Dieta Mediterranea (ospitato nel secentesco Palazzo Vinciprova), che accoglie la biblioteca di Ancel Keys, dove il ricercatore della Minnesota University ha vissuto per circa 40 anni.

Un altro luogo che merita essere visitato per conoscere meglio la storia e le caratteristiche dell'olio di oliva è il "Museo dell'Olivio" situato in Liguria nella città di Imperia - Oneglia (Via Garessio 13), realizzato dall'Oleificio Carli

L'olivo è stata la prima pianta che l'uomo ha imparato a coltivare circa 6.000 anni fa. Il motivo di questo interesse è dovuto al fatto che l'olio d'oliva è stato usato, oltre che per l'alimentazione, come unguento per gli atleti, come medicina per le ferite e per regolarizzare l'alvo, come prodotto di bellezza, come combustibile per rischiarare il buio della notte. Di conseguenza l'uomo ha sempre dedicato particolari attenzioni a questo arbusto che inizialmente era una specie selvatica e spinosa: grazie alla selezione genetica e agli esperti in agricoltura si sono ottenute le attuali varietà di maggior resa.

Citiamo la Coratina pugliese, la "bella di Cerignola", la Ascolana di Ascoli Piceno, la Frantoio e la Moraiolo dell'Italia centrale, la Taggiasca ligure.

L'Italia è il maggior produttore mondiale di olio di qualità. Altri grandi produttori sono la Spagna, la Grecia, la Tunisia.

## Leggende e realtà

Ovviamente, per un albero così prezioso come l'olivo fiorirono le leggende più strane, coinvolgendo anche gli dei dell'Olimpo. Si dice infatti che Zeus, padre degli dei, avesse proclamato una gara fra i suoi figli. Chi offriva alla Grecia il dono più utile avrebbe avuto in premio Atene e tutta la regione dell'Attica. Le proposte furono numerose ma, per vari motivi, vennero tutte scartate meno due presentate a concorrenti eccezionali: Atena dea della sapienza e Poseidone dio del mare. Quest'ultimo fece sbucare dalle foreste uno splendido cavallo, mentre Atena trasse dalla terra un nuovo albero: l'olivo. A questo punto Zeus non ebbe esitazione: il nuovo albero sarebbe stato per gli uomini più prezioso del cavallo.

Di conseguenza Atena vinse la gara e l'olivo crebbe sull'Acropoli. A chi danneggiava l'ulivo spettava l'esilio e la confisca dei beni.

Anche i Romani tenevano in grande considerazione l'olivo e trasformarono in oliveti intere provincie della Spagna e dell'Africa settentrionale. Ancora oggi i subacquei trovano nel Mar Mediterraneo navi romane cariche di anfore olearie affondate da improvvise tempeste.

Nei secoli bui e fino all'anno Mille le aree di coltivazione dell'olivo si restringono progressivamente: saranno i monasteri (dove l'olio era indispensabile allo svolgimento dei riti cristiani) che daranno impulso alle coltivazioni studiando e interpretando i trattati di agronomia dell'antica Roma.

In epoca recente va segnalata la scoperta fatta nel 1929 dai coniugi Burr i quali evidenziarono negli animali da esperimento che una dieta priva di lipidi provoca distrofia della pelle, deficit di accrescimento, lesioni ai reni e decadimento dello stato generale. Ricerche successive dimostrarono che l'organismo umano ha bisogno di grassi in opportune dosi poiché in essi sono presenti vitamine liposolubili (A-D-E-K) e particolari acidi grassi definiti "essenziali" (acido linoleico, linolenico, arachidonico) indispensabili per un corretto funzionamento delle membrane cellulari e per numerosi processi metabolici.

La Scienza dell'Alimentazione ha potuto dimostrare che le caratteristiche fondamentali che fanno prediligere l'olio d'oliva rispetto ad altri condimenti grassi sono dovute essenzialmente alla presenza di un ottimale rapporto fra acido oleico e acido linoleico, alla ricchezza di vitamina E e di polifenoli antiossidanti molto utili per combattere l'eccessiva produzione dei "famigerati" radicali liberi responsabili di molti guai al nostro organismo.

Per quanto riguarda la coltivazione dell'olivo, in migliaia di anni è cambiato poco. La tradizione attribuisce all'olivo la fama di albero immortale perché alla naturale longevità del suo tronco principale possiede la capacità di rigenerarsi a partire dalle sue radici raggiungendo così età plurimillenarie. Sono celebri, tra gli altri, gli olivi dell'orto di Getsemani ricordato nella narrazione evangelica. Ieri come oggi bisogna piantare l'olivo e attendere decenni prima che dia i frutti. La raccolta delle olive si pratica con la "brucatura" (raccolta manuale) con la "bacchiatura" (con un bastone si colpisce la chioma) con le "reti" (stesa a terra) con un braccio meccanico per scrollare la pianta. Successivamente le olive vanno al frantoio per l'estrazione dell'olio, la centrifugazione e la filtrazione.

Per dovere di cronaca citiamo l'introduzione delle mole di pietra per la frangitura, il frantoio a mole verticali rotanti, l'invenzione della "pressa a vite verticale", le macchine a pressione idraulica, i perfezionamenti della centrifugazione, della percolazione, della raffinazione. Tutti "marchingegni" che hanno portato mano a mano a sostituire il mortaio, la pigiatura, le vasche di acqua calda, agli attuali sistemi di produzione ad elevata meccanizzazione, alla correzione dei livelli di acidità elevati e all'estrazione tramite solventi (normalmente esano) dell'olio residuo dalle "sanse" frammenti solidi che rimangono dopo la spremitura).

Nella classificazione merceologica degli oli lo scalino più alto è dato dall'olio extravergine di oliva (quello che non subisce trattamenti chimici), segue l'olio d'oliva (miscela di olio con extravergine) e per ultimo quello di sansa.

La raccolta delle olive verdi viene fatta prima che il frutto (drupa) giunga a maturazione. In questa fase il frutto è amaro quindi si procede con idrossido di sodio o di potassio alla "deamarizzazione". Le olive nere da mensa vengono selezionate ad uno stadio più avanzato di maturazione e poi conservate in salamoia (questo sistema viene detto "alla greca") oppure destinate alla produzione di olio.

L'olivo predilige le zone del clima mite o caldo.

Per questo motivo il Piemonte e la Valle d'Aosta sono le uniche regioni che non producono olio.

L'aria mitigata dei grandi laghi (Garda in particolare) fanno sì che in queste regioni dispongano di piccole aree di produzione. Niente a che vedere con la Puglia che produce il 50% circa dell'olio consumato in Italia.

C'è una leggenda anche per il colore delle foglie dell'olivo che sono chiare da una parte e scure

dall'altra: Ercole, figlio di Zeus, scese negli inferi con il capo cinto da un ramo dell'olivo, la parte delle foglie che aderivano alla fronte imperlata di sudore si scolorirono, quelle rivolte all'esterno si scurirono per effetto dei fumi e delle fiamme.

Stranamente davanti all'immagine dell'olivo pochi pensano alla produzione di olio: l'inconscio collettivo si riallaccia al mito della pace, della saggezza, del paradiso perduto. Infatti quando Picasso cerca un simbolo universale della pace, pensa al ramo di olivo portato dalla colomba.

## I consumi di olio nell'antica Roma

Gli antichi dicevano che il Mediterraneo comincia e finisce là dove è possibile la coltura dell'ulivo, per indicare il legame intimo tra la pianta e l'area geografica, considerata un'unità organica e ben distinta dalle province fredde e umide che cominciavano a Nord e dalle zone desertiche e aride del Sud.

L'albero dell'ulivo fu sempre tenuto in grande considerazione non solo per l'apporto calorico e nutritivo, ma anche per la sua natura di pianta resistente e longeva. Per i Greci era il nettare degli Dei, per gli Egizi era il dono della Dea Iside, per i Romani era simbolo di purificazione.

Oltre ai coloni Greci, furono i Fenici che contribuirono a diffondere la coltivazione dell'ulivo nell'Italia meridionale e in Spagna fin dall'VIII secolo a.C.

I Romani furono grandi consumatori di olio e, di conseguenza apportarono perfezionamenti nella tecnologia, nella coltivazione, nella raccolta e nella lavorazione delle olive, come testimoniano le opere latine di agronomia scritte a partire dal II secolo a.C. da autori come Catone, Columella, Plinio. La presenza nell'antica Roma dell'elevato commercio e consumo di olio d'oliva è testimoniata dalle anfore accatastate nella zona del "Testaccio". Le statistiche dicono che nell'età imperiale sarebbero arrivate a Roma circa 320.000 anfore di olio all'anno, equivalenti a 22.480 tonnellate, ossia 22 chili a testa. Di conseguenza, ogni abitante di Roma (a quei tempi circa un milione) avrebbe consumato in media circa due litri di olio al mese. Ovviamente va tenuto conto che a quei tempi l'olio non era utilizzato solo ai fini alimentari: veniva impiegato in medicina, igiene, illuminazione, cosmesi, meccanica. Per fare un raffronto bisogna tener presente che oggi in Italia i consumi si aggirano sui 14 Kg a testa all'anno.

Il "Testaccio" è una collina artificiale esistente ancora oggi di oltre 40 metri di altezza e due ettari di estensione, sorta tra il I e il III secolo nei pressi del porto sul Tevere. Questa collina si è sviluppata con i cocci delle anfore spagnole che venivano rotte dopo il consumo dell'olio: quindi può essere definita il monumento all'olio betico, cioè della Spagna meridionale (chiamata Betica).

Le anfore riportano i nomi dei commercianti (negotiatores) dediti a questa attività. Erano convenzionati con l'annona, e da questa ricompensati con vari privilegi.

Con Settimio Severo il traffico dell'olio subì un mutamento radicale: il trasporto venne assunto direttamente dall'imperatore e dai suoi figli e, successivamente dal solo Caracalla. Di conseguenza il trasporto e la distribuzione dell'olio era gestito dall'autorità pubblica e non lasciava a nessuno i notevoli proventi.

La quantità di olio betico (iniziata in età augustea) crebbe progressivamente fino a toccare il massimo intorno al 250 d.C. Dal 260 d.C. iniziò a calare, in coincidenza con le invasioni che devastarono il Mediterraneo occidentale. Le importazioni ebbero una ripresa dopo il 300 d.C. con Aureliano e terminarono definitivamente nel secolo successivo. Per soddisfare i consumi, inizialmente l'olio arrivò dall'Africa proconsolare (Tunisia) e dalla Tripolitania, poi aumentò fino a rappresentare nel III secolo il 10-15 % dei consumi totali. Anche queste variazioni delle importazioni sono documentabili esaminando le anfore del Testaccio.

## Sport, cosmesi e olio d'oliva

Nell'antica Grecia il sapone non era conosciuto e l'uso dell'olio era l'unico mezzo per mantenere la pelle pulita ed elastica. Gli atleti "professionisti" avevano notato che spalmando olio d'oliva sul corpo potevano sfuggire alla presa dell'avversario nelle lotte corpo a corpo, e potevano sopportare meglio le contusioni e gli sforzi fisici (senza conoscere, l'azione antinfiammatoria dei componenti fenolici !). Gli eroi e i cavalli descritti dai canti epici venivano unti con l'olio d'oliva per ottenere un'energia ultraterrena.

Sin dalla prima Olimpiade (776 a.C.) veniva consegnato ai vincitori un ramo d'ulivo, come segno di "armistizio" che si stabiliva tra le città quando si verificavano contestazioni e guerre. Agli atleti più importanti veniva data un'anfora piena di olio (detta "amphora panathenaica"). I campioni olimpici che oggi verrebbero premiati con la medaglia d'oro, ricevevano a quei tempi anfore d'olio di prima qualità in dosi decisamente superiori ai fabbisogni di un anno, tanto che questi soggetti vendevano gran parte del dono per ricavare notevoli guadagni. Di conseguenza i più ricchi commercianti d'olio nell'ambito greco furono proprio ex campioni olimpionici.

La guarigione del corpo e la salvezza dell'anima sono state per secoli possibili in virtù del ricorso all'olio ricavato dalle olive. Questo almeno nella considerazione popolare, ma a credere fortemente nelle proprietà guaritrici dell'olio erano in realtà un po' tutti, senza distinzione. Le lampade votive, per esempio, costituivano il mezzo attraverso cui i santoni, i guaritori, i ciarlatani e i taumaturghi esplicavano i loro poteri carismatici. La somministrazione di olio crudo veniva praticata in numerose patologie: ustioni, pruriti, punture di insetti, disturbi dell'apparato digerente, infezioni, caduta dei capelli e morsi di vipera..

Nella cosmesi quotidiana delle fasce sociali privilegiate, i cosmetici a base di olio avevano molto successo. Anche i riti dell'ospitalità e del "bon-ton" imponevano l'offerta di unguenti profumati a base di olio al visitatore, perché questi potesse degnamente ristorarsi.

Le unzioni venivano praticate nei rituali religiosi a scopo purificatorio, ed erano indispensabili nella preparazione delle salme e nelle cerimonie funebri.

Alcuni affreschi murali provenienti da Pompei e da Ercolano mostrano le tecniche di preparazione degli unguenti profumati. L'olio, ottenuto dalla macinazione delle olive, veniva mescolato con le erbe aromatiche, pestate a loro volta nel mortaio. Grazie alla sua attitudine ad assorbire gli odori, l'olio ne risultava gradevolmente profumato e apprezzato per la cura del corpo sia femminile che maschile.

I Romani distinguevano 5 qualità di olio, delle quali la più pregiata era "l'oleum ex albis ulivis" (ottenuto dalla spremitura delle olive verdi), "l'oleum viride" proveniente dalle olive raccolte ad uno stato più avanzato di maturazione, "l'oleum maturum" da olive mature, "l'oleum cibarium" ottenuto da olive quasi passite) riservato alla plebe e agli schiavi.

Catone il Censore nel suo "De agricultura" ci dà anche una ricetta per gustare le olive: "Prepara un piatto di olive verdi e nere, leva i noccioli, tritale e aggiungi olio, aceto, coriandolo, finocchio, ruta e menta. Riponilo in un oriole e copri il tutto con olio e aceto e servile così condite".

## Simbolismo dell'olio

I popoli mediterranei crearono intorno all'albero dell'ulivo leggende e simboli ispirati alla bontà del frutto, alle proprietà nutritive, alle caratteristiche chimico-fisiche. L'olio d'oliva era considerato foriero di luce divina, di potenza intellettuale, in quanto riusciva indispensabile per accendere e illuminare le lampade, quindi assimilato alla luce e capace di rendere visibile e chiaro il cammino

terreno dell'uomo. Per le sue proprietà depurative e calmanti l'olio fu considerato simbolo di purificazione.

Nell'antica Roma, il ramo di olivo era il simbolo della dea "Pax". Gli ambasciatori portavano in mano rami d'olivo con bende di lana, per implorare simbolicamente pace e protezione, anche se i soldati portavano corone di rami d'olivo nei cortei trionfali perché la dea "Atena" (Minerva per i latini) era anche la Dea della guerra. Che l'ulivo fosse un simbolo di pace sin dai tempi più antichi si evince dal celebre episodio della colomba che torna all'Arca di Noè tenendo nel becco un rametto d'ulivo. La colomba annuncia la fine del diluvio e la rinnovata pace con Dio: " ed essa tornò a lui sulla sera portando in bocca un ramoscello d'olivo con verdi foglie" (Genesi, 7.11). Un'altra citazione ci appare nel Paradiso terrestre descritto nel Purgatorio di Dante Alighieri, quando descrive l'apparizione di Beatrice, cinta da una ghirlanda d'ulivo.

Nella tradizione cristiana da secoli è usato l'olio di oliva per la celebrazione di alcuni Sacramenti quali Battesimo, Cresima, ordinamento sacerdotale e vescovile, unzione dei malati (viatico), nel rituale di incoronazione dei re. La consacrazione dei re francesi si faceva con l'unzione di olio di oliva vergine contenuto nella santa ampolla portata da una colomba a San Dionigi quando battezzò il re Clodoveo.

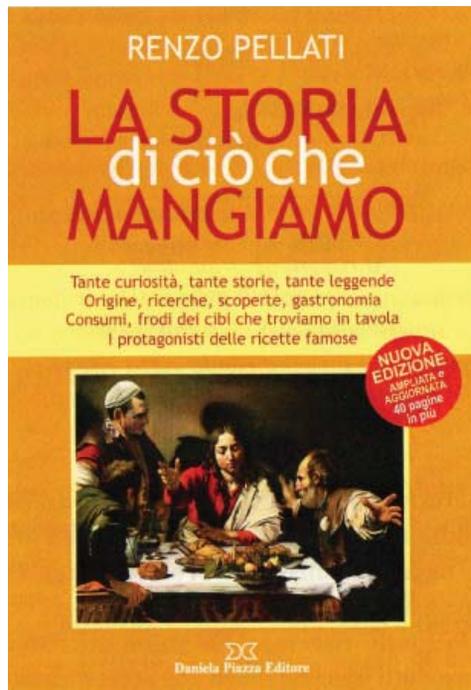
La tradizione vuole che l'olivo sia una delle tre piante, insieme al cedro e al cipresso, con cui fu fatta la Croce di Cristo.

La caduta dell'impero romano e le invasioni barbariche (V secolo d.C.) portarono in seguito ad un progressivo declino dell'olivo, la cui coltivazione rimase quasi esclusivamente presso i monasteri per le necessità del culto e dell'illuminazione. In particolare i Benedettini devoti al credo della preghiera e al lavoro, persuadevano i contadini a non abbandonare le terre e a dedicarsi alla coltivazione delle olive. Infatti "Benedettina" è la congregazione degli "Olivetani" fondata nel 1313 presso Monte Oliveto Maggiore (provincia di Siena). Anche Bernardo Chiaravalle, il grande animatore dei Cistercensi, insegnava ai contadini a coltivare l'ulivo per rendersi indipendenti dallo stato di sottomissione in cui varie volte si trovavano. L'olio consacrato, distribuito nelle varie chiese, doveva durare tutto l'anno ed in caso di carenza ci si doveva rivolgere esclusivamente al Vescovo.

Tra Medioevo e Rinascimento vi sarà un certo scambio di prodotti fra Paesi mediterranei produttori di olio d'oliva e Paesi nordici prevalentemente produttori di burro. Ma nell'Europa meridionale questo non prenderà mai il sopravvento sull'olio d'oliva che continuerà a rappresentare circa l'85% dei grassi impiegati nell'alimentazione. Va però rilevato che nelle aree contadine molto povere del Centro e del Nord Europa, ove nei giorni di Quaresima era precluso l'uso del burro, la Chiesa consentì ai contadini di servirsene ugualmente, in quanto l'olio di oliva era per loro troppo costoso.

**Citazioni tratte dal volume "La storia di ciò che mangiamo" di Renzo Pellati - Daniela Piazza editore - Torino ([www.danielapiazzaeditore.com](http://www.danielapiazzaeditore.com)).**





## La Storia di ciò che Mangiamo

Di Renzo Pellati

ISBN 978-88-7889-279-8

Anno di pubblicazione: 2013

Pagine: 396 pagine

Prezzo: € 28,00

Daniela Piazza Editore

In televisione, nelle riviste e nei quotidiani le rubriche alimentari sono diventati elementi fondamentali del palinsesto. Tuttavia, nonostante questo grandissimo interesse al mondo dell'alimentazione il consumatore è scarsamente informato sui prodotti che quotidianamente consuma e che porta a tavola.

Il legame tra Scienza dell'Alimentazione e Salute è strettamente collegato ed è dimostrato da diverse pubblicazioni scientifiche. In un periodo in cui si parla continuamente di Nutrigenomica e Novel Food, delle volte si dimentica la base della nostra Scienza. La storia degli alimenti è alla base della nostra vita, perché lo sguardo al passato ci fa vedere il futuro con occhi diversi.

L'autore di questo libro, Prof. Renzo Pellati,

Specialista in Scienza dell'Alimentazione e studioso di Nutrizione Umana e di cultura alimentare, ha svelato con amore sapiente per questa Scienza tantissime curiosità, storie e leggende legate agli alimenti che spesso troviamo nei nostri piatti.

La "Storia di ciò che Mangiamo, Nuova Edizione" è un libro ricco di storie, di aneddoti e notizie che aiutano a comprendere la reale natura dell'uomo ed a comprendere l'evoluzione degli abitudini alimentari che cambiano nel tempo. E' molto curioso e divertente conoscere l'origine di alcuni nomi che fanno parte dei menù quotidiani, come: La salsa bechamel, la torta Saint Honoré, la coca-cola, la maionese, il marsala e i sandwich.

Per questo il libro "La "Storia di ciò che Mangiamo", Nuova Edizione ampliata e aggiornata, è un'opera che la redazione Foson vuole consigliare a professionisti, studenti ed a persone interessate ad approfondire le fonti storiche ed antropologiche degli alimenti accrescendo il desiderio di conoscenza per gli alimenti abitualmente consumati.

Recensione a cura della Dott.ssa Angela Iapello, Capo Redattore della Rivista di Scienza dell'Alimentazione

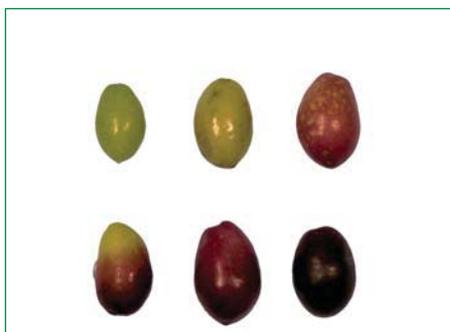


*Caratterizzazione morfologica e bio-agronomica delle cultivar campane di olivo*

**SCHEDE  
VARIETALI**

## ASPRINIA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



**ALBERO**

Vigoria	Alta
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Elevata

**FOGLIA ADULTA**

Forma	Ellittica (L/I < 4)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Corta (< 5 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)

**INFIORESCENZA**

Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Medio (18-25)

**FRUTTO**

Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Appuntito
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole

**ENDOCARPO**

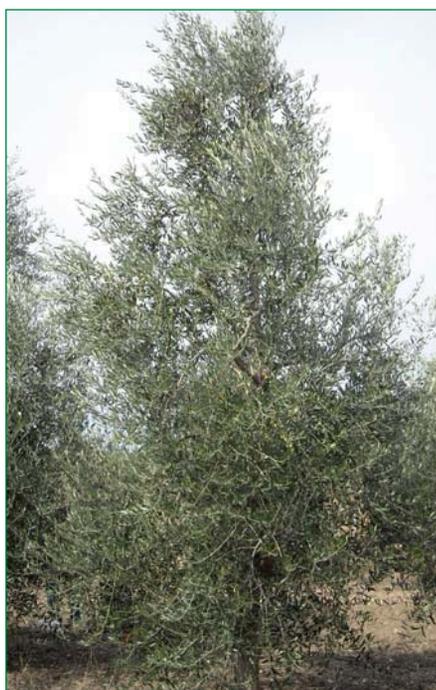
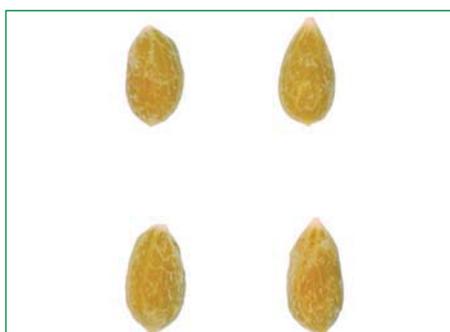
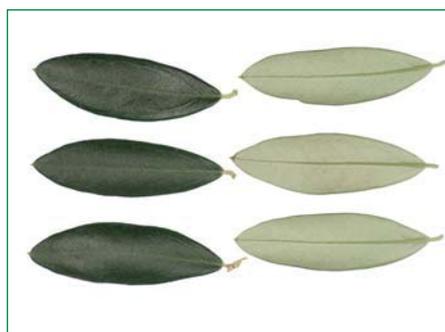
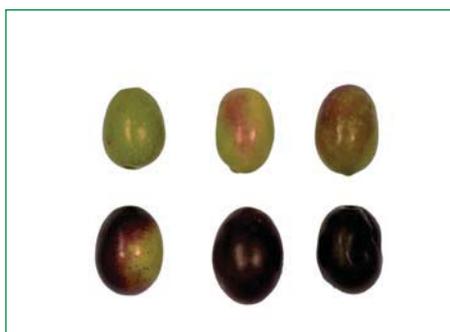
Forma	Ellittica (L/I > 1,8-2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Apicale
Superficie	Liscia
Solchi fibrovascolari	Poco numerosi (<7)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Appuntita
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Asprinia - OLVIVA-CA02" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## BIANCOLILLA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Pendolo
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Larga (> 1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Lunga (> 35 mm)
N° fiori	Alto (> 25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaura (epoca di)	Tardiva
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ellittica (L/I > 1,8-2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Arrotondata
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Biancolilla - OLVIVA-CA16" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## CAIAZZANA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



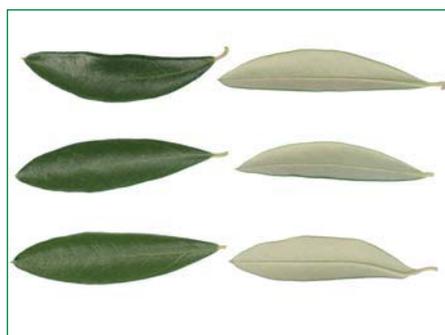
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Elevata
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Media (18-25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Ellittica (L/I= 1,25-1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Grandi
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ellittica (L/I > 1,8-2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Troncata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Caiazzana - OLVIVA-CA07" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## CARPELLESE

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



**ALBERO**

Vigoria	Alta
Portamento	Pendulo
Densità della chioma	Elevata

**FOGLIA ADULTA**

Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Lunga (> 7 cm)
Larghezza	Larga (> 1,5 cm)

**INFIORESCENZA**

Lunghezza media	Lunga (< 35 mm)
N° fiori	Media (18-25)

**FRUTTO**

Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaura (epoca di)	Tardivo
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole

**ENDOCARPO**

Forma	Ellittica (L/I > 1,8-2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Troncata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Carpellese - OLVIVA-CA10" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## CORNIA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



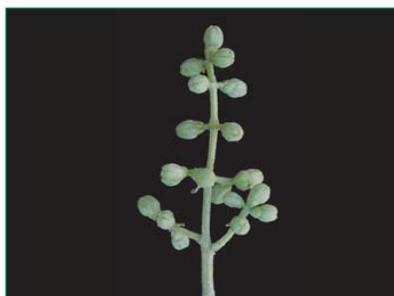
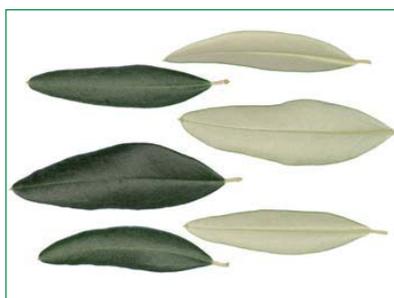
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Corta (< 25 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaura (epoca di)	Tardivo
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Appuntito
Umbone	Presente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Allungata (L/I > 2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Poco numerosi (< 7)
Andamento solchi fibrovascolari	Irregolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Appuntita
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Cornia - OLVIVA-CA04" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## FEMINELLA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



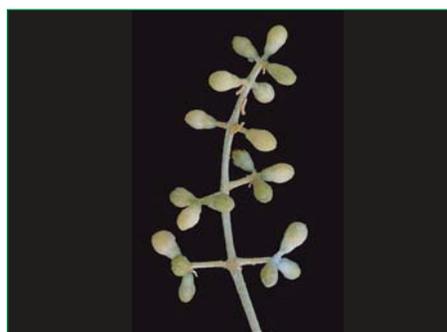
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Bassa
Portamento	Espanso
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittica (L/I < 4)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaura (epoca di)	Precoce
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Grandi
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ellittica (L/I > 1,8-2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Molto numerosi (> 10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Arrotondata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).

## OGLIAROLA CAMPANA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



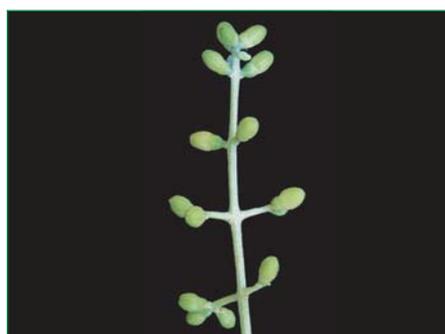
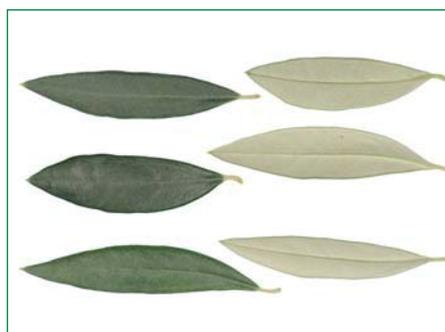
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Medio (18-25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaura (epoca di)	Precoce
Forma	Ellittica (L/I=1,25-1,45)
Simmetria	Asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ellittica (L/I=1,8-2,2)
Simmetria	Asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Liscia
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Appuntita
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Ogliarola - OLVIVA-CA09" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## OLIVA BIANCA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



ALBERO	
Vigoria	Media
Portamento	Espanso
Densità della chioma	Media
FOGLIA ADULTA	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
INFIORESCENZA	
Lunghezza media	Corta (< 25 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
FRUTTO	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaura (epoca di)	Media
Forma	Ellittica (L/I=1,25-1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Presente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
ENDOCARPO	
Forma	Ellittica (L/I=1,8-2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Troncata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).

## ORTICE

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



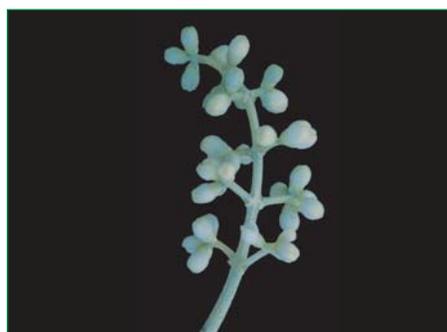
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Corta (< 25 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaatura (epoca di)	Tardiva
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Presente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Grandi
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Allungata (L/I > 2,2)
Simmetria	Asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Liscia
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Limitata
Forma della base	Appuntita
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Ortice - OLVIVA-CA13" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## ORTOLANA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



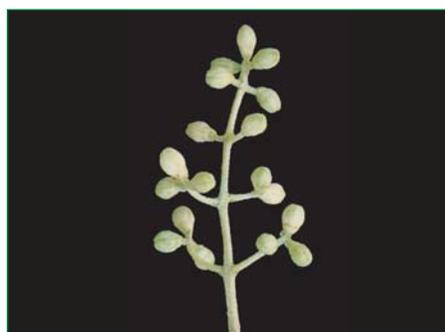
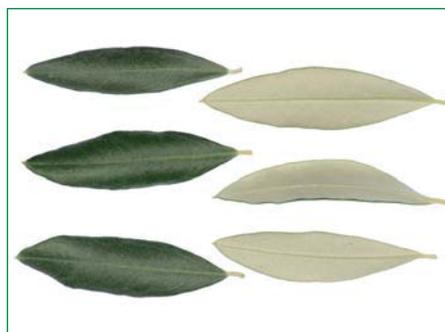
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Espanso
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I < 4)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Corta (< 25 mm)
N° fiori	Medio (18-25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Sferica (L/I < 1,25)
Simmetria	Simmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Alto (4-6 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ovoidale (L/I= 1,4-1,8)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Molto numerosi (> 10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Elevata
Forma della base	Arrotondata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Ortolana - OLVIVA-CA08" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## PAMPAGLIOSA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



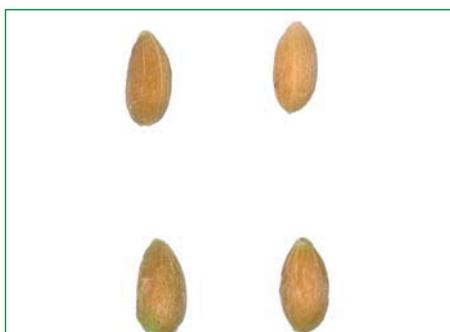
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Espanso
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I=4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Lunga (> 35 mm)
N° fiori	Alto (> 25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaura (epoca di)	Media
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Troncata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Allungata (L/I > 2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Liscia
Solchi fibrovascolari	Mediamnte numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Limitata
Forma della base	Appuntita
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Pampagliosa - OLVIVA-CA03" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## PISCIOTTANA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



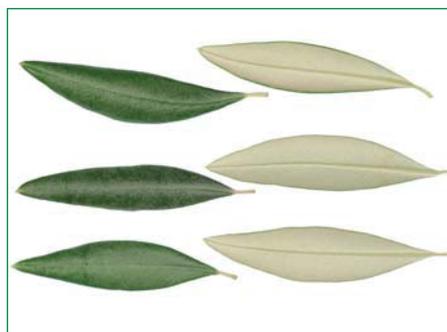
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Alta
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Elevata
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittica (L/I < 4)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Larga (> 1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Ellittica (L/I= 1,25-1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Basso (< 2 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ellittica (L/I > 1,8-2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Basso (< 0,3 g)
Posizione diametro max	Apicale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Poco numerosi (< 7)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Limitata
Forma della base	Arrotondata
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Pisciottana - OLVIVA-CA17" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## RACIOPPELLA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Bassa
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I= 4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Larga (> 1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaura (epoca di)	Media
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ellittica (L/I > 1,8-2,2)
Simmetria	Asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Molto numerosi (> 10)
Andamento solchi fibrovascolari	Irregolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Arrotondata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Racioppella - OLVIVA-CA06" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## RAVECE

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



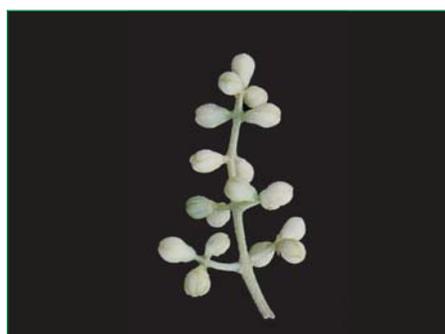
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Elevata
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I= 4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaura (epoca di)	Tardivo
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Presente
Base	Arrotondata
Peso	Alto (4-6 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Allungata (L/I > 2,2)
Simmetria	Asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Irregolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Appuntita
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Ravece - OLVIVA-CA12" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## RITONNELLA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



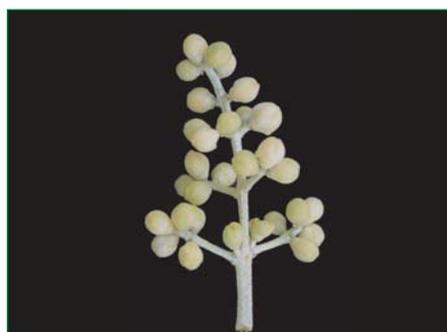
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittica (L/I < 4)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Corta (< 5 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Corta (< 25 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Sferica (L/I < 1,25)
Simmetria	Simmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Presente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ovoidale (L/I= 1,4-1,8)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Apicale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Troncata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Ritonnella - OLVIVA-CA15" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## ROTONDELLA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Elevata
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I= 4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Alto (> 25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nero
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Sferica (L/I < 1,25)
Simmetria	Simmetrico
Posizione diamentro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Rare
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ovoidale (L/I= 1,4-1,8)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Troncata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Rotondella - OLVIVA-CA14" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## RUVEIA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



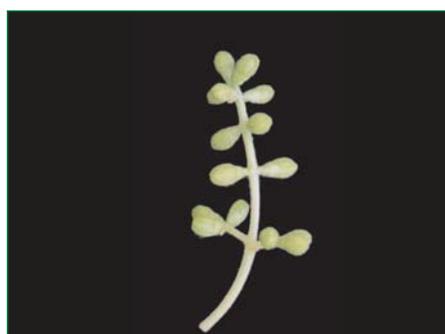
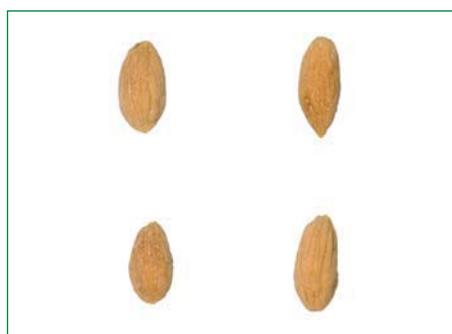
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Bassa
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I= 4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Lunga (> 7 cm)
Larghezza	Larga (> 1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Corta (< 25 mm)
N° fiori	Medio (18-25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Ellittica (L/I= 1,25-1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Troncata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerosi
Dimensioni lenticelle	Grandi
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ovoidale (L/I= 1,4-1,8)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Limitata
Forma della base	Troncata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Ruveia - OLVIVA-CA18" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## SALELLA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



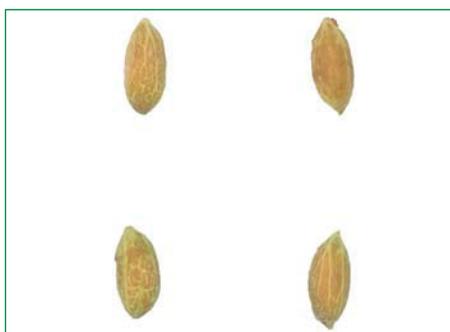
<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Elevata
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I= 4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Larga (> 1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Basso (< 18)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nera
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Apicale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Troncata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Rare
Dimensioni lenticelle	Piccole
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Allungata (L/I > 2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Arrotondata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Salella - OLVIVA-CA05" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## TENACELLA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Pendolo
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I= 4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Media (5-7 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Medio (18-25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Nera
Invaiaatura (epoca di)	Media
Forma	Allungata (L/I > 1,45)
Simmetria	Asimmetrico
Posizione diametro max	Centrale
Apice	Appuntito
Umbone	Presente
Base	Arrotondata
Peso	Basso (< 2 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Grandi
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Allungata (L/I > 2,2)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Medio (0,3-0,45 g)
Posizione diametro max	Centrale
Superficie	Liscia
Solchi fibrovascolari	Poco numerosi (< 7)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Limitata
Forma della base	Appuntita
Forma dell'apice	Appuntito
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Tenacella - OLVIVA-CA01" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.

## TONDA

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA



<b>ALBERO</b>	
Vigoria	Media
Portamento	Assurgente
Densità della chioma	Media
<b>FOGLIA ADULTA</b>	
Forma	Ellittico-lanceolata (L/I= 4-6)
Curvatura longitudinale	Piana
Lunghezza	Corta (< 5 cm)
Larghezza	Media (1-1,5 cm)
<b>INFIORESCENZA</b>	
Lunghezza media	Media (25-35 mm)
N° fiori	Medio (18-25)
<b>FRUTTO</b>	
Colore (a maturazione)	Violetto
Invaiaura (epoca di)	Media
Forma	Ellittica (L/I= 1,25-1,45)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Posizione diametro max	Apicale
Apice	Rotondo
Umbone	Assente
Base	Arrotondata
Peso	Medio (2-4 g)
Lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Grandi
<b>ENDOCARPO</b>	
Forma	Ovoidale (L/I- 1,4-1,8)
Simmetria	Leggermente asimmetrico
Peso	Elevato (> 0,45 g)
Posizione diametro max	Apicale
Superficie	Rugosa
Solchi fibrovascolari	Mediamente numerosi (7-10)
Andamento solchi fibrovascolari	Regolare
Profondità solchi fibrovascolari	Media
Forma della base	Troncata
Forma dell'apice	Rotondo
Terminazione dell'apice	Mucronato

**NOTE:**

- Rilievi effettuati per n° 3 anni.
- Sito di Rilevazione: Campo Sperimentale Azienda Improsta – Eboli (Na).
- L'accessione "Tonda - OLVIVA-CA11" con stato sanitario virus-esente è registrata nel Sistema Nazionale di Certificazione ai sensi del DM 20/11/2006.



**LA RIVISTA DI SCIENZA DELL'ALIMENTAZIONE**  
*Journal of Food Science and Nutrition*

---

**Abbonamenti 2013**

<b>Abbonamento standard carta + on line</b>	<b>Euro 130</b>	<input type="checkbox"/>
<b>Abbonamento solo carta</b>	<b>Euro 120</b>	<input type="checkbox"/>
<b>Solo accesso testi on line</b>	<b>Euro 80</b>	<input type="checkbox"/>

- Scegliere il tipo di abbonamento sbarrando la casella corrispondente
- Segnalare eventuali promozioni, sbarrando la casella corrispondente
- Compilare il modello .
- Inviare via fax al numero 06 48930976 unitamente alla copia del pagamento o via e-mail: redazione.fosan@yahoo.it

**Dati dell' abbonato**

Il / la signor/a			
Funzione			
Ragione sociale Ente /società			
Settore attività			
Partita IVA Codice Fiscale			
Indirizzo fatturazione Via/piazza		CAP Città	
Inviare la rivista presso Via/piazza		CAP Città	
Telefono		Fax	cellulare
e-mail			

**Modalità di pagamento**

Segnare la modalità prescelta

Bonifico bancario	Conto Banco Posta n.000092508001 ABI07601 CAB03200 CIN 0 Codice BIC BPPIITRRXXX Codice IBAN IT 37 0 076 0103 2000 0009 2508 001	<input type="checkbox"/>
Versamento su c/c postale	N. 92508001 <b>Intestato a</b> : Fondazione Studio degli Alimenti e della Nutrizione, P.zza Esquilino 29, 00185 Roma – <b>Causale</b> : Abbonamento 2011, Rivista	<input type="checkbox"/>

Timbro \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**Informativa ai sensi dell'art. 3 D. Lgs. 196/2003**

Titolare del trattamento dei dati personali è Fondazione Studio degli Alimenti e della Nutrizione, P.zza Esquilino 29, 00185 Roma, che potrà utilizzare i dati forniti dall'utente per finalità di marketing, newsletter, attività promozionali, offerte commerciali, analisi statistiche e ricerche di mercato. Qualora non desiderasse ricevere alcuna comunicazione la preghiamo di barrare la casella  
Non desidero alcuna comunicazione

---

**Fo.S.A.N. Fondazione per lo Studio degli Alimenti e della Nutrizione**  
Piazza dell'Esquilino 29- 00185 Roma- P.I. 01853241006 C.F. 07728550588 - [www.fosan.it](http://www.fosan.it)  
Tel 06-4880635- Fax 06-48930976 E-mail: [segreteria.fosan@gmail.com](mailto:segreteria.fosan@gmail.com)

Finito di stampare nel mese di settembre 2013  
con tecnologia *print on demand*  
presso il Centro Stampa "Nuova Cultura"  
p.le Aldo Moro n. 5, 00185 Roma  
[www.nuovacultura.it](http://www.nuovacultura.it)  
per ordini: [ordini@nuovacultura.it](mailto:ordini@nuovacultura.it)  
[Int\_STAMPE00134\_205x285col\_LN03]

## IN QUESTO NUMERO

- Linee guida per la gestione degli oliveti secolari
- OLEA: il progetto per la genomica e il miglioramento genetico dell'olivo
- La raccolta in olivicoltura richiede maggiore innovazione tecnologica
- Certificazione dell'olio di oliva biologico
- Il mercato mondiale delle olive da mensa: produzione, consumo e prospettive
- Breve rassegna sull'indicazione di origine dell'olio extravergine di oliva



[WWW.FOSAN.IT](http://WWW.FOSAN.IT)