

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base

Dottorato di ricerca in Biologia Applicata

XXVII Ciclo

Tesi di Dottorato

**Relazione tra qualità del suolo, caratteristiche fogliari e qualità
dell'olio in differenti cultivar di *Olea europaea* L.**

Coordinatore
Ch.mo Prof.
Ezio Ricca

Candidato
Dott.ssa
Costantina Barbarisi

Tutor
Dott.ssa
Anna De Marco

Co-Tutor
Dott.ssa
M.Grazia Volpe

Indice

Premessa	1
Capitolo 1. Introduzione	4
1.1 Biodiversità	4
1.2 Biodiversità del Bacino del Mediterraneo	7
1.2.1 La vegetazione del Bacino del Mediterraneo	9
1.3 Biodiversità agraria in un agrosistema	13
1.4 Biodiversità microbica del suolo	16
1.4.1 La fertilità biologica del suolo	19
1.5 Biodiversità alimentare del Mediterraneo	21
Capitolo 2. <i>Olea europaea</i> L.	25
2.1 La storia di <i>Olea europaea</i> L.	25
2.2 Origine e distribuzione geografica	27
2.3 Identikit di <i>Olea europaea</i> L.	29
2.3.1 Caratteristiche botaniche	30
2.3.2 Ambiente e localizzazione	32
2.4 Anatomia di <i>Olea europaea</i> L.	36
2.5 Composizione chimica dell'oliva	38
2.6 Sviluppo e maturazione del frutto di <i>Olea europaea</i> L.	42
2.7 Metodo di raccolta e lavorazione delle olive	46
2.8 L'estrazione dell'olio dalle olive	47
2.9 Composizione chimica dell'olio	48
2.10 Pigmenti	51
2.11 Influenza dell'ambiente di coltivazione sulle drupe e sulla composizione dell'olio di cultivar di <i>Olea europaea</i> L.	52
2.11.1 Aspetti agronomici	53
2.12 Il concetto di cultivar	57
2.13 Caratteristiche pedo e fitochimiche di alcune cultivar italiane	59
Capitolo 3. Obiettivo della ricerca	64
Capitolo 4. Materiali e metodi	68

4.1 Aree di studio	68
4.2 Campionamento	73
4.3 Campionamento di suoli	74
4.4 Determinazione dei caratteri chimico-fisici del suolo	75
4.4.1 Tenore idrico	76
4.4.2 Capacità idrica massimale (CIM)	76
4.4.3 pH	77
4.4.4 Sostanza organica	77
4.4.5 Capacità di Scambio Cationico	77
4.4.6 Contenuto di Carbonio e Azoto	79
4.5 Determinazione dei parametri biologici del suolo	80
4.5.1 Biomassa microbica	81
4.5.2 Respirazione microbica	82
4.5.3 Quoziente metabolico (qCO ₂)	83
4.5.4 Coefficiente di Mineralizzazione Endogena (CEM)	84
4.5.5 Biomassa fungina totale	84
4.6 Campionamento di foglie	86
4.7 Caratteristiche fogliari funzionali	87
4.7.1 Area fogliare specifica (SLA)	88
4.7.2 Contenuto fogliare di materia organica secca (LDMC)	88
4.7.3 Tenore idrico fogliare	89
4.7.4 Contenuto idrico relativo delle foglie (RWC)	89
4.7.5 Contenuto di azoto e carbonio fogliare	90
4.7.6 Fotochimica	90
4.8 Campionamento di frutti	92
4.8.1 Rapporto polpa/nocciolo	93
4.8.2 Contenuto umidità	93
4.8.3 Proteine totali	94
4.8.4 Lipidi totali	96
4.8.5 Estrazione e dosaggio di polifenoli totali	97
4.8.6 Saggio FRAP	98
4.9 Olio	98
4.9.1 Determinazione degli indici di qualità	99
4.9.2 Estrazione e dosaggio dei polifenoli totali	103

4.9.3 Carotenoidi e clorofille	104
4.10 Analisi statistica	105
Capitolo 5. Risultati e discussione	106
5.1 Parametri chimico-fisici del suolo	106
5.2 Caratteristiche biologiche dei suoli	116
5.3 Caratteristiche fogliari funzionali	126
5.4 Parametri fotochimici	133
5.5 Caratteristiche chimiche dei frutti di <i>Olea europaea</i> L.	136
5.6 Valutazione degli indici di qualità di oli estratti da <i>Olea europaea</i> L.	147
5.7 Caratteristiche biochimiche degli oli extravergine di oliva	150
5.8 Licoso: effetto dell'azione del cinghiale	154
Capitolo 6. Esperienza all'estero	170
6.1 Scopo dell'esperimento	172
6.2 Materiali e metodi	172
6.2.1 Area di studio e campionamento	172
6.2.2 Caratterizzazione dei suoli: tessitura; pH; tenore idrico; contenuto di carbonio e di azoto totale	174
6.2.3 Caratterizzazione molecolare dei suoli	175
6.3 Risultati e discussione	183
6.4 Caratteristiche chimico-fisiche dei suoli	184
6.4.1 Caratterizzazione quantitativa del DNA	184
6.4.2 Clone library e filogenesi delle sequenze dei geni <i>pmoA</i> e <i>mcrA</i>	184
6.4.3 Abbondanza di <i>pmoA</i> e <i>mcrA</i> nei paddy soils	189
6.5 Conclusioni dell'esperienza	189
Capitolo 7. Conclusioni	191
Capitolo 8. Bibliografia	196

Premessa

Nel corso della storia dell'agricoltura, le innovazioni, che si sono susseguite, hanno prelevato *tranches* di biodiversità totale dagli ecosistemi naturali trasformandole in *stock* di biodiversità utile, come gli agroecosistemi. La trasformazione degli ecosistemi in agroecosistemi è un processo antropico, in linea di principio omologante, perché "razionalizza" la complessità naturale. La pratica e le scienze agricole, fino al più recente passato, hanno saputo trovare soluzioni per sfruttare ma anche per riprodurre e/o per mantenere, la biodiversità degli agroecosistemi: non si può negare che l'industrializzazione dell'agricoltura dia oggi impulsi crescenti all'omologazione delle tecniche agricole e degli ecosistemi agricoli per adattarli alle grandi potenzialità dei genomi vegetali e animali "ingegnerizzati", le cui caratteristiche produttive, sempre più omologate, riducono la biodiversità contenuta nelle vecchie cultivar (Brunori, 2005).

Il declino della biodiversità agricola si può quantificare nel modo seguente: sebbene si stimi che vi siano approssimativamente 250.000 specie vegetali, di cui circa 50.000 edibili, in realtà l'uomo non ne usa più di 250, delle quali 15 forniscono circa il 90% delle calorie nella dieta umana, e 3 di esse, ossia grano, riso e mais, ne forniscono circa il 60%. In queste colture, il miglioramento genetico moderno produce successi spettacolari e il processo verso l'uniformità genetica è stato rapido. Infatti, le varietà più estesamente coltivate di queste colture sono strettamente affini e geneticamente uniformi. La conseguenza principale è che le nostre fonti principali di cibo sono, in termini genetici, più vulnerabili che mai e che, in altre parole, la sicurezza alimentare è potenzialmente in pericolo (Modonesi et al., 2009). Secondo la definizione data dal National Organic Standard Board (NOSB, 1995) nel 1995, l'agricoltura biologica è caratterizzata da *"un sistema ecologico di gestione della produzione che promuove e sviluppa la biodiversità, i cicli biologici e l'attività biologica del suolo. Fa ricorso ad un utilizzo minimo di prodotti derivanti da attività extra - aziendali e a pratiche di gestione che ripristinano, mantengono e stimolano l'armonia ecologica"*. Su questa base non sorprende il fatto che l'agricoltura biologica ricada all'interno del grande ombrello dell'agricoltura sostenibile e che permetta quindi di conseguire notevoli vantaggi dal punto di vista ambientale, in termini di riduzione dell'erosione e della lisciviazione dei nitrati, e del risparmio energetico (Lockertz et al., 1981; Drinkwater et al., 1998; Xie et al., 2003).

Alla luce di tali considerazioni, i controlli inerenti la qualità e la salute del suolo, che è ritenuto il luogo dove si manifesta la maggiore diversità biologica della Terra, risultano di

vitale importanza. Secondo Papendick & Parr (1992), la qualità del suolo non è altro che la sua capacità, entro i limiti naturali o antropici di un agroecosistema, di mantenere la produttività del raccolto, la qualità dell'aria e dell'acqua, e conseguentemente sia la salute umana che quella ambientale. Il concetto *soil health* include, invece, le qualità ecologiche di un suolo, che hanno implicazioni sulla sua capacità o qualità di produrre un particolare raccolto (Benitez et al., 2006). A livello vegetale, i suoli in particolare garantiscono la crescita di diverse cultivar dalle quali si possono ottenere prodotti alimentari di ottima qualità come ad esempio l'olio extravergine di oliva. L'olivo (*Olea europaea* L.) è una sclerofilla sempreverde del Mediterraneo ed è una delle più antiche colture arboree agricole in tutto il mondo (Scognamiglio et al., 2012), capace di acclimatarsi a lunghi periodi di siccità con scarse o assenti precipitazioni ed elevate temperature e irradianza. Tra questi fattori ambientali, il suolo e il deficit idrico atmosferico sono quelli più importanti che limitano la fotosintesi e la crescita (Faraloni et al., 2011). Sebbene, l'olivo rappresenta una pianta tipica tollerante allo stress idrico che ha sviluppato meccanismi adattativi a livello anatomico, fisiologico e biochimico (Angelopoulos et al., 1996; Chartzoulakis et al., 1999; Bosabilidis et al., 2002; Dichio et al., 2003; Bacelar et al., 2006; Ennajeh et al., 2008), le risposte a tale stress sono risultate essere molto variabili tra le cultivars, grazie all'alta diversità genetica delle specie (Guerfel et al., 2009). Sono conosciuti differenti genotipi (cultivars) di *Olea europaea* L.

Nel corso dei secoli, con l'avvento dell'agricoltura moderna e della globalizzazione alimentare, gli agricoltori hanno selezionato le coltivazioni di ulivo per alcune qualità come produttività più elevata, resa migliore, resistenza a condizioni climatiche avverse e ai pesticidi (Scognamiglio et al., 2012). Inoltre, dati epidemiologici sottolineano il ruolo dell'olio d'oliva nella prevenzione di patologie differenti. Gli effetti benefici sembrano essere attribuibili al contenuto dei suoi metaboliti secondari. Infatti, i flavonoidi (Altiok et al., 2008), gli alcoli fenolici (Bianco et al., 2000; Bianco et al., 2006), i tannini (Ryana et al., 2002), i glicosidi (Amiot et al., 1986) e i secoiridoidi (Karioti et al., 2006), tutti trovati ad alte concentrazioni negli oli di oliva, appaiono essere capaci di indurre effetti anti-carcinogenici nei modelli di grandi cellule cancerose intestinali, sia negli animali che negli umani. Anche l'estratto di foglie di ulivo è ampiamente usato come rimedio per combattere febbri, malaria e altre patologie (El et al., 2009; Visioli et al., 1994). Le proprietà benefiche di tali estratti fogliari sembrano essere dovute alla ricchezza nei costituenti antiossidanti (Meirinhos et al., 2005; Silva et al., 2006; Turner et al., 2005). Ad ogni modo, le condizioni ambientali di crescita e il

grado di maturazione determinano una distribuzione variabile di queste sostanze all'interno di ciascuna cultivar e tra le differenti cultivars (Scognamiglio et al., 2012). Infatti, *in primis*, la varietà genetica (la cultivar) insieme all'area geografica di produzione (altitudine, latitudine e clima), alla composizione del suolo e alle condizioni edafiche che prevalgono nell'area di produzione, al tempo di coltivazione, allo stadio di maturazione e all'integrità del frutto, e inoltre alle tecnologie utilizzate per la produzione sono tutti fattori che vanno ad influenzare fortemente la composizione chimica e la qualità di un olio vergine di oliva (Montedoro et al., 1986).

L'attività di ricerca portata avanti nello svolgimento di tale dottorato si propone appunto di migliorare comprensione e descrizione dei fattori che influenzano la perdita dell'agrobiodiversità o biodiversità agraria di cultivar di *Olea europaea* L. L'interesse suscitato dagli effetti benefici degli oli vergini di oliva, ha focalizzato l'attenzione dei ricercatori verso l'identificazione di tecniche e protocolli per il miglioramento della qualità alimentare, incrementando le conoscenze inerenti le relazioni esistenti tra suolo, cultivar e qualità di un olio vergine di oliva.

Capitolo 1. Introduzione

1.1 Biodiversità

La definizione più ampiamente accettata di biodiversità o diversità biologica è stata proposta dall'*Office of Technology Assessment* del governo degli Stati Uniti nel 1987: “La diversità biologica comprende la varietà e la variabilità tra organismi viventi e i complessi ecologici in cui essi vivono. La diversità può essere definita come il numero di elementi diversi e la loro frequenza relativa. Nella diversità biologica tali elementi sono organizzati in più livelli, dall’ecosistema in toto alle strutture chimiche che costituiscono le basi molecolari dell’ereditarietà. Il termine quindi comprende diversi ecosistemi, specie, geni e la loro abbondanza relativa”.

Schematicamente la diversità biologica può, quindi, essere definita come l’insieme delle specie animali e vegetali, dal loro materiale genetico e dagli ecosistemi di cui esse fanno parte (Vandermeer et al., 1995). La biodiversità ingloba la diversità della specie, genetica ed ecosistemica (Fig. 1.1). Essa è in funzione del tempo (evoluzione) e dello spazio (distribuzione geografica) (Mocali, 2010).

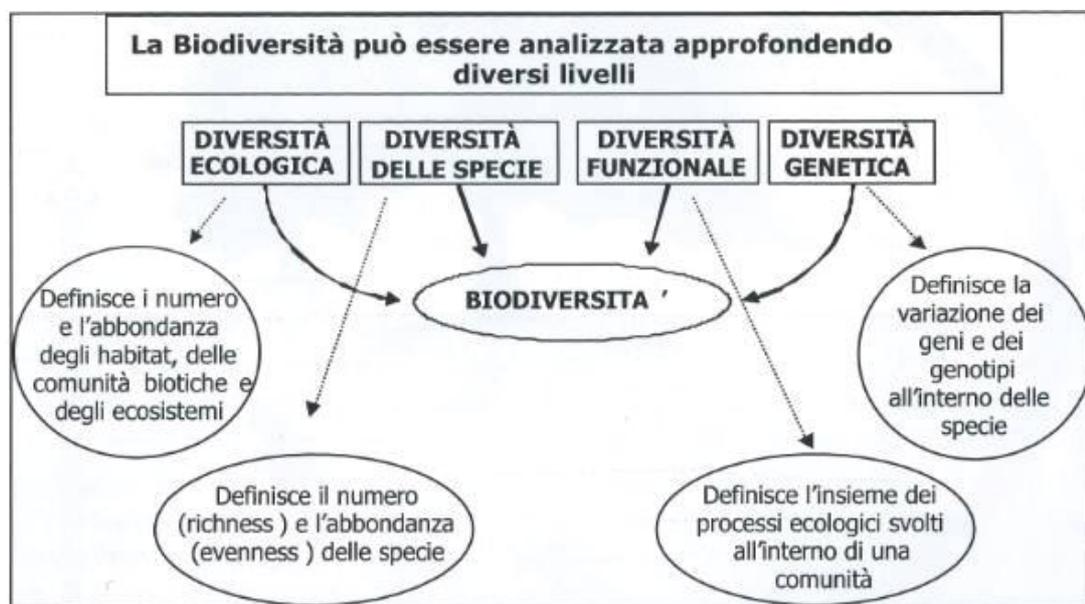


Figura 1.1: Rappresentazione schematica delle definizioni di biodiversità (modificato da Mocali, 2010).

La diversità delle specie corrisponde al numero delle specie presenti in una data zona, tenendo conto che il termine specie indica l’insieme degli individui capaci (effettivamente o

potenzialmente) di incrociarsi fra loro dando origine a delle discendenze feconde e dove i membri di queste proli si rassomigliano morfologicamente fra loro. Gli individui di una stessa specie possono differenziarsi poco o tanto fra loro ma, all'interno di ogni specie, tutti gli individui mantengono i caratteri peculiari di quella specie. Questa definizione standard non può tuttavia essere applicata a quegli organismi che si riproducono per mezzi non sessuali (per esempio i virus). Naturalmente anche questi organismi rappresentano una parte significativa ed importante del nostro pianeta.

La diversità genetica designa la variazione dei geni e dei genotipi all'interno della specie. Essa corrisponde alla totalità dell'informazione genetica contenuta nei geni di tutti gli animali, i vegetali e microrganismi che popolano la terra.

Le specie si compongono di individui aventi delle caratteristiche ereditarie (genetiche) differenti. Secondo le attuali teorie evuzionistiche, la varietà dei codici genetici permette alle singole specie di evolversi progressivamente e di sopravvivere negli ambienti che si modificano.

La diversità ecosistemica definisce il numero e l'abbondanza degli habitat, delle comunità biotiche e degli ecosistemi all'interno dei quali vivono e si evolvono i diversi organismi.

Gli ecosistemi sono costituiti da comunità interdipendenti di specie in rapporto con il loro ambiente fisico. Le dimensioni degli ecosistemi sono variabili: esistono grossi ecosistemi naturali come le praterie, le mangrovie, le paludi, le foreste pluviali, ma anche degli ecosistemi agricoli che presentano una combinazione caratteristica di piante e di animali, anche se la loro esistenza e conservazione è sotto il completo dominio dell'uomo (Benedetti, 2010).

È stato osservato che i valori di diversità in ecosistemi degradati o minacciati, per esempio in seguito a impatto antropico intenso e/o generalizzato, diminuiscono; tali valori possono quindi essere utilizzati come misura dell'impatto stesso. Gli ecosistemi ad elevata diversità sono generalmente lontani da condizioni di degrado e stabili, mentre quelli con bassa diversità risultano instabili. Un'elevata diversità significa infatti che nell'ecosistema esiste un ampio set di specie, tra le quali i processi naturali di selezione possono scegliere quelle maggiormente adatte per superare un'azione di disturbo proveniente dall'esterno. Invece in una condizione di bassa diversità si hanno poche specie dominanti e, se le condizioni

divengono per loro negative, tutto l'ecosistema viene messo in condizioni di instabilità (Bullini et al., 1998).

La Biodiversità è il pilastro per la vita sul nostro pianeta e la sua conservazione deve essere perseguita con tutti gli sforzi poiché essa costituisce un patrimonio universale. Conservare la diversità biologica è innanzitutto un dovere morale nei confronti delle generazioni attuali e future, in modo che esse possano fruirne integralmente anche negli anni a venire.

Nelle varie epoche storiche l'uomo ha utilizzato diversi elementi della biodiversità: è pertanto necessario conservare per quanto possibile tutta la diversità biologica in vista di utilizzi futuri che al momento non sono prevedibili. La tutela della diversità biologica è anche un'opportunità a causa del suo elevato valore intrinseco: la biodiversità è il prodotto finale di un processo evolutivo iniziato oltre tre miliardi di anni fa, ma anche la condizione fondamentale per consentire il perdurare di tale processo globale.

La perdita di biodiversità comporta danni in vari settori:

- ecologico, perché comporta un degrado della funzionalità degli ecosistemi;
- economico, perché riduce le risorse genetiche potenziali e le risorse indispensabili alle attività umane;
- culturale, perché determina la scomparsa di conoscenze e tradizioni legate alla biodiversità.

Negli ultimi anni al problema della conservazione della biodiversità è stata dedicata sempre maggiore attenzione fino a farne oggetto di una delle tre risoluzioni finali della conferenza internazionale di Rio de Janeiro (1992). Il termine biodiversità ha, tuttavia, un significato molto ampio. Il problema della biodiversità e della sua salvaguardia è particolarmente acuto e da questo deriva il rischio di estinzione per le specie non soltanto vegetali, ma anche specie animali specializzate. Una valutazione prudentiale fa ritenere che circa la metà delle specie che compongono la flora e la fauna terrestri siano a rischio di estinzione. Tutto questo si basa tuttavia su stime poco precise, in quanto la maggior parte delle specie, almeno tra gli animali, non è stata ancora descritta (Bullini et al., 1998).

Un ecosistema perfettamente funzionale, e quindi dotato di alta biodiversità risulta, non solo più produttivo a lungo termine, ma anche molto più resistente e capace di affrontare situazioni critiche :«Per varare piani efficaci di conservazione è necessario conoscere e salvaguardare l'integrità dei processi biologici delle popolazioni, delle specie e degli

ecosistemi» (Wilson, 1992). Pertanto, lo studio della biodiversità risulta uno strumento indispensabile per poter intraprendere qualsiasi azione di conservazione della biodiversità stessa.

La “biologia della conservazione” studia i parametri biologici delle specie che ne permettono o limitano la sopravvivenza. È la risposta della comunità scientifica alla crisi della biodiversità. È una nuova disciplina sintetica di ecologia, biologia, biogeografia, genetica, tassonomia, economia, sociologia, filosofia e altre discipline di base, applicate al mantenimento della diversità biologica sul Pianeta.

Attualmente il regno vegetale, ancor più di quello animale, sta attraversando una gravissima crisi di estinzione dovuta alle sempre maggiori pressioni umane. Malattie, distruzioni, insediamenti urbani, cambiamenti nella politica agraria e variazioni climatiche a livello globale minacciano costantemente numerose specie arboree, arbustive ed erbacee. Si pensi che ben 34.000 delle 250.000 angiosperme esistenti sulla Terra sono a rischio di estinzione (Wilson, 1992).

La perdita di biodiversità vegetale non rappresenta soltanto una riduzione del numero di specie di piante, ma reca danno anche agli organismi animali e agli ecosistemi nel loro complesso. Ogni forma di vita infatti è strettamente correlata all’esistenza di molti altri esseri viventi.

La bellezza e la ricchezza della flora mondiale costituiscono quindi un patrimonio genetico, biologico ed ecologico insostituibile che va conservato e protetto.

1.2 Biodiversità del Bacino del Mediterraneo

Gli ecosistemi mediterranei sono costituiti da ambienti molto eterogenei e differenziati fra loro e sono considerati una grande riserva di biodiversità soprattutto vegetale (Schönfelder et al., 1996), comprendendo circa 48.250 specie di piante, approssimativamente il 20% di quelle esistenti (Cowling et al., 1996).

Nel caso degli autotrofi, una maggiore biodiversità corrisponde ad una maggiore produttività (Tilman et al., 1994); una maggiore diversità funzionale e specifica della comunità microbica del suolo rispecchia una maggiore attività e un più rapido turnover dei nutrienti (Degens et al., 2001). Quindi il funzionamento dell’ecosistema è influenzato fortemente da variazioni della biodiversità.

A causa del clima favorevole e della presenza di suoli fertili, tutte le regioni del bioma mediterraneo hanno subito gli effetti di una consistente colonizzazione antropica perdendo gran parte dei loro habitat originali. Attualmente rappresentano le aree della Terra maggiormente alterate e con il minor numero di aree indisturbate (Hannan et al., 1995).

In pratica in questi ambienti cronicamente influenzati dall'uomo fin dai tempi remoti, la vegetazione è oggi costituita da un mosaico di popolamenti creati da eventi di disturbo, sovrapposto al mosaico naturale determinato da fattori climatici ed edafici (Komarek, 1993).

Nel Bacino del Mediterraneo è di particolare importanza l'elevato numero di specie vegetali endemiche (Quèzel, 1995; 1998), che rappresentano circa il 50% del numero totale di piante vascolari censite in questo ambiente. Quèzel (1998) riporta per l'area del Mediterraneo circa 12.500 specie vegetali. Molti endemismi possono avere un habitat ristretto e, a questo proposito, le condizioni di insularità giocano un ruolo decisivo sia per la flora sia per la fauna (Tab. 1.1).

Tabella 1.1: Nella tabella, modificata da Cowling et al. (1996), sono riportate la diversità in specie vegetali e l'estensione delle cinque regioni a clima mediterraneo della terra; inoltre sono indicate le principali perturbazioni che in parte hanno influenzato la creazione di questi particolari ecosistemi e che oggi rischiano di ridurre quella biodiversità che hanno contribuito a creare.

Regione	Superficie (10 ⁶ Km ²)	Piante native (n. di specie)	Disturbo
Bacino del Mediterraneo	2.30	25000	Deforestazione pascolo intenso agricoltura urbanizzazione
California	0.32	4300	agricoltura urbanizzazione
Cile centrale	0.14	2400	Deforestazione pascolo intenso agricoltura
Sud Africa	0.09	8550	Introduzione di specie esotiche agricoltura urbanizzazione
Australia sud-occidentale	0.31	8000	agricoltura urbanizzazione introduzione di patogeni

Nella regione mediterranea esistono aree che presentano un'eccezionale concentrazione di biodiversità ed elevata densità di specie endemiche e che pertanto, possono essere definite come *hot spots* (Médail et al., 1997). Secondo la definizione di Myers una regione può essere considerata un *hot spot* se presenta una notevole variabilità di specie endemiche ed un alto grado di alterazione dell'habitat conseguente ad un eccessivo impatto antropico (Médail et al., 1997).

In questa regione mediterranea Myers & Cowling (1999) hanno identificato 10 *mini-hotspots* che costituiscono le aree con il più elevato numero di specie endemiche: pur ricoprendo solo il 15% della superficie totale (Fig. 1.2), contribuiscono per il 37% al numero complessivo di specie endemiche.

L'Italia meridionale rappresenta l'estremo limite meridionale di molte specie a larga diffusione europea, come il faggio, la rovere, l'abete bianco.

È ritenuto che in epoca glaciale le regioni meridionali abbiano rappresentato delle "aree rifugio" da cui queste specie si sono poi nuovamente diffuse nel resto d'Europa. Per questi motivi l'Italia meridionale è una grande riserva di variabilità genetica la cui importanza è oggi universalmente riconosciuta (Pignatti, 1995).

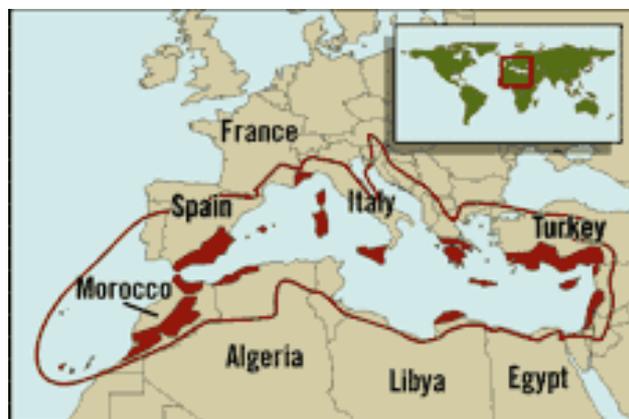


Figura 1.2: Bacino del Mediterraneo. La linea delimita l'area a carattere mediterraneo, mentre in rosso pieno sono evidenziati i singoli *mini-hotspots*, che ricoprono in totale il 15% dell'intera superficie (<http://biodiversityhotspots.org/xp/Hotspots>).

1.2.1 La vegetazione del Bacino del Mediterraneo

La specie tipica della vegetazione mediterranea del Bacino Mediterraneo è la foresta sempreverde con dominanza di *Quercus ilex* L., presente in tutto il Bacino del Mediterraneo anche se nella parte occidentale, Spagna e Portogallo, la specie *ilex* è sostituita dalla specie *rotundifolia*. In Italia, il leccio ha una distribuzione prevalentemente costiera e si trova soprattutto sul versante tirrenico.

Nel Bacino del Mediterraneo, la lecceta, la vegetazione climax, per effetto del pascolo, degli incendi e dei disboscamenti, viene dapprima trasformata nella macchia, e in seguito ad un impatto più intenso e prolungato, si ha il passaggio alla gariga, che presenta una composizione floristica più complessa rispetto al climax e alla macchia, dovuta ad una estrema differenziazione di nicchie spazialmente e funzionalmente ristrette (Bullini et al., 1998).

La macchia mediterranea può essere primaria o secondaria e non è sempre facile distinguere l'una o l'altra. La macchia primaria è quella originaria, che non deriva dall'involuzione di vegetazione forestale precedente ed è molto rara. La macchia primaria può essere presente in aree in cui alcuni fattori sono fortemente limitanti come acqua e nutrienti e rappresenta in questi casi un "sub climax".

Nella maggior parte dei casi gli eterogenei aspetti della macchia mediterranea rappresentano stadi intermedi nel corso dell'evoluzione o della degradazione della vegetazione e quindi devono essere considerati come aspetti della macchia secondaria (Fig. 1.3).

Nella macchia predominano specie vegetali differenti, oltre al leccio, tra le specie arboree prevalgono il carrubo (*Ceratonia siliqua* L.), varie specie di pino (*Pinus pinea* L., *P. pinaster* Aiton e *P. halepensis* Miller) e, nelle zone con suolo più fresco e profondo la roverella (*Quercus pubescens* Willd) e la vallonea (*Quercus vallonea* Kotschy). Gli arbusti più rappresentativi sono l'olivo o ulivo (*Olea europaea* L.), il corbezzolo (*Arbutus unedo* L.), il mirto (*Myrtus communis* L.), il lentisco (*Pistacia lentiscus* L.), la fillirea (*Phillyrea angustifolia* L., e *P. latifolia* L.), il ginepro rosso (*Juniperus oxycedrus* L.) e il ginepro fenicio (*Juniperus phoenicea* L.), l'olivello spinoso (*Hippophaë rhamnoides* L.) e una pianta lianosa, (*Smilax aspera* L.). Lo strato più basso comprende varie specie di cisto come (*Cistus incanus* L. e *Cistus monspeliensis* L.), varie specie di timo (gen. *Thymus* L.), il rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.), la ginestra dei carbonai (*Cytisus scoparsi* L.) e l'erica arborea (*Erica arborea* L.).

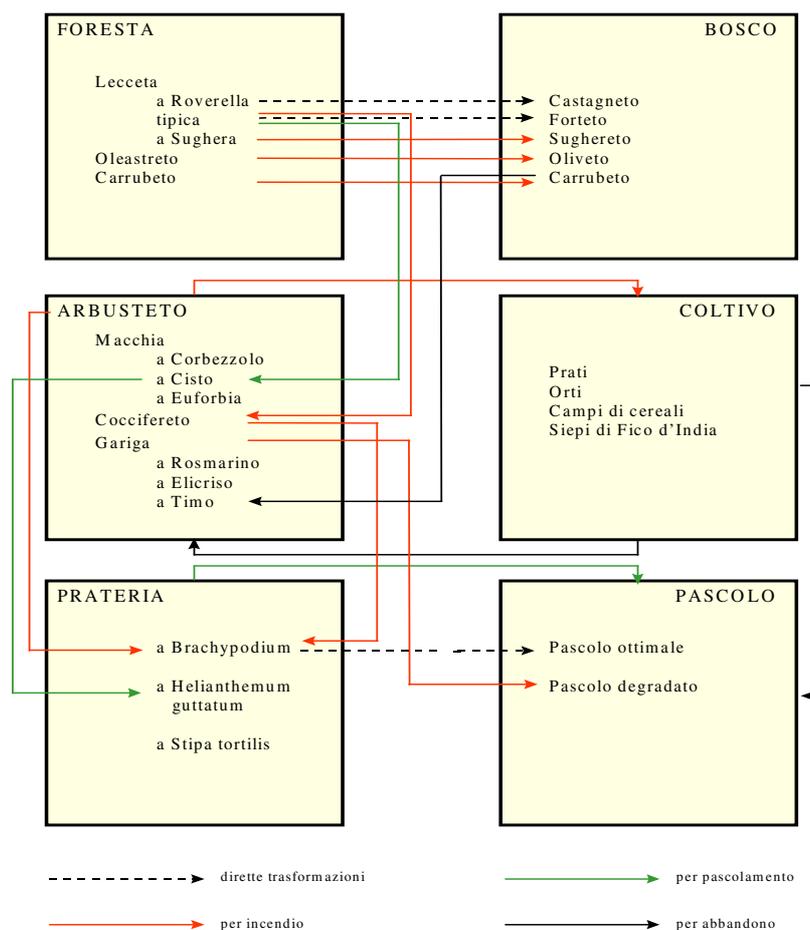


Figura 1.3: Possibile evoluzione della vegetazione mediterranea (modificata da Giacobini, 1958).

Le aree a macchia sono spesso interrotte o vicine a boschi di pino più o meno estesi ormai per la maggior parte di origine antropica. Tipici della flora italiana sono: il pino domestico, *Pinus Pinea* L. il pino d'Aleppo, *Pinus Halepensis* Miller e il pino marittimo, *Pinus pinaster* Aiton. Le pinete a pino domestico sono diffuse, soprattutto, lungo il Tirreno e nell'alto Adriatico. Il pino d'Aleppo è diffuso, soprattutto, nelle zone litorali dove colonizza i terreni più difficili e si ritrova associato anche alle forme più degradate della macchia; infine, le pinete a pino marittimo sono diffuse soprattutto in Liguria e nell'alto Tirreno.

Le condizioni climatiche delle zone mediterranee comportano lunghi periodi di siccità estiva, un irraggiamento solare intenso e protratto per molte ore al giorno, venti frequenti e, in prossimità delle coste, elevate concentrazioni saline nel terreno. Dunque, la sopravvivenza delle specie vegetali nell'ambiente della macchia richiede particolari adattamenti.

Uno dei più interessanti adattamenti al clima mediterraneo è rappresentato dalla *sclerofillia*, ossia l'ispessimento delle foglie, generalmente piccole che si presentano coriacee, al fine di proteggere i tessuti fotosintetici. È normalmente accettato che la sclerofillia è una risposta adattativa al deficit idrico estivo tipico dei climi mediterranei, ma va osservato che le specie sclerofille non sono esclusive di tali ambienti e sono molto diffuse anche in regioni calde e umide come quella macaronese, Isole Canarie (Goodall, 1983; Aboal et al., 2005).

La struttura fogliare delle sclerofille mediterranee è caratterizzata da cuticole spesse ed un mesofillo molto denso, formato da più strati di tessuto a palizzata. In tal modo gli spazi intercellulari sono scarsi, e questo implica una certa difficoltà negli scambi gassosi. Ciò protegge la foglia da un'eccessiva traspirazione ma, allo stesso tempo, può ridurre l'efficienza fotosintetica e in ultima analisi, la capacità di crescita.

Le piante mediterranee, inoltre, sviluppano spesso un apparato radicale molto esteso e profondo, che consente di assorbire acqua dal suolo anche in situazioni di forte aridità, cosicché esse riescono a svolgere la fotosintesi in presenza di potenziali idrici fortemente negativi nelle foglie, pur se con un forte consumo delle riserve di amido. Specialmente durante il periodo di forte riscaldamento estivo, infine, molte specie mediterranee emettono dalle foglie composti volatili, come isoprenoidi monoterpeni e diterpeni, che, in presenza di luce e di composti antropogenici, sono fonte di inquinamento.

La formazione a macchia mediterranea, si differenzia in base all'altezza degli arbusti, macchia alta e macchia bassa, alla densità ed alla composizione in specie della vegetazione. Negli ambienti più caldi e aridi, la macchia rappresenta, invece, una formazione *climax* o *paraclimax* (Piotto et al., 2001).

Nell'ecosistema mediterraneo le piante erbacee, in particolar modo le specie annuali, costituiscono circa il 15% della flora e, normalmente, subiscono una notevole riduzione in seguito alla crescita di densità degli arbusti. L'importanza delle piante erbacee annuali in termini di produttività ecosistemica è dimostrato dal fatto che la loro fitomassa, durante il periodo delle piogge primaverili, è in grado di subire un incremento di circa cinque volte (Troumbis et al., 2000).

Il rapido turnover di queste specie, la loro più rapida degradazione rispetto alle specie arbustive influenza notevolmente il riciclo dei nutrienti ed in particolare il sequestro o le perdite di C dal sistema (De Marco et al., 2006).

1.3 Biodiversità agraria in un agroecosistema

Il compito fondamentale dell'agricoltura di provvedere ad un progressivo incremento di produzione di alimenti e di materie prime ha portato ad una sempre più marcata differenziazione tra agroecosistemi ed ecosistemi naturali.

La risultante di questi processi evolutivi, intervenuti negli agroecosistemi soprattutto dopo la seconda guerra mondiale, viene comunemente definita come processo di "specializzazione colturale" e identifica una situazione tipica di tutti i Paesi industrializzati, in cui poche sono le specie coltivate e allevate in azienda. In generale sono coltivate le specie più produttive e remunerative, senza particolare osservanza per i criteri agronomici ortodossi che prevedono, tra l'altro il mantenimento della fertilità dei suoli. Cosicché a partire dagli anni Cinquanta, gli agroecosistemi, che rappresentano l'unità di studio dell'ecologia agraria, ossia dell'ecologia applicata all'attività agricola, hanno gradatamente cambiato la loro fisionomia e modificato il funzionamento di base. È subentrata la specializzazione colturale che nell'ambito delle specie vegetali dà luogo ad agroecosistemi elementari che, proprio in relazione alla loro struttura semplificata, manifestano segni di scarsa efficienza ecologica, mentre richiedono il massimo sostegno sotto forma di energia ausiliaria (Provini et al., 1998).

Gli ecosistemi artificiali, agricoli e urbani, sono altamente instabili: non sono, cioè, in grado di mantenere una costanza di struttura e di funzionamento nel tempo in presenza di variazioni ambientali o di fattori di disturbo. Ciò avviene soprattutto in quanto essi hanno livelli troppo bassi di biodiversità. Essi hanno sempre il carattere di ecosistemi immaturi, pur potendo risultare altamente produttivi, come nel caso dei campi coltivati: l'uomo modifica la comunità riportandola ad uno stadio più giovanile, in particolare riducendo la maturità della vegetazione, per mettere l'area a coltura.

Attualmente l'agricoltura è un'attività che è soggetta a un largo numero di variabili. A quelle pedoclimatiche (fisico-ambientali) e biotiche (rapporti d'interazione tra le specie), si aggiungono quelle economiche, politiche e sociali, che condizionano strettamente gli ordinamenti produttivi, colturali e le soluzioni tecniche adottate (Avena et al., 1995).

L'agricoltura si colloca nei riguardi della società e dell'ambiente in una posizione di grande rilevanza, non solo per la funzione di produrre alimenti. Essa utilizza uno spazio che ha valore di patrimonio per la collettività e che si caratterizza per un suo potenziale di rigenerazione di componenti biotiche (flora e fauna) e di conservazione di quelle abiotiche (acqua, aria, ecc.). L'impatto reciproco degli spazi agricoli con quelli circostanti diventa

inevitabile e tanto più incisivo quanto più aggressivo è il livello di tecnologia applicato. L'agricoltura allo stesso tempo può fungere da soggetto e da oggetto di inquinamento. Specializzazione culturale; frequenza e profondità delle lavorazioni; dosi e frequenza dei trattamenti fertilizzanti e di difesa culturale sono tra gli aspetti dell'agricoltura moderna, quelli che suscitano le maggiori preoccupazioni per la salute dell'ambiente e per quella umana (Avena et al., 1995).

L'agricoltura rappresenta, quindi, sostanzialmente, l'esempio più macroscopico di riduzione, ad opera dell'uomo, della naturale tendenza degli ecosistemi ad aumentare il livello di biodiversità. Espressione massima di questa "semplificazione" operata dall'uomo negli agroecosistemi è proprio la pratica della monocoltura. In una coltivazione di mais o in una risaia tutta l'energia viene convogliata verso l'unica specie di interesse agricolo presente, mentre tutte le altre specie vengono tenute sotto stretto controllo. I vegetali che possono competere con la specie coltivata vengono eliminati mediante il diserbo a mano e, più recentemente, con l'uso di erbicidi. Allo stesso modo l'uomo cerca di eliminare tutti i fitofagi e i parassiti che possono danneggiare la specie coltivata mediante pesticidi. L'insieme di queste pratiche riporta l'agroecosistema a una fase pioniera, abbassandone drasticamente il livello di omeostasi e rendendolo estremamente vulnerabile a qualsiasi variazione ambientale (Bullini et al., 1998).

L'agricoltura moderna, inoltre, utilizza per ciascuna delle specie coltivate un numero estremamente ridotto di varietà genetiche (*cultivar*, da *cultivated variety*) tra le numerosissime note e, almeno potenzialmente, disponibili. Si tratta delle varietà più produttive, ma una scelta così ristretta è a lunga scadenza rischiosa; in futuro alcune o molte delle cultivar su cui si basa l'agricoltura attuale potrebbero risultare poco resistenti o comunque difficili da difendere contro nuovi parassiti (virus, funghi, insetti) o mutanti degli attuali e da qui l'importanza degli istituti per la conservazione del germoplasma. Conservare la diversità genetica diventa di fondamentale importanza man mano che il terreno diventa "meno redditizio" e l'agricoltura, quindi, più rischiosa (Altieri, 1999). La diversità genetica conferisce inoltre resistenza parziale a patologie che sono specifiche per particolari ceppi di colture e permette agli agricoltori di sfruttare differenti tipi di suolo e microclimi per una varietà di usi nutrizionali e non (Brush, 1982).

La stabilità degli ecosistemi agricoli viene artificialmente mantenuta mediante massicci apporti di energia (irrigazioni, concimazioni, trattamenti con erbicidi e pesticidi). Il

costo a lungo termine di questi interventi viene in generale sottovalutato; del pari non si tiene conto dell'efficacia solo temporanea dei trattamenti con erbicidi e pesticidi, come risultato dell'insorgere di fenomeni di resistenza nelle specie che si volevano combattere. Infine vengono spesso trascurati gli effetti collaterali di queste sostanze, a breve e medio termine, sul funzionamento degli ecosistemi nonché sulla salute dell'uomo (Bullini et al., 1998).

Nell'ecosistema agricolo si ha la sostituzione delle specie e varietà selvatiche con altre più produttive ma si ha contemporaneamente anche una modificazione dei flussi di materia e di energia. Il diagramma di flusso è assai complesso in quanto si inseriscono tre ulteriori variabili: il bestiame, che provvede al riciclo del materiale organico, l'irrigazione, che provvede a un'erogazione aggiuntiva di acqua e i fertilizzanti, che aumentano l'input di nutrienti. La trasformazione dell'ecosistema è quindi finalizzata all'aumento della produzione, generalmente di sostanze alimentari. Di conseguenza, i moderni sistemi agricoli sono diventati produttivi solo perché sono fortemente dipendenti da input esterni (Altieri, 1999).

Nell'agroecosistema il flusso di materia è fortemente aumentato attraverso la lavorazione del terreno, che mette una grande quantità di nutrienti a disposizione della pianta; ne consegue un rapido impoverimento, che viene bilanciato con la concimazione. Anche la disponibilità di acqua viene migliorata mediante modificazione della rete idrica, irrigazione o drenaggio.

Gli scambi energetici di un agroecosistema si possono così sintetizzare: una certa quantità di energia luminosa giunge su un campo dove l'uomo ha piantato una specie commestibile; una parte di questa energia viene fissata dalle piante con la fotosintesi e accumulata nei tessuti; l'energia contenuta nelle parti commestibili delle piante diventa così disponibile per l'uomo (Bullini et al., 1998).

Oltre alla produzione di piante pregiate e animali, la biodiversità svolge molti servizi ecologici. Infatti, negli ecosistemi naturali, la copertura vegetale di una foresta o di praterie previene l'erosione del suolo, riempie le acque sotterranee e controlla le inondazioni migliorando l'infiltrazione e riducendo il deflusso delle acque (Perry, 1994). Nei sistemi agricoli, la biodiversità svolge servizi ecosistemici al di là della produzione di cibo, fibra, carburante e del reddito. Gli esempi principali sono costituiti dal riciclo dei nutrienti, dal controllo del microclima locale, dalla regolazione dei locali processi idrologici e dell'abbondanza di organismi indesiderabili, e dalla detossificazione di sostanze chimiche nocive. Questi processi di rinnovamento e di servizi ecosistemici sono in gran parte biologici,

di conseguenza la loro persistenza dipende dal mantenimento della diversità biologica (Altieri, 1994). Quando questi servizi naturali sono persi a causa della semplificazione biologica, i costi ambientali ed economici possono essere ampiamente significativi.

In agricoltura, il tipo e l'abbondanza di biodiversità saranno diversi per gli agroecosistemi che differiscono in età, struttura e gestione. Infatti, c'è una grande variabilità nei *patterns* ecologici e agronomici tra i vari agroecosistemi dominanti. In generale, il grado di biodiversità negli agroecosistemi dipende da quattro caratteristiche principali dell'agroecosistema (Southwood et al., 1970): la diversità della vegetazione all'interno e intorno l'agroecosistema; la permanenza delle varie colture all'interno dell'agroecosistema; l'intensità di gestione; l'entità di isolamento dell'agroecosistema dalla vegetazione naturale. I componenti della biodiversità degli agroecosistemi possono essere classificati in relazione al ruolo che svolgono nel funzionamento dei sistemi di coltivazione. In accordo con questo, la biodiversità agraria può essere raggruppata come segue (Swift et al., 1993): il biota produttivo con colture, alberi e animali scelti dagli agricoltori che giocano un ruolo determinante nella diversità e complessità di un agroecosistema. Il biota risorsa: organismi che contribuiscono alla produttività attraverso l'impollinazione, il controllo biologico e la decomposizione. Il biota distruttivo: erbacce, insetti parassiti, patogeni microbici, che gli agricoltori mirano a ridurre attraverso la gestione agricola (Altieri, 1999).

La chiave è, quindi, identificare il tipo di biodiversità che si desidera mantenere e/o rafforzare per effettuare i servizi ecologici, e poi determinare le pratiche migliori che porteranno alle componenti della biodiversità desiderata. L'idea è quella di applicare le migliori pratiche di gestione al fine di accrescere o rigenerare il tipo di biodiversità che può sovvenzionare la sostenibilità degli agroecosistemi e fornire servizi ecologici come il controllo biologico dei parassiti, il ciclo dei nutrienti, dell'acqua e la conservazione del suolo. Migliorare la biodiversità funzionale negli agroecosistemi è una strategia ecologica chiave per portare sostenibilità alla produzione (Altieri, 1999).

1.4 Biodiversità microbica del suolo

Uno degli aspetti più difficili da comprendere dall'opinione comune è che il suolo non è un semplice substrato inerte da calpestare e su cui si può vivere ma che sia "vivo", nel senso che si comporta come un organismo vivente. Si tratta di una matrice estremamente complessa, forse la più complessa in natura, che contiene la più grande quantità di biodiversità e di

biomassa vivente dell'intero pianeta. La maggior parte degli organismi che vi risiedono sono prevalentemente microrganismi (batteri, funghi, protozoi, ecc.) che giocano un ruolo chiave per le funzioni e la qualità del suolo. Essi rappresentano il “motore” che consente al suolo di funzionare correttamente e senza il quale non potrebbe esserci la vita.

Non è un caso che il suolo, ovvero la “madre terra” sia l'unico comparto naturale ad essere chiamato in questo modo. Infatti i microrganismi del suolo presiedono alla formazione e al mantenimento della struttura del suolo, alle trasformazioni della sostanza organica, ai cicli di tutti i nutrienti indispensabili per le piante, il flusso dell'acqua, le risposte agli stress e al mantenimento della fertilità del suolo.

Le teorie ecologiche nello studio della diversità biologica o biodiversità sono state sviluppate essenzialmente per gli ecosistemi presenti sulla superficie del suolo, trascurando per lungo tempo tutte quelle forme di vita presenti all'interno di esso, in particolare i microrganismi, e che rappresentano una enorme quantità di “vita invisibile” di fondamentale importanza per l'intera vita sulla terra (Wardle et al., 1996). Infatti la microflora tellurica rappresenta la parte più rilevante della biomassa del suolo, ed è quella che maggiormente influisce sulle sue proprietà biologiche regolandone tutti i processi biochimici che ne determinano le proprietà nutrizionali (Bloem et al., 2003).

Le diverse specie di microrganismi presenti nel suolo hanno, infatti, ruoli prioritari nelle trasformazioni dell'energia e nei processi biogeochimici, intervenendo nella decomposizione del materiale organico attraverso processi biodegradativi e nel riciclo di elementi essenziali quali carbonio, fosforo, azoto ed altri; in tal modo portano a termine specifiche reazioni di ossido-riduzione che permettono agli elementi di rendersi così disponibili in forme utilizzabili soprattutto dalle piante (Alexander, 1977). La diversità dei microrganismi all'interno di un ecosistema è quindi un elemento chiave anche per il mantenimento in uno stato qualitativamente salutare del suolo agrario (Borneman, 1996).

Il numero dei microrganismi presenti nel suolo e l'abbondanza relativa di ciascun gruppo microbico variano enormemente sia all'interno di suoli differenti che in relazione alle specie vegetali e agli altri organismi presenti. I motivi sono molteplici, sia tecnici che concettuali. Ma perché è così difficile definire e soprattutto “misurare” la diversità microbica del suolo? Ad esempio, basti pensare alla definizione classica di diversità biologica e la sua suddivisione in diversità “ecosistemica, di specie e genetica” attribuita comunemente ad animali e piante; essa può essere estesa anche ai microrganismi del suolo, ad eccezione però

della definizione di diversità di *specie* in quanto non applicabile ad organismi che si riproducono per via asessuata come batteri e virus.

La diversità microbica è quindi comunemente definita in termini di *richness*, ovvero il numero degli individui appartenenti a diversi “gruppi” detti *taxa*, e di *evenness* cioè alla loro distribuzione all’interno dei *taxa* stessi (Atlas et al., 1998).

Il suolo, così come gli altri ecosistemi, presenta una elevata resilienza. Essa è associata alla biodiversità microbica ed aumenta all’aumentare di quest’ultima. Ad esempio, elevati valori di resilienza sono stati osservati in prati e pascoli in cui i batteri sono in stretta associazione con le radici e alle particelle di argilla e presentano un elevato grado di diversità (Lynch et al., 1979). Capita frequentemente che molte comunità microbiche possono mantenere la medesima composizione all’interno di un suolo, ma modificare alcuni processi metabolici con conseguenze a livello funzionale ed ecologico. L’approccio che maggiormente sembra in grado di fornire risposte adeguate nel prossimo futuro è quello *metagenomico* in grado di associare la diversità genetica di intere comunità microbiche a determinate funzioni del suolo (Handelsman, 2004).

La biodiversità del suolo condiziona, direttamente o indirettamente, molte altre proprietà del comparto suolo come, ad esempio, la regolazione del flusso idrico e dei cicli degli elementi nutritivi, nonché la struttura del suolo e il controllo di organismi patogeni, senza contare le numerose interazioni che i microrganismi del suolo instaurano direttamente o indirettamente con le piante, determinandone lo stato di salute e la produttività. Un’altra proprietà del suolo legata alla biodiversità è la “soppressività” del suolo, ovvero la sua propensione a sopprimere la crescita e lo sviluppo di determinati organismi patogeni (Domínguez et al., 2001).

È quindi sempre più evidente che lo stato di salute e la fertilità di un suolo dipendano dalla diversità microbica e che, pertanto, la conoscenza e la conservazione della biodiversità del suolo rappresentano un elemento chiave per il mantenimento della produttività agronomica (Colwell, 1997). In conclusione la comprensione dei processi microbiologici dei suoli a livello metabolico e molecolare è sempre più fondamentale per determinare lo stato di salute e di fertilità di un suolo. Pertanto sono state sviluppate numerose tecniche molecolari che, affiancate dai classici indicatori chimici, fisici e biologici, possono rappresentare preziosi strumenti diagnostici capaci di rispondere a domande rimaste fino ad oggi senza risposta.

1.4.1 La fertilità biologica del suolo

Come è noto il suolo è una matrice complessa ed è considerato un sistema polifasico costituito prevalentemente da una fase solida (50%), una liquida (25%) e una gassosa (25%) (Benedetti et al., 2006).

Tali rapporti sono da considerarsi assolutamente indicativi e possono variare notevolmente a seconda del suolo che si prende in considerazione. L'enorme variabilità dei suoli in funzione della località geografica fa sì che si parli sempre più di "suoli" piuttosto che di "suolo" in senso assoluto. La sua fase solida è costituita da una componente inorganica (96-97%) e una organica (3-4%). Quest'ultima comprende la frazione vivente del suolo, composta da batteri, funghi, alghe, attinomiceti, protozoi, vermi e artropodi, che entra in stretta relazione con le piante formando un sistema unico (Altieri, 1999).

Una delle principali proprietà dei suoli agrari è sicuramente la fertilità. In particolare, per quanto attiene al terreno agrario si deve precisare che, oltre alla funzione di sostenere e nutrire le piante, il suolo deve renderne possibile la loro coltivazione con un utile economico.

Il concetto di fertilità viene, infatti, definito come la capacità del terreno di rendere produttive le colture. Tuttavia, mentre si parla comunemente di fertilità chimica, quindi della somma degli elementi nutritivi in forma assimilabile a disposizione delle colture, e di fertilità fisica, come struttura, tessitura del terreno, molto meno considerata è la *fertilità biologica* del suolo. Con tale termine si vuole caratterizzare l'espressione del metabolismo e del turnover microbico. La fertilità biologica di un terreno può essere dunque definita come una espressione della vita microbica dei suoli e dipende soprattutto dalla sostanza organica e dall'ambiente (Mocali, 2010).

È noto che la funzione dei microrganismi del suolo è di molteplice natura e si esplica sia nei processi pedogenetici che nella nutrizione delle piante. I microrganismi intervengono infatti nella mineralizzazione e nel riciclo della sostanza organica, nel ciclo dell'azoto e degli altri elementi, nella formazione dell'humus e agiscono inoltre sulla mobilizzazione degli elementi minerali. I microrganismi rappresentano, dunque, una componente di fondamentale importanza per la fertilità dei terreni e svolgono un ruolo insostituibile, in mancanza del quale il terreno rappresenterebbe semplicemente un inerte supporto meccanico.

Una delle funzioni più importanti dei microrganismi è appunto quella di presiedere alle trasformazioni a carico degli elementi nutritivi in modo da mantenere un equilibrio di scambio tra suolo e pianta, contribuendo così allo stato di fertilità dei terreni.

I processi del metabolismo del suolo, intesi come trasformazioni di materiali ed energetiche, sono fundamentalmente connessi al turnover microbico sotto l'azione di fattori limitanti sia abiologici che di coazione biologica. La moderna agricoltura dovrebbe infatti prefiggersi lo scopo di raggiungere la massima produttività consentita dalle condizioni edafiche, mantenendo elevato non solo il livello della fertilità chimica, ma anche quello della fertilità biologica (Mocali, 2010).

La fertilità biologica unitamente alla fertilità chimica ed a quella fisica costituisce la fertilità agronomica o integrale dalla quale dipende la produttività. La fertilità tuttavia non è sinonimo di produttività in quanto la prima dipende dal terreno mentre la seconda da entrambe le componenti. Inoltre le basi biologiche della produttività riferite ad un terreno naturale non coincidono con quelle della produttività agronomica in quanto quest'ultima rappresenta un livello produttivo superiore a quello naturale (Mocali, 2010; Sequi et al., 2003).

In questi ultimi anni sono state date molte definizioni di qualità del suolo, ma quella che sembra riassumere meglio il concetto è stata proposta da Doran & Parkin (1994): "La capacità del suolo di interagire con l'ecosistema per mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale e promuovere la salute animale e vegetale".

I microrganismi, ad esempio, vengono spesso utilizzati come indicatori della qualità del suolo perché svolgono delle funzioni chiave nella degradazione e nel ricircolo della sostanza organica e dei nutrienti rispondendo prontamente ai cambiamenti dell'ambiente suolo. Inoltre l'attività microbica nel suolo rispecchia la somma di tutti i fattori che regolano la degradazione e la trasformazione dei nutrienti (Mocali, 2010).

La biomassa microbica è una parte importante degli ingredienti attivi del suolo, responsabile della circolazione dei nutrienti e della degradazione degli inquinanti organici. Gli organismi del suolo sono fondamentali per la sostenibilità degli agroecosistemi, dati i servizi ecologici forniti dalla biodiversità del suolo. È, quindi, importante per definire e incoraggiare le pratiche agricole che incrementano l'abbondanza e la diversità degli organismi del suolo con il miglioramento delle condizioni dell'habitat o della disponibilità delle risorse. La produttività agricola sostenuta può dipendere dalla selezione delle pratiche di gestione che aumentano le attività biologiche del suolo coinvolte nella fissazione dell'azoto atmosferico, nel riciclo del carbonio e delle sostanze nutritive, e nella soppressione dei patogeni del terreno (Altieri, 1999).

1.5 Biodiversità alimentare del Mediterraneo

Nei Paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo, una delle principali eco-regioni del pianeta, che risulta essere, per la sua ricchezza di biodiversità tra i più importanti ecosistemi al mondo, vi è una consapevolezza diffusa della dimensione sociale, culturale, salutistica ed economica del “cibo”, condivisa da tutte le popolazioni dell’area. La diversità delle culture alimentari del Mediterraneo, così come molti elementi della Dieta Mediterranea, sono attualmente a rischio di estinzione a causa della globalizzazione, dell’omologazione degli stili di vita, della perdita di consapevolezza, di significato, di comprensione e apprezzamento, che portano allo sgretolamento del patrimonio mediterraneo e alla mancanza di interesse da parte delle nuove generazioni nei confronti della propria eredità.

La Dieta Mediterranea, riconosciuta come uno dei sistemi dietetici più sani, è una risorsa inesplorata dal punto di vista nutrizionale e della biodiversità.

La diversità delle culture alimentari Mediterranee, espressa attraverso l’ampia varietà di cibi della Dieta Mediterranea, dovrebbe essere riconosciuta come una risorsa per uno sviluppo sostenibile, da salvaguardare e valorizzare, sia nei Paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, al fine del raggiungimento della salute e del benessere nutrizionale di tutte le popolazioni del Mediterraneo. È necessario fare riferimento ad uno *Stile di vita* Mediterraneo, di cui la “dieta” costituisce solo una parte, che comprenda l’attività fisica e sociale, lo svago e il riposo. L’attuale percezione della Dieta Mediterranea è associata principalmente ai suoi benefici salutistici, collegati al consumo di una quantità equilibrata di nutrienti, distribuiti secondo una struttura a piramide.

La Dieta Mediterranea tradizionale è un patrimonio che deriva da millenni di scambi tra popolazioni e culture alimentari nell’area Mediterranea. Ha rappresentato la base delle abitudini alimentari fino alla metà del ventesimo secolo in tutti i Paesi dell’area, ma ora sta progressivamente scomparendo, a causa di un’ampia diffusione dell’economia occidentale, della cultura urbana e tecnologica, della globalizzazione, della produzione e dei consumi. A partire dallo studio “Seven Countries”, condotto negli anni ‘50 e sulla base dei dati raccolti in Grecia, Italia e Jugoslavia, è possibile conoscere quali cibi erano consumati con maggiore o minor frequenza in quest’area. Ciò ha consentito di definire il sistema dietetico mediterraneo tradizionale, ricco di alimenti vegetali (cereali, frutta, verdura, legumi, nocciole, semi e olive), e olio d’oliva come principale fonte di grassi aggiunti, unitamente a un’assunzione elevata o moderata di pesce e molluschi, ad un consumo moderato o basso di uova, pollame e latticini

(formaggio e yogurt), ad un consumo ridotto di carne rossa (principalmente ovina e caprina), pasta e grassi saturi, ed un'assunzione moderata di alcool, principalmente vino, durante i pasti.

Lo studio pionieristico “Seven Countries”, oltre a molte altre indagini più recenti, nonché vari studi di intervento ha identificato i benefici sulla salute, riscontrati in diversi Paesi, associati al rispetto di questo sistema dietetico mediterraneo, per quanto riguarda l'obesità, la sindrome metabolica, i diabete di tipo 2, le malattie cardiovascolari, alcune malattie neurodegenerative e il cancro (Huang et al., 2008).

La Dieta Mediterranea è stata divulgata nel 1995 attraverso la famosa rappresentazione a struttura piramidale (Fig. 1.4), che mette in evidenza graficamente quali cibi vadano consumati quotidianamente, settimanalmente o con minore frequenza.

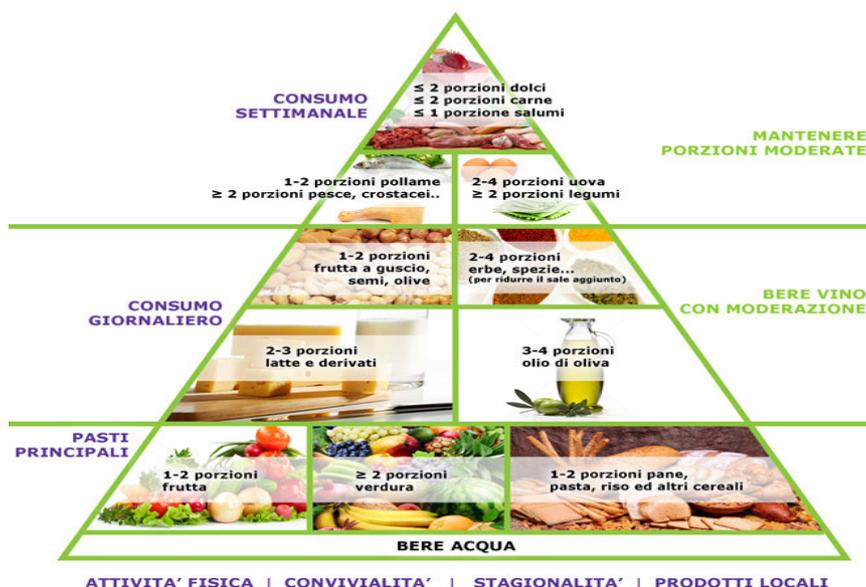


Figura 1.4: Piramide della Dieta Mediterranea moderna (<http://www.progettoalimentazione.it/piramide-alimentare/>).

In un documento del 1986 Gussow & Clancy esploravano la nozione di “diete sostenibili”, raccomandando il consumo dei cibi sia in virtù del loro contenuto nutritivo che rispetto agli ecosistemi da cui provenivano. Il concetto era preso in prestito da quello di “agricoltura sostenibile”, in quanto attività che non spreca le risorse naturali e che produceva cibo finalizzato al consumo locale e stagionale. Similmente, il concetto di dieta sostenibile deriva da quello di “ecologia umana”, termine coniato da Ellen Swallow Richards nel tardo 1800 e applicato ai primi curricula universitari in nutrizione umana. Eppure, la

nozione di dieta sostenibile sarebbe suonata curiosa solo poche centinaia di anni fa, quando le persone ottenevano la maggior parte dei propri alimenti dai propri ecosistemi; la biodiversità era tenuta in considerazione; gli ecosistemi e le zone agro-ecologiche producevano gli stessi cibi che avevano prodotto per millenni. Le conoscenze e le pratiche tradizionali assicuravano, quindi, la conservazione e l'utilizzo sostenibile della biodiversità degli alimenti all'interno di ecosistemi salutari.

Con l'avvento dell'agricoltura moderna e della globalizzazione alimentare, i concetti di dieta sostenibile e di ecologia umana sono stati trascurati a favore dell'intensificazione e dell'industrializzazione dei sistemi agricoli. Ne è risultato un aumento vertiginoso della produzione globalizzata di alimenti, senza tuttavia portare miglioramenti a livello globale in campo nutrizionale. Il risultato sconcertante, secondo le ultime stime dalla FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), è che il numero di persone denutrite è arrivato oltre un miliardo. Tale dato si riferisce solo all'apporto energetico della dieta, mentre la denutrizione in termini di micronutrienti è addirittura più diffusa. Oltre ai citati problemi di denutrizione, l'obesità e i disturbi cronici ad essa associati sono in crescita. Se si associano questi elementi all'allarmante rapidità con cui la biodiversità alimentare si sta riducendo e con cui gli ecosistemi si stanno deteriorando un riesame dei sistemi agricoli e delle diete risulta assolutamente imprescindibile. Mentre una buona nutrizione dovrebbe essere l'obiettivo dell'agricoltura, è imperativo non eludere le problematiche relative alla sostenibilità. Molti sistemi dietetici possono essere salutari, ma possono variare sostanzialmente in termini di costo delle risorse. La Dieta Mediterranea è stata caratterizzata, analizzata e promossa tramite una varietà di metodi nel contesto di numerose discipline scientifiche e applicate. Nell'Area Mediterranea sebbene la sua adozione sia in diminuzione continua ad essere riconosciuta e apprezzata come dieta sostenibile.

Nel 2008, il Rapporto della Conferenza Regionale della FAO per l'Europa conteneva importanti affermazioni sulle diete sostenibili, per esempio "l'obiettivo dell'aumento della produzione di cibo a livello globale, comprendente biocarburanti, dovrebbe essere equilibrato rispetto al bisogno di proteggere la biodiversità, gli ecosistemi, i cibi e le pratiche agricole tradizionali". L'importanza della Dieta Mediterranea per il resto del mondo non sta nella specificità dei cibi e delle sostanze nutritive da essa contemplati, ma nei metodi utilizzati per caratterizzarla ed analizzarla, e nella filosofia di sostenibilità che ne costituisce l'essenza. Questi stessi metodi possono essere utilizzati per caratterizzare le diete sostenibili in altri

ecosistemi e sistemi alimentari, per identificare i nuovi paradigmi di riferimento necessari per affrontare le numerose sfide che l'umanità si trova davanti, con più di un miliardo di persone affamate in tutto il mondo.

La Grecia, l'Italia, il Marocco e la Spagna dovrebbero sviluppare una strategia congiunta per salvaguardare la Dieta Mediterranea, intesa come un unico sistema culturale non frammentabile. Le misure derivanti da tale strategia dovrebbero essere dotate di una propria coerenza interna ed esterna ed essere provviste di una solida base scientifica, costituendo un canale di dialogo aperto permanente, transettoriale ed interculturale, attraverso il quale poter condividere reciprocamente i benefici della Dieta Mediterranea, sia nei Paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo. In particolare, è fondamentale il dialogo tra popolazioni Mediterranee del Nord e del Sud al fine di promuovere la comprensione comune e migliorare la percezione reciproca, necessaria alla valorizzazione degli impegni tra nazioni per salvaguardare questo patrimonio culturale alimentare comune.

Oggi, la Dieta Mediterranea dovrebbe essere studiata e riconosciuta come modello di dieta sostenibile per essere usato anche in altri sistemi alimentari culturali nel mondo per garantire la sicurezza alimentare e il benessere nutrizionale, così come raccomandato dalla Conferenza Internazionale sulla Nutrizione, che ha avuto luogo nel 1992, nella sede della FAO di Roma.

Capitolo 2. *Olea europaea* L.

2.1 La storia di *Olea europaea* L.

L'olivo, pianta millenaria del paesaggio agricolo del Mediterraneo, è stato da sempre apprezzato per i suoi frutti e per l'olio che da essi si ricava. La sua storia s'intreccia con quella dei popoli mediterranei non solo nell'ambito agronomico, ma anche nelle scienze naturali, nell'economia, nella letteratura, nella religione e nelle arti (D'Aponte et al., 2012). Un secolo dopo Cristo, Columella nel suo "De Re Rustica" sosteneva che "*Olea prima omnium arborum est*" cioè "*fra tutti gli alberi il più importante è l'olivo*" (Giudicianni et al., 2006; D'Aponte et al., 2012); e possiamo dire che dopo duemila anni le cose non sono cambiate. La diffusione di questa pianta è attribuita, principalmente, ai Fenici e ai Greci (D'Aponte et al., 2012).

Le prime coltivazioni risalgono al 5000 a.C. in Siria ed a Creta, successivamente i Fenici le diffusero su tutte le coste del Mediterraneo, dell'Africa e del sud Europa, quindi nella penisola iberica e in Italia, dove le prime piante furono coltivate in Sicilia e nella Magna Grecia a partire dal 1000 a.C., favorite dal clima mite, dalla costituzione del terreno e dall'escursione termica moderata tipica della fascia mediterranea, che rappresenta oggi l'area in cui la coltura dell'ulivo è particolarmente diffusa. La pianta, infatti, predilige terreni asciutti, ben soleggiati ed al riparo dalle gelate, per questo prospera in tutta la fascia costiera mediterranea e soprattutto in quella italiana. Le colture dell'ulivo divennero con i Greci sempre più numerose perché l'olio prodotto, normalmente destinato ad insaporire gli alimenti, era largamente impiegato anche per la pulizia e l'igiene, per i massaggi, come base per unguenti e cosmetici, e per alimentare le lucerne (Giudicianni et al., 2006). Un uso corrente era quello di cospargerli sulle aie per inibire la crescita delle erbacce e per allontanare le formiche durante il periodo della trebbiatura. Venivano anche usati, uniti a quelli raschiati dal fondo dalle anfore olearie, per lucidare le pareti degli armadi e tenere lontano le tarme. Oggi sappiamo che questo ultimo effetto era dovuto alla presenza di sostanze fenoliche, ottime tarmicide, in quegli oli densi e maleodoranti (Giudicianni et al., 2006). L'olio d'oliva ebbe un ruolo fondamentale non solo per uso alimentare e nelle palestre (ginnasi) per i massaggi, ma anche come liquido a cui medici illustri come Ippocrate e Galeno, anche se temporalmente molto distanti tra loro, attribuirono eccellenti proprietà terapeutiche e curative. Oggi si può confermare su basi scientifiche che tali proprietà sono da attribuire alla presenza di acidi grassi polinsaturi, in particolare l'acido oleico ed a composti minori quali il tirosolo,

l'idrossitirosolo, il tocoferolo che svolgono in generale un'azione protettiva dell'organismo. Tra i numerosi effetti che sono stati documentati dalla letteratura scientifica sono l'attività antitrombotica, anticolesterolemica e l'inibizione dei radicali liberi, responsabili di dannosi processi degenerativi legati all'invecchiamento delle cellule (Giudicianni et al., 2006).

L'ulivo è definito da Sofocle come "*la dolce nutrice argentea*", testimoniando la sua presenza in ogni atto di vita dell'uomo, scolpita e dipinta in ogni graffito o pittura antica, ed è simbolo della pace e della vita che si rinnova. Lo storico Tucidide, nel V secolo a.C., scriveva: "*i popoli del Mediterraneo cominciarono ad emergere dalla barbarie quando impararono a coltivare l'olivo e la vite*" definendo, in modo molto chiaro, il rapporto tra i popoli del Mediterraneo, la coltivazione e l'importanza di queste specie. I Fenici, invece, chiamavano l'olio "*oro liquido*", in funzione delle sue molteplici proprietà sia alimentari che medicinali. Grazie ai loro traffici, l'olivo si diffuse in tutte le terre bagnate dal Mediterraneo, tanto da portare i geografi a definire i confini della "regione mediterranea" sulla base della sua presenza. A testimonianza di quanto detto, il testo di storia ambientale di Fernand Braudel (1986), narra di una "*civiltà dell'olivo*" nel "*mare degli oliveti*" e si osserva ovunque che nel Mediterraneo "*si ritrova la medesima trinità, figlia del clima e della storia: il grano, l'olivo e la vite, ossia la stessa civiltà agraria, la medesima vittoria degli uomini sull'ambiente fisico*" (D'Aponte et al., 2012).

Di epoca romana sono, poi, i numerosissimi affreschi rinvenuti nelle ville di Pompei aventi come soggetto l'olivo o i numerosi esempi di frantoi romani a vite presenti in tutta la regione e i tanti *doli*, utilizzati per la conservazione degli oli e dei vini (D'Aponte et al., 2012). I Romani, infatti, furono i primi a costruire in modo razionale gli strumenti per la spremitura delle olive ed a perfezionarsi nelle tecniche di conservazione dell'olio (Giudicianni et al., 2006).

Dopo la caduta dell'Impero romano (400 d.C.) ed a seguito delle invasioni barbariche la coltivazione dell'ulivo fu seriamente compromessa, quasi scomparve. Durante il Medioevo ad opera degli ordini monastici che detenevano vastissime e ricchissime zone rurali furono ricreati uliveti di grandi dimensioni che si diffusero in maniera capillare dando vita ad un florido commercio di olio di oliva che raggiunse il culmine soprattutto durante la dominazione spagnola raggiungendo poi, il suo momento d'oro nel Rinascimento. I Monaci Benedettini e Cistercensi, in particolare, ebbero un ruolo decisivo in tale settore dando vita ad innovazioni che riguardarono soprattutto l'igiene del processo di molitura e la diffusione dei frantoi,

utilissimi strumenti di lavorazione, di cui ancora oggi esistono testimonianze (Giudicianni et al., 2006).

2.2 Origine e distribuzione geografica

L'*Olea europaea* L., comunemente detta olivo o ulivo, è una specie emblematica (Breton et al., 2009) ed è considerato uno tra i più importanti e diffusi alberi da frutto nel bacino del Mediterraneo (Conde et al., 2008). La zona di origine dell'olivo (*Olea europaea* L.) si ritiene sia quella sud caucasica intorno al 1500-3000 a.C, sebbene molti la considerino una pianta prettamente mediterranea (Riley, 2002). Questa, infatti, si è ambientata molto bene nel Bacino del Mediterraneo soprattutto nella “fascia dell'arancio” dove appunto la coltura principe è quella degli agrumi associata in ogni modo a quella dell'olivo. In questa fascia sono compresi paesi come l'Italia, il sud della Spagna e della Francia, la Grecia e alcuni paesi mediorientali che si affacciano sul Mediterraneo (Fig. 2.1).

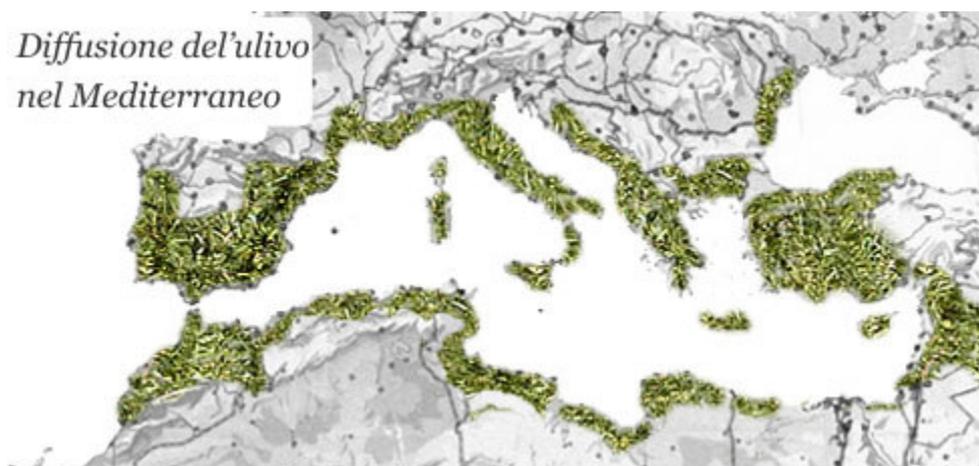


Figura 2.1: Diffusione dell' *Olea europaea* L. (www.pgwineandoil.com).

In Italia, nel corso della storia, l'olivo ha conosciuto alterne vicende, legate a vicissitudini politico-economiche ed ambientali, con periodi di espansione, alternati a periodi di riduzione delle produzioni e con la scomparsa della coltura da ampi comprensori. Tutto ciò ha determinato la presenza di un germoplasma olivicolo ampio, vario e di provenienza spesso incerta (Morrone et al., 2012).

Oggi la coltivazione dell'*Olea europaea* L. e la produzione di olio d'oliva sono diffuse particolarmente in tutto il mondo. La sua area di coltivazione è triplicata negli ultimi 44 anni,

statico, casi di sinonimia e descrizioni di nuove varietà a limitata diffusione e di accessioni rimaste finora praticamente sconosciute rendono la specie *Olea europaea* L. un baluardo della biodiversità.

In Italia il mercato degli oli monovarietali, provenienti cioè da olive di un'unica varietà o cultivar, è in aumento grazie alla presenza di consumatori sempre più attenti agli aspetti salutistici del prodotto olio extravergine di oliva. La caratterizzazione e la salvaguardia delle varietà autoctone è un obiettivo che molte regioni stanno perseguendo. Ogni varietà è diversa dall'altra: alcune varietà hanno una maturazione precoce, altre tardiva; alcune varietà sono resistenti agli stress ambientali, altre sono sensibili ad essi. Di conseguenza, gli oli prodotti da varietà diverse hanno caratteristiche diverse, sia dal punto di vista chimico che da quello organolettico. Inoltre, fondamentale è l'ambiente in cui la pianta si sviluppa, che è il risultato della reciproca influenza di fattori abiotici (terreno, temperatura, acqua, luce, vento) e fattori biotici (organismi viventi animali e vegetali). Tutte le specie presentano in modo più o meno accentuato una sensibilità a questi fattori e gran parte della loro capacità produttiva dipende, da un lato, dalla possibilità dell'ambiente di assecondare le loro esigenze, e dall'altro dalla capacità delle specie ad adattarsi a questo. Vocazionalità è quindi sinonimo di adattamento, e la realizzazione di carte di vocazionalità ha lo scopo di dare un'indicazione delle aree in cui le caratteristiche ambientali permettono lo sviluppo ottimale della coltura, o non impediscono una potenziale coltivazione sostenibile e redditizia (Morrone et al., 2012).

2.3 Identikit di *Olea europaea* L.

L'olivo (*Olea europaea* L.) appartiene alla famiglia botanica delle *Oleaceae* (Tab. 2.1) (Cabras et al., 2004). Questa è una famiglia di medie dimensioni che comprende 600 specie in 25 generi distribuiti in tutti i continenti, tranne l'Antartide, dalle zone temperate del nord alle regioni subtropicali del sud e dalle basse verso le elevate altitudini (Wallander et al., 2000). La famiglia è considerata monofiletica sulla base di diverse sinapomorfie morfologiche. I membri della famiglia sono alberi, arbusti o rampicanti legnosi con foglie opposte, semplici o composte, senza stipole (Conde et al., 2008).

Tabella 2.1: Classificazione di *Olea europaea* L. secondo Arthur Cronquist e APG (Angiosperm Phylogeny Group III) (modificato da Conde et al., 2008).

	Classificazione Cronquist	Classificazione APG
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>
Ordine	<i>Scrophulariales</i>	<i>Lamiales</i>
Famiglia	<i>Oleaceae</i>	<i>Oleaceae</i>
Genere	<i>Olea</i>	<i>Olea</i>
Specie	<i>europaea</i>	<i>europaea</i>

La specie *Olea europaea* che presenta diversi aspetti morfologici, comprende due varietà botaniche: *Olea europaea sativa* e *Olea europaea oleaster*. Le cultivar da olio e da mensa appartengono alla prima, mentre la seconda (*oleaster*) annovera circa 30 specie selvatiche spontanee tipiche della macchia mediterranea. *Olea europaea oleaster*, detta anche Olivastro o Oleastro, è distinguibile dall'altra perché è diffusa nella flora spontanea mediterranea ed è caratterizzata da un portamento per lo più arbustivo, da rametti a volte quadrangolari forniti di spine; produce piccoli frutti ed è provvista di foglie dalle dimensioni ridotte. *Olea europaea sativa*, invece, è conosciuta con il nome volgare di Olivo ed è coltivato da millenni nell'area mediterranea in quanto è l'unica specie della famiglia delle *Oleaceae* con frutto commestibile.

2.3.1 Caratteristiche botaniche

L'olivo è una pianta assai longeva che può facilmente raggiungere alcune centinaia d'anni: questa sua caratteristica è da imputarsi soprattutto al fatto che riesce a rigenerare completamente o in buona parte, l'apparato epigeo e ipogeo che sono danneggiati. L'*Olea europaea* L. è una specie tipicamente termofila ed eliofila, sensibile alle basse temperature (Bown, 1995). Predilige ambienti e climi secchi, aridi e asciutti grazie alla capacità di utilizzare efficacemente l'acqua del terreno e di valorizzare le precipitazioni con un apparato radicale dalla notevole espansione. La pianta ha infatti sviluppato, nel corso dell'evoluzione, caratteristiche morfologiche e meccanismi fisiologici che le conferiscono una spiccata xerofilia.

Vegeta nei terreni sciolti, grossolani o poco profondi, con rocciosità affiorante e fra gli alberi da frutto è inoltre una delle specie più tolleranti alla salinità e può essere coltivato anche in prossimità dei litorali, dal piano sino a 900 metri sopra il livello del mare (Pignatti, 1982).

L'olivo è inoltre una pianta sempreverde, ovvero la sua fase vegetativa è pressoché continua durante tutto l'anno, con solo un leggero calo nel periodo invernale. È una specie tipicamente basitona, cioè che assume senza intervento antropico la forma tipicamente conica (www.agraria.org). L'altezza della pianta di olivo può variare da 3 a 15 metri a seconda della cultivar, delle condizioni pedo-climatiche e dell'ambiente. Le radici sono prevalentemente di tipo fittonanti nei primi 3 anni di età, dal 4° anno in poi si trasformano quasi completamente in radici di tipo avventizio-superficiali, che garantiscono alla pianta un'ottima vigoria anche su terreni rocciosi dove lo strato di terreno, contenente sostanze nutrienti, è limitato a poche decine di centimetri. Il sistema radicale, molto esteso, consente all'albero di sfruttare l'umidità contenuta in un grande volume di terreno e l'elevata pressione osmotica interna lo mette in grado di assorbire acqua anche quando il contenuto idrico del suolo si porta su valori inferiori al punto di appassimento. Nell'albero adulto la zona del colletto (punto di intersezione tra fusto e radice) risulta ingrossata ed ampia (prende il nome di "pedale" o di "ceppaia") ed è caratterizzata dalla presenza di formazioni più o meno sferiche, dalle quali facilmente si sviluppano dei germogli (polloni). Il tronco, grigio-verde e liscio fino al decimo anno circa, poi nodoso, scabro con solchi profondi e contorto assume colore scuro (Baldini et al., 1993); essendo una pianta ultrasecolare può raggiungere dimensioni ragguardevoli, sia in altezza che in larghezza. Sul tronco sono inserite le branche che recano i rami; su cui nascono i germogli. L'olivo ha foglie persistenti e, allo stato selvatico, comincia a fruttificare dopo un lungo periodo giovanile conservando per molti anni una buona produzione; presenta foglie lanceolate disposte in verticilli ortogonali fra di loro, coriacee e lunghe in media da 5 a 8 centimetri. Tali foglie sono piccole, coriacee, di colore verde glauco, glabre e sono rivestite da una cuticola cerosa sulla pagina superiore che contribuisce a limitare le perdite di acqua per traspirazione durante le calde estati mediterranee. Gli stomi, presenti solo nella pagina inferiore, sono ospitati in depressioni del tessuto e protetti da peli stellati che le conferiscono il tipico colore argentato. In tal modo, la funzionalità stomatica è garantita, anche in condizioni di carenza idrica, da meccanismi fisiologici quali l'aggiustamento osmotico, l'adattamento del rapporto radici/foglie, l'accumulo d'acqua nei tessuti e la capacità delle

foglie di assorbire vapore acqueo in presenza di elevata umidità relativa dell'aria. Le foglie si formano sul ramo dalla primavera all'autunno e restano vitali fino a due anni di età; all'ascella di ogni foglia si trova una gemma che potrà dare luogo ad una infiorescenza (se era gemma a fiore) o ad un germoglio (se era gemma a legno). Il fiore dell'olivo è ermafrodita (Baldini et al., 1993), possiede cioè uniti gli organi maschili (due stami) e l'organo femminile (pistillo). I fiori sono ipoginiosi e tetrameri, generalmente con due stami, ma anche con quattro stami in alcune specie. La corolla è attinomorfa e di solito simpetala. Le relazioni filogenetiche tra i generi della famiglia riconosciuti sono stati valutati da un'analisi cladistica delle sequenze di DNA da due loci del cloroplasto non codificanti, l'introne rps16 e la regione trnL-F (Wallander et al., 2000; Conde et al., 2008). Tuttavia, una buona parte delle varietà italiane è auto-sterile, pertanto la fecondazione dell'olivo è prevalentemente eterogama (cioè con piante che presentano due tipi distinti di fiori). La fecondazione è anemofila (ossia avviene per mezzo del vento) anche a notevole distanza tra le piante. Un fenomeno tipico dell'olivo è rappresentato dall'aborto dell'ovario che manifesta in diversa misura nelle diverse varietà e, nella stessa varietà, in proporzioni diverse da un'annata all'altra, è un fenomeno che consiste in una mancata o insufficiente crescita dell'ovario. Meno del 10% dei fiori arriva a completa maturazione con i frutti. I fiori non sono singoli ma riuniti in una infiorescenza simile ad un piccolo grappolo, chiamata comunemente "mignola". Le mignole si sviluppano dalle gemme a fiore che si formano all'ascella delle foglie e cominciano a svilupparsi. Si dice che l'olivo è nella fase della "mignolatura" che è seguita dalla fioritura vera e propria (apertura dei fiori) che, a seconda delle annate e della latitudine, può avvenire tra la fine di aprile e il mese di giugno. Dopo 6 mesi si avrà la maturazione delle olive formatesi dai fiori (circa il 5% dei fiori) (Baldini et al., 1993).

2.3.2 Ambiente e localizzazione

Per un buon impianto dell'ulivo, è stato stimato da Baldini e collaboratori (1993) che sono da considerarsi privilegiati i terreni collinari, con esposizioni a Sud/Sud-Ovest, con altitudini inferiori ai 500 metri sul livello del mare e con pendenza inferiore al 15-18%. Si escludono i suoli di scarsa profondità, franco di coltivazione inferiore a 50-70cm, eccessivamente argillosi con percentuale di argilla superiore al 40% ed eccessivamente acidi con pH inferiore a 6. Infatti, è ben noto che l'olivo tollera un ampio margine di valori di pH del terreno, ma suoli neutri e leggermente alcalini, cioè con pH compresi tra 7 e 8.5,

assicurano il suo migliore sviluppo (Martinez, 1984; Loussert et al., 1978; Chaves, 1975). Questa condizione viene realizzata generalmente in terreni con un alto contenuto di carbonato di calcio, tra il 10% e il 30% (Chaves, 1975). La preparazione del terreno va effettuata nell'estate precedente la messa a dimora delle nuove piantine. Il suolo deve essere completamente sgombrato da pietre affioranti, cespugli ed alberature preesistenti; inoltre il terreno intorno alla pianta deve essere sgombrato da erbe infestanti, quali cespugli e malerbe, questo per favorire l'assorbimento dell'acqua, la circolazione dell'aria, lo sviluppo dell'apparato radicale e l'assorbimento del concime. Si lavora quindi il terreno, a seconda delle esigenze, con aratura e fresatura, o con l'impiego di diserbanti chimici quando possibile. Si può anche procedere ad un livellamento della superficie. Nell'estate precedente a un nuovo impianto, si dovrà effettuare una lavorazione profonda, generalmente a 70-90cm per favorire una buona base agronomica al terreno. Nel caso di terreni con elevati contenuti di limo e argilla e con elevati ristagni idrici, è buona norma realizzare un sistema di drenaggio del terreno, che viene generalmente realizzato dopo le lavorazioni profonde. Al fine di un proficuo rendimento è necessario provvedere ad un'ottimale concimazione e a tal proposito appaiono scontati i vantaggi di una concimazione organica.

La concimazione dell'olivo si basa principalmente su tre elementi fondamentali che, a volte, possono scarseggiare nel terreno: azoto, fosforo e potassio. Oltre agli elementi fondamentali sono importanti, seppur in minime quantità, i cosiddetti microelementi, in particolare il magnesio e il boro.

L'azoto è l'elemento più importante per una migliore attività vegetativa e produttiva. Esso stimola l'accrescimento, favorisce la formazione dei nuovi germogli e dei fiori, agisce sullo sviluppo dei frutti, eccita la funzione clorofilliana e la moltiplicazione cellulare; ne consegue che la massima esigenza di azoto si ha con la primavera fino a giugno. In sostanza senza azoto la pianta non produce nuovi germogli e quindi la produttività risulta compromessa.

Il fosforo, insieme al calcio, è necessario per la formazione dei germogli, per la riproduzione, per l'efficienza dei cloroplasti. Accelera il ciclo biologico specie nella fase di riproduzione neutralizzando l'azione ritardatrice dell'azoto. La carenza di essi si riflette su scarsi sviluppi vegetativi e di fruttificazione.

Il potassio è molto importante per una buona fruttificazione. Regola il consumo d'acqua della pianta attraverso la duplice azione di ritenzione idrica nei tessuti e di controllo

della traspirazione; aumenta inoltre la resistenza della pianta agli eccessi di temperatura e alle malattie fungine. Per quanto riguarda i microelementi, bisogna dire che mentre sono rare le carenze di magnesio, quelle di boro si riflettono sulla fertilità dei fiori femminili e quindi sulla produzione. La boro-carezza si manifesta anche con disseccamento e caduta delle foglie e avvizzimento dei rami. Nel quadro complessivo della nutrizione dell'olivo va aggiunta la sostanza organica, la cui presenza nel terreno è di fondamentale importanza; essa migliora la struttura del suolo, attiva la vita microbica e favorisce l'assimilazione degli elementi nutritivi da parte della pianta. Inoltre è in grado di favorire la ritenzione idrica del terreno.

La diagnostica fogliare è tra le tecniche messe a disposizione per stabilire lo stato nutrizionale dell'olivo e il suo grado d'idratazione. Ciò è vero se si accettano i seguenti presupposti: che la foglia rappresenta il sito principale del metabolismo della pianta; l'analisi della foglia rispecchia lo stato nutrizionale dell'albero e, indirettamente, il livello di fertilità del terreno; che apporti nutritivi distinti si riflettono nelle analisi delle foglie e che le variazioni misurate nella composizione del lembo fogliare sono legate a differenti stadi di sviluppo e di produzione della pianta. L'analisi fogliare offre, inoltre, interessanti possibilità di riconoscere e/o confermare una diagnosi su sintomi visibili di disordine che possono derivare da "deficienze" (Recalde et al., 1966) o "tossicità"; di identificare interazioni sinergiche o antagonistiche tra i nutrienti; di verificare se i fertilizzanti apportati con la concimazione sono stati assorbiti dalla pianta ed, infine, di fornire una valida guida per mantenere ottimale il livello nutrizionale prestabilito. Le fasi fenologiche della pianta (Fig. 2.3), l'età relativa della foglia, la cultivar, gli aspetti pedologici del suolo, lo stadio vegetativo della pianta, i condizionamenti ambientali (freddi primaverili, piogge, siccità), l'applicazione di tecniche colturali (irrigazioni, concimazioni ipogee o fogliari), lo stato produttivo della pianta e la metodologia del campionamento, sono alcuni tra i fattori che debbono essere valutati affinché le informazioni ottenute dall'analisi fogliare possano permettere una corretta interpretazione dello stato nutritivo della pianta e definire le eventuali esigenze nutritive dell'olivo. In uno studio di Chaves (1975), variazioni nei risultati delle analisi fogliari sono state segnalate anche quando la stessa cultivar occupa suoli diversi.

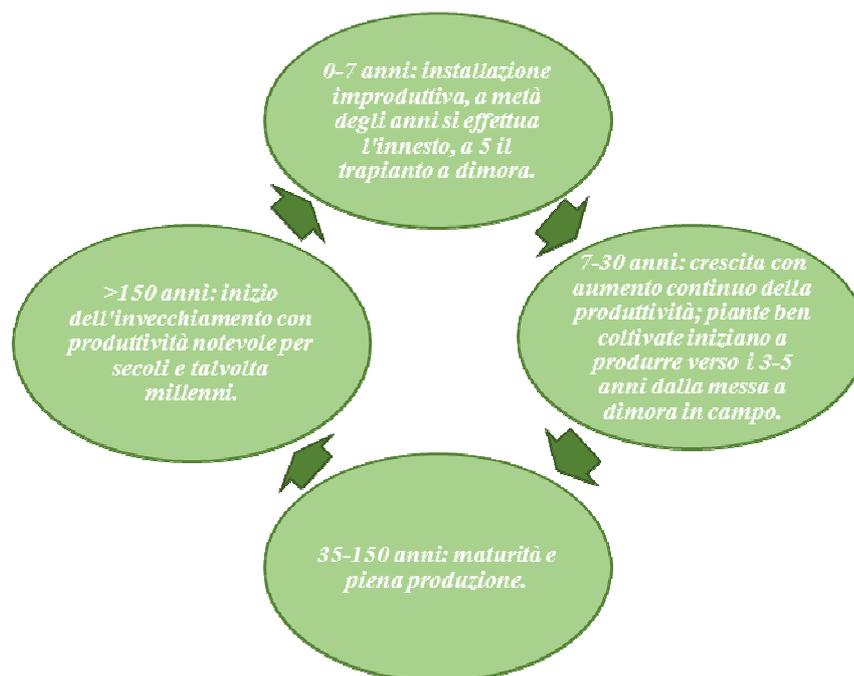


Figura 2.3: Ciclo biologico di *Olea europaea* L. (modificato da Baldini et al., 1993).

Si conferma, ancora una volta, l'interazione del terreno sulle condizioni nutritive della pianta e quindi, la necessità di definire, nell'ambito di aree colturali specifiche, standard nutrizionali a cui fare riferimento per una migliore interpretazione dei dati forniti dalla diagnostica fogliare. Infine, è indubbio che l'azione dei fattori ambientali (pluviometria, siccità), di quelli agronomici (lavorazioni, inerbimenti, sovesci) e della tecnica colturale (potature energiche, irrigazioni di soccorso, concimazioni fogliari) sono elementi in grado di condizionare la ricchezza in nutrienti inorganici nelle foglie di olivo. Una primavera caratterizzata da precipitazioni scarse fa sì che il contenuto di elementi minerali nelle foglie risulti modesto, mentre frequenti piogge primaverili, così come ricche concimazioni fogliari e interventi irrigui di soccorso, favoriscono una maggiore presenza di nutrienti inorganici nelle foglie di olivo (Prévot et al., 1960).

La temperatura riveste particolare importanza in quanto è tra i primi parametri che regolano la distribuzione geografica dell'olivo. Così oggi i limiti termici per lo sviluppo dell'olivo sono definiti tra il 46° di latitudine nord ed il 35° di latitudine sud, comprendendo quindi sia territori delle regioni del Nord Italia, sia territori in Sud Africa ed Australia. La temperatura esercita una influenza decisiva sulla regolazione di numerosi processi fisiologici quali: la traspirazione, la respirazione, la fotosintesi, l'attività enzimatica, la formazione e la degradazione dei diversi composti presenti nel frutto (acidi grassi, polifenoli, clorofilla), la

divisione e la distensione cellulare (Baldini et al., 1993). La temperatura agisce perciò sulla crescita vegetativa, sulla differenziazione morfologica dei vari organi della pianta (gemme, fiori), sull'allegagione (ossia la fase iniziale dello sviluppo dei frutti successiva alla fioritura) e maturazione dei frutti, quindi, in sostanza, sulla capacità produttiva della pianta. L'olivo è particolarmente sensibile alle basse temperature: periodi prolungati al di sotto dei -10°C possono provocare danni irreparabili. Per quanto riguarda gli altri fattori climatici sono dannosi il forte vento, l'eccessiva piovosità e l'elevata umidità dell'aria.

Anche la luce, intesa come flusso totale di energia intercettato dalla chioma, può influire in diversi modi sulla produzione dell'ulivo. È noto che l'azione della luce, necessaria per l'approvvigionamento energetico della pianta, si esplica attraverso intensità fotosintetica. In tal modo controlla la biosintesi dei carboidrati, la formazione delle clorofille e degli antociani, l'apertura stomatica, la traspirazione ed, indirettamente, anche la disponibilità degli elementi nutritivi. Contemporaneamente esplica importanti effetti morfogenetici sullo sviluppo dei vari organi regolando così la crescita vegetativa della pianta e la sua produttività. Le zone della chioma meno illuminate presentano la riduzione delle dimensioni delle foglie, dell'allungamento del ramo, della percentuale di gemme indotte a fiore, della frequenza di fiori con ovario completamente sviluppato, della percentuale di fiori allegati e della pezzatura dei frutti (Baldini et al., 1993).

2.4 Anatomia di *Olea europaea* L.

L'alternanza biennale (Tab. 2.3) della fruttificazione, cioè la produzione di olive, dipende da fattori collegati allo sviluppo annuale della pianta, fattori sia nutrizionali che agronomici quali irrigazione, potatura e raccolta. Inoltre, una maggiore carica di frutti avviene con minor accrescimento di germogli e quindi minor fruttificazione nell'anno successivo (Baldini et al., 1993). La fruttificazione, quindi, può essenzialmente riassumersi in annate con fruttificazione abbondante e ridotta attività vegetativa (carica) che sono seguite da annate con fruttificazione scarsa ma con frutti mediamente più grandi ed eccesso di vegetazione (scarica) (Cabras et al., 2004).

Tabella 2.3: Fasi della fioritura di *Olea europaea* L. (modificato da Cabras et al., 2004).

Primo Anno del periodo biennale	Secondo Anno del periodo biennale
Primavera: accrescimento dei germogli.	Primavera: fioritura, impollinazione, fecondazione.
Estate: induzione fiorale.	Estate: accrescimento del frutto, indurimento del nocciolo.
Autunno: differenziazione fiorale.	Autunno: accrescimento, indurimento, maturazione.
Inverno: riposo.	Inverno: maturazione.

Il frutto carnoso di *Olea europaea* L. è l'oliva, considerato il frutto commestibile e carnoso dell'olivo che, anche se maturo, non si apre spontaneamente per fare uscire il seme; usato a scopo alimentare sia direttamente, dopo adeguata trasformazione, sia come materia prima per l'estrazione dell'olio. L'oliva è classificata come una drupa (Conde et al., 2008), ossia un frutto con nocciolo, di forma ovale e di peso unitario estremamente variabile compreso tra 0.5 e 20 grammi (Baldini et al., 1993; Gucci et al., 2004). La struttura anatomica dell'oliva (Fig. 2.4) risulta essere composta da: epidermide (epicarpo membranoso); polpa (mesocarpo carnoso ricco di olio); nocciolo (endocarpo legnoso); seme o mandorla.

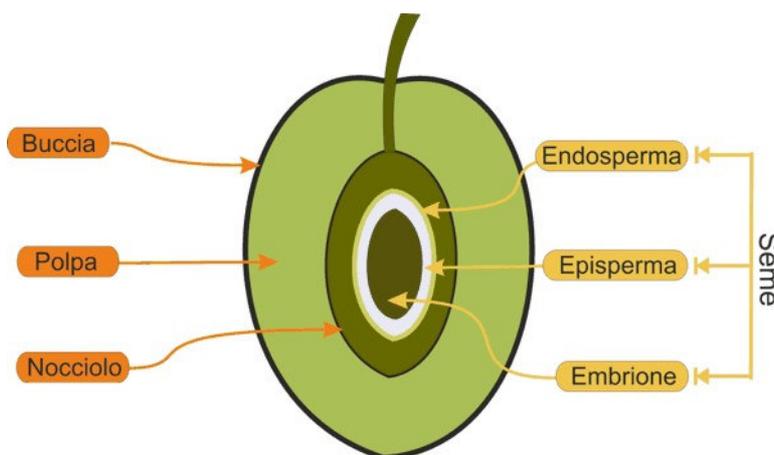


Figura 2.4: Struttura anatomica di *Olea europaea* L. (<https://orodicalabria.wordpress.com/lazienda-agricola/>).

L'epicarpo è comunemente chiamato buccia e può essere compreso tra 1-3% del peso della drupa (Rodríguez et al., 2008). Contiene la clorofilla, i carotenoidi e gli antociani che sono responsabili del colore. È di colore verde (clorofilla) nel frutto acerbo e diviene viola scuro (antociani) a maturità. Il colore della drupa matura può essere anche verde chiaro, rossiccio e biancastro. Ricopre l'epicarpo, la pruina che è una cera protettiva simile a quella che si ritrova sopra la buccia di altri frutti che ostacola la disidratazione del frutto. La pruina passa nell'olio vergine in piccolissime quantità, mentre passa in grandi quantità in quello di sansa estratto con solventi. La pruina si forma verso la fine della maturazione e trattiene i microrganismi provenienti soprattutto dal terreno. Se l'oliva si lacera i microrganismi attaccano gli zuccheri con fermentazioni propioniche e/o butirriche che causano all'olio odori e sapori sgradevoli e questo può accadere alle olive cadute al suolo (Rodríguez et al., 2008).

Il mesocarpo, conosciuto comunemente come polpa, rappresenta il 70-80% del frutto fresco. È la porzione che contiene l'olio ed è considerata la rete di riserva di tutti i componenti. L'olio si trova negli spazi intercellulari e dentro i vacuoli di cellule rotondeggianti e piuttosto grandi che hanno pareti sottilissime ed estremamente elastiche. L'olio le occupa quasi completamente fino a spostarne il nucleo verso le pareti. Le caratteristiche chimiche della polpa sono: la densità (1,01 g/cm³), il pH (5,00), il contenuto di acqua (55-60%) e la sostanza secca (40-45%) (Rodríguez et al., 2008). L'endocarpo è considerato il mezzo di proliferazione dell'*Olea europaea* L. e si colloca tra il 18% e il 22% del frutto intero; costituisce la parte esterna del nocciolo ed è un involucro legnoso formato da cellule lignificate. All'interno del nocciolo è presente la mandorla o seme (2,5-4%) costituita da una membrana esterna (tegumento), da una parte carnosa di colore bianco (albume o endosperma) e dall'embrione. L'endosperma contiene anch'esso una piccola parte di olio difficile da estrarre (Rodríguez et al., 2008).

2.5 Composizione chimica dell'oliva

La composizione dell'oliva può variare anche notevolmente a seconda della varietà, dello stadio di maturazione del frutto e dell'andamento climatico. Risulta difficile parlare di una vera e propria composizione media dell'oliva data la sua notevolissima differenziazione varietale che si traduce in un'elevata variabilità compositiva. Tuttavia, in aggiunta all'olio, che rappresenta il 22% dell'intera drupa, i frutti dell'olivo (Zamora et al., 2001; Nergiz et al., 2009) sono composti da acqua (50%), proteine (1,6%), carboidrati (19,1%), cellulosa (5,8%) e

minerali (1,5%). In particolare, i lipidi presenti nella drupa sono costituiti prevalentemente da trigliceridi, accompagnati da basse percentuali di digliceridi, monogliceridi e acidi grassi liberi. Nel frutto sono anche presenti piccole quantità di fosfolipidi e glicolipidi (Zamora et al., 2001). Il frutto contiene composti idrosolubili quali zuccheri semplici (glucosio, fruttosio e saccarosio), acidi organici (acido citrico, acido malico e acido ossalico) e sostanze azotate, soprattutto proteine. Le proteine più importanti sono costituite da: alanina, arginina, glicina, leucina. È presente nell'oliva anche una frazione insolubile di natura colloidale come cellulose, emicellulose, pectine, proteine strutturali ed enzimatiche (Gucci et al., 2004; Rodríguez et al., 2008) (Fig. 2.5).

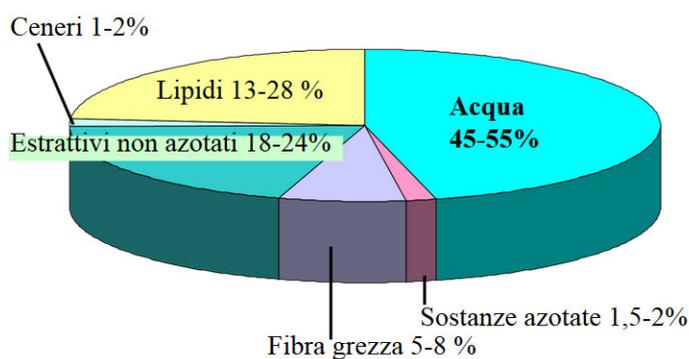


Figura 2.5: Composizione chimica della drupa matura (modificato da Cabras et al., 2004).

L'oliva contiene diverse sostanze che contribuiscono a conferire particolari caratteristiche nutrizionali e/o organolettiche all'olio. Fra queste si ricordano le sostanze fenoliche quali antociani, tannini e l'oleuropeina, un fenolo glicosilato con proprietà antiossidanti e caratterizzante il sapore dell'olio vergine di oliva (Gucci et al., 2004). Nel frutto dell'oliva il principale composto fenolico è l'oleuropeina, un estere eterosidico dell'acido elenolico con l'idrossitiroso, ma sono anche presenti il ligstroside, un estere eterosidico dell'acido elenolico con il tiroso, e il verbascoside, un estere eterosidico dell'acido caffeico con l'idrossitiroso, inoltre sono stati riportati flavoni (luteolin-7-glicoside, luteolin-5-glicoside, apigenin-7-glicoside) e flavonoli (quercetin-3-rutinoside) (Cabras et al., 2004) (Tab. 2.4).

Tabella 2.4: Composti fenolici contenuti nel frutto dell'oliva (modificato da Gucci et al., 2004).

<p>Antociani</p> <p>Cianidina-3-glucoside Cianidina-3-rutinoside Cianidina-3-caffelglucoside Cianidina-3-caffelrutinoside Delfinidina-3-ramnosioglucoside-7-xilosio</p> <p>Acidi Fenolici</p> <p>Acido clorogenico Acido caffeico Acido <i>p</i>-idrossibenzoico Acido protocatechico Acido vanillico Acido siringico Acido <i>p</i>-cumarico Acido <i>o</i>-cumarico Acido ferulico Acido sinapico Acido benzoico Acido cinnammico Acido gallico</p>	<p>Flavonidi</p> <p>Quercetina-3 rutinoside</p> <p>Flavoni</p> <p>Luteolina-7-glucoside Luteolina-5-glucoside Apigenina-7-glucoside</p> <p>Alcoli Fenolici</p> <p>(3,4-Diidrossifenil) etanolo (3,4 DHPEA) <i>p</i>-(Idrossifenil)etanolo (<i>p</i>-HPEA)</p> <p>Secoiridoidi</p> <p>Oleuropeina Demetiloleuropeina Ligustroside Nüzhenide</p> <p>Derivati dell'Acido Idrossicinnamico</p> <p>Verbascoside</p>
---	---

Nella composizione delle olive riveste poi una notevole importanza la frazione fenolica che include i precursori degli antiossidanti naturali presenti negli oli vergini di oliva. I composti fenolici che sono presenti nella drupa in quantità molto elevate dal 0,5 al 2,5% del peso fresco includono tra i componenti più rilevanti l'oleuropeina, la demetiloleuropeina ed il verbascoside che sono anche i responsabili del sapore amaro delle olive. Questi composti sono presenti in modo più consistente nella buccia e nella polpa mentre la mandorla li contiene in concentrazioni molto ridotte (Gucci et al., 2004). Di tutti i componenti fenolici del frutto, nell'olio vergine di oliva sono stati ritrovati: acido vanillico, acido caffeico, fenil-alcoli come il 3,4-diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo) ed il *p*-idrossifeniletanolo (tirosolo) ed i loro esteri con l'acido elenolico, oltre ad un isomero dell'oleuropeina aglicone (Cabras et al., 2004).

L'aspetto più interessante è quello qualitativo, infatti si trovano diverse classi di composti fenolici quali gli antociani, i flavonoli, i flavoni, gli acidi fenolici, i fenil-alcoli, i secoiridoidi, composti più concentrati nel frutto, e i derivati dell'acido idrossicinnamico (Garcia-Salas et al., 2010). Le parti costitutive del frutto presentano una diversa composizione fenolica, infatti i flavonoidi si trovano esclusivamente nel mesocarpo, mentre i secoiridoidi come l'oleuropeina e la demetiloleuropeina sono presenti in tutte le parti costitutive del frutto,

ma in quantità maggiore nel mesocarpo (www.olivicoltura.crpv.it). Il seme presenta una composizione fenolica molto particolare perché oltre a contenere basse concentrazioni di oleuropeina e di demetiloleuropeina, contiene come maggior componente fenilico il nuzhenide (Rodríguez et al., 2008). L'aspetto varietale influenza fortemente la composizione fenolica del frutto. Infatti si è osservato come l'oleuropeina sia presente in tutte le varietà di olive, mentre la presenza di altri composti fenolici dipende dalla varietà considerata. La maturazione dell'oliva poi, che riduce la concentrazione fenolica della drupa, risulta un'altra causa di variabilità compositiva; infatti mentre l'oleuropeina cala durante la maturazione della drupa in tutte le varietà, la demetiloleuropeina tende ad aumentare nelle olive mature rispetto a quelle verdi (Garcia-Salas et al., 2010). Inoltre, l'oliva è rappresentata da polisaccaridi, proteine e da lignina. In particolare, la composizione in zuccheri della parete cellulare evidenzia la presenza di glucosio, arabinosio e xilosio. La frazione pectica delle olive risulta essere caratterizzata dalla presenza di arabinosio e galattosio. La frazione emicellulosica è invece caratterizzata da xilani e xiloglucani (www.olivicoltura.crpv.it).

Tra gli enzimi più studiati per i loro risvolti di natura tecnologica nell'estrazione meccanica degli oli vergini di oliva ci sono alcune idrolasi ad attività depolimerizzante ed alcune ossidasi. Tra quelli depolimerizzanti, si trovano enzimi glicosidasici presenti praticamente solo nel mesocarpo; tale attività è fortemente influenzata dallo stato di maturazione del frutto e dalla cultivar; sono presenti anche altri enzimi depolimerizzanti quali cellulasi e pectinasi. Tra le ossidoriduttasi vanno citate le polifenolossidasi, la perossidasi e la lipossigenasi. I primi due enzimi esplicano la loro attività sui polifenoli riducendo la loro quantità e provocando modificazioni sensoriali negative. Al terzo enzima invece è associata la formazione del *flavour* dell'olio durante il processo estrattivo. Lo stato di maturazione del frutto sembra influenzare sia l'andamento dell'attività totale delle ossidoriduttasi, sia la loro distribuzione nelle parti costitutive della drupa (Conde et al., 2008).

Ci sono due fonti di carboidrati per la crescita del frutto e la biosintesi dei lipidi nell'oliva. Quella principale è provvista di zuccheri traslocati nel floema dalle foglie mature ai siti di *storage*; la seconda fonte è costituita da zuccheri formati attraverso la fotosintesi nei frutti stessi. Le olive, infatti, restano verdi per un periodo considerevole dato che i cloroplasti sono attivi anche quando esse cambiano colore con l'avvicinarsi della maturazione (Conde et al., 2008). Mentre la clorofilla è localizzata maggiormente nell'esocarpo, il mesocarpo contiene significative quantità di fosfoenolpiruvato carbossilasi (Sánchez, 1994), l'enzima per

la fissazione della CO_2 dei *pathways* fotosintetici delle CAM e C4. Durante il periodo di sviluppo, è richiesta un'intensa respirazione mitocondriale di zuccheri importati dal floema per sostenere la crescita e la divisione cellulare. Questo intenso metabolismo e l'impermeabilità della cuticola del frutto, comportano un accumulo della CO_2 a concentrazioni elevate nello spazio libero cellulare del frutto. Inoltre, dopo l'equilibrio CO_2/CO_3 , la fosfoenolpiruvato piruvato carbossilasi citosolica catalizza la fissazione del bicarbonato in ossalacetato, che è convertito in malato dalla malato deidrogenasi. Il malato può essere decarbossilato dagli enzimi malici citosolici o mitocondriali per produrre piruvato e CO_2 ; quest'ultimo è fissato fotosinteticamente in trioso-fosfato nei cloroplasti del frutto durante la fase luminosa. La fotosintesi del frutto, quindi, dovrebbe giocare un ruolo importante nella re-fissazione della CO_2 prodotta dalla respirazione mitocondriale dei fotoassimilati importati dal floema (Sánchez et al., 2002). Dato che la fotosintesi nei frutti, misurata tramite analisi dei gas infrarossi attraverso lo scambio di CO_2 , raramente raggiunge il punto di compensazione, è stato ipotizzato che il contributo dell'organo all'economia del carbonio è piuttosto modesta (Blanke et al., 1989). Alla luce di tali considerazioni, è possibile concludere che la fotosintesi del frutto apporta un contributo positivo alla crescita del mesocarpo e alla biogenesi dell'olio di oliva (Sánchez, 1995).

2.6 Sviluppo e maturazione del frutto di *Olea europaea* L.

All'interno delle olive durante la maturazione avvengono numerosi processi di trasformazione chimica e di sintesi di sostanze organiche, tra questi specialmente importante è la sintesi di trigliceridi che si accumulano nei vacuoli e che costituiscono, quasi del tutto l'olio di oliva. La maturazione dei frutti avviene in ottobre nelle varietà precoci, mentre, in quelle medio-tardive più tardi, solitamente in dicembre e gennaio. Con il procedere della maturazione il colore dell'epidermide cambia passando dal verde intenso, al giallo e quindi al violetto, iniziando con piccole macchie fino a completa "invaiaatura", per assumere a maturazione fisiologica, o un colore rosso-vinoso oppure nero-corvino, conseguenza della progressiva scomparsa delle clorofille e dell'accumulo di antociani (Cabras et al., 2004). Contemporaneamente al viraggio del colore si svolge la maturazione o "inolizione" durante la quale nella polpa diminuisce il contenuto in acqua, zucchero e acidi e aumenta quello in olio. Le olive vengono raccolte quando raggiungono il punto giusto di inolizione, di contenuto antiossidante e di proprietà organolettiche (Baldini et al., 1993). Durante il tempo di raccolta

tipico per effettuare la produzione dell'olio, il mesocarpo contiene circa il 60% di acqua, il 30% di olio, il 4% di zuccheri, il 3% di proteine, e il resto è soprattutto fibra vegetale. L'endocarpo, invece, contiene il 10% di acqua, il 30% di cellulosa, il 40% di altri carboidrati e circa l'1% di olio. Nel medesimo tempo di raccolta, il seme ha il 30% di acqua, il 27% di olio, il 27% di carboidrati e il 10% di proteine (Connor et al., 2005).

Le olive quando si sviluppano, mostrano cambiamenti nella misura, composizione, colore, consistenza, sapore e nella loro suscettibilità ai patogeni (Conde et al., 2008). Dal punto di vista fisiologico, anche alla maturazione corrisponde una serie di modificazioni: aumento percentuale in peso della polpa; aumento dell'attività fotosintetica e respiratoria della drupa; variazione del colore dell'epicarpo e del mesocarpo; aumento dell'attività fotosintetica e respiratoria della drupa; variazione del colore dell'epicarpo e del mesocarpo; aumento degli enzimi pectolitici; cambiamento della consistenza della polpa; diminuzione degli zuccheri e delle sostanze azotate; accumulo di acidi grassi e trigliceridi, variazione della matrice dei componenti minori tra cui polifenoli, tocoferoli, idrocarburi, clorofille e steroli (Cabras et al., 2004). Di conseguenza, lo sviluppo del frutto dell'oliva e la maturazione sono una combinazione di eventi biochimici e fisiologici che si verificano sotto stretto controllo genetico e sotto l'influenza di diversi fattori ambientali (Connor et al., 2005).

La crescita e lo sviluppo del frutto dell'oliva dura 4-5 mesi e include 5 fasi (Fig. 2.6) principali (Lavee, 1996; Manrique et al., 1999; Proietti et al., 1999), che coinvolgono la divisione cellulare, l'espansione cellulare e la conservazione dei metaboliti, prevalentemente, ma non esclusivamente, nel seguente ordine: (I) fertilizzazione e allegazione, dalla fioritura ad approssimativamente 30 giorni successivi, caratterizzata da una rapida e precoce divisione cellulare che promuove la crescita dell'embrione. (II) Lo sviluppo del seme, un periodo di rapida crescita del frutto dovuto sia ad intensa divisione cellulare e che ad un allargamento che coinvolge principalmente la crescita e lo sviluppo dell'endocarpo, con uno sviluppo minore del mesocarpo. (III) L'indurimento seme/nocciolo, durante il quale la crescita del frutto rallenta poiché le cellule dell'endocarpo smettono di dividersi e diventano sclerificate. (IV) Lo sviluppo del mesocarpo, che rappresenta il secondo periodo importante per la crescita del frutto, dovuto principalmente allo sviluppo del mesocarpo attraverso l'espansione di cellule della polpa preesistenti e all'intenso accumulo di olio. (V) La maturazione, quando il frutto cambia da verde scuro a un più chiaro verde/viola, sebbene esso può essere determinato

in modo più accurato in campo osservando l'insorgenza del rammollimento del frutto (Conde et al., 2008; Gucci et al., 2004).

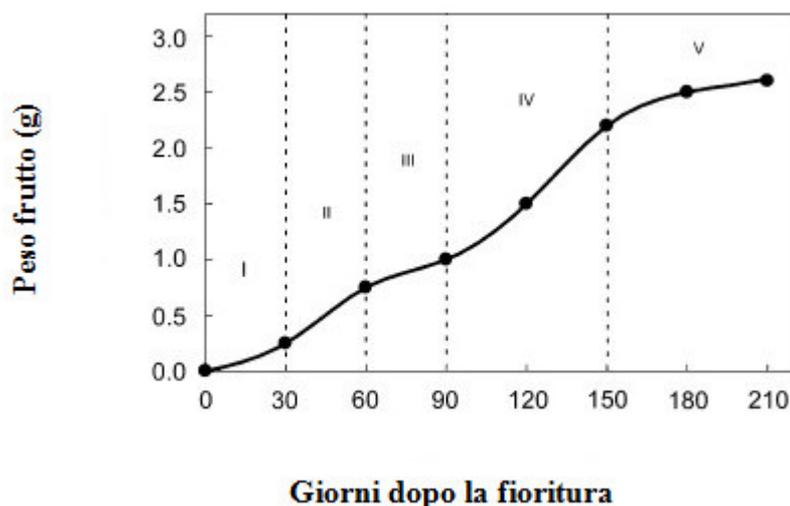


Figura 2.6: Crescita del frutto dell'oliva e fasi dello sviluppo del frutto (adattato da Conde et al., 2008).

Nella prima fase di maturazione del frutto, l'olio si presenta sotto forma di minuscole gocce racchiuse in piccolissime sacche membranose che ne impediscono il contatto con il protoplasma (Cabras et al., 2004). Durante la fase di maturazione, il rapido cambiamento nella consistenza del frutto avviene in un periodo di 1-2 settimane e può essere osservato come un cambiamento di consistenza più dura quando il frutto è difficile da schiacciare (stadio verde), ad una consistenza più soffice quando il frutto può essere facilmente schiacciato ed è rilasciato un po' di succo (stadio tardivo) (Fig. 2.7). Questo processo è progressivo e lento, specie con minore irradianza solare. Come il frutto matura, la sostanza secca continua ad aumentare con la sintesi dell'olio, anche se a un ritmo più lento rispetto alla fase precedente (Conde et al., 2008).



Figura 2.7: Variazione del peso dell'oliva durante la sua crescita (modificato da www.arsia.it).

Successivamente l'olio occuperà circa l'80% dello spazio intracellulare, tuttavia solo, il 70-85% risulta libero, essendo racchiuso da una struttura membranosa vacuolare mentre la frazione rimanente (olio legato) sarà dispersa sotto forma di minute goccioline nel citoplasma, questo olio è di difficile estrazione (Cabras et al., 2004).

Il tempo di raccolta migliore è quindi considerato, quando la polpa dell'oliva ha un perfetto equilibrio di acido grasso, sia dal punto di vista nutrizionale che della stabilità ossidativa, come anche il più alto potere antiradicalico dovuto all'alto contenuto di fenoli totali e tocoferoli (Rotondi et al., 2004). Inoltre, i livelli più alti di sostanze fenoliche presenti in queste olive aumentano le proprietà nutrizionali dell'olio risultante e contribuiscono agli effetti salutistici positivi e ben conosciuti della cosiddetta "Dieta Mediterranea" (Conde et al., 2008). Osservazioni condotte a livello citologico, hanno evidenziato come l'olio compaia nelle cellule del mesocarpo quando l'indurimento del nocciolo è già completo. A questo punto si ha il trasferimento delle goccioline di olio, rivestite da una membrana, nei vacuoli. Il protoplasma nel contempo va incontro ad una forte degradazione, sino a ridursi, al termine della inolizione ad un sottile strato a ridosso della parete, lasciando la maggior parte del volume cellulare all'olio. La velocità di accumulo dei trigliceridi raggiunge il suo massimo durante l'invaatura (fino a 40mg/frutto alla settimana), anche se è stato osservato che la maggior parte dei trigliceridi viene sintetizzata ad invaatura non ancora iniziata (Cabras et al., 2004).

Al procedere della maturazione sino a giungere alla surmaturazione, il contenuto di fenoli totali dell'oliva diminuisce significativamente, raggiungendo la metà dei valori iniziali (Conde et al., 2008); l'attività degli enzimi pectolitici aumenta, provocando il rammollimento della polpa; ciò favorisce la fuoriuscita dai vacuoli di lipasi e fenolossidasi, con conseguenti profonde alterazioni della composizione chimica del frutto che porta ad una degradazione dell'olio e della sua qualità (Cabras et al., 2004). Inoltre, anche il rapporto tra acido oleico ad acido linolenico diminuisce considerevolmente, dovuto ad un incremento della sintesi dell'acido linoleico. L'incremento sincronizzato nell'insaturazione in acido grasso e la diminuzione in antiossidanti in oli prodotti da olive nere troppo mature rende questi oli più inclini ad auto-ossidazione durante la conservazione (Rotondi et al., 2004). Infine, c'è una perdita significativa di alcune caratteristiche attrattive come l'amaro, il piccante, l'aroma verde-foglia e sapori piacevoli (Conde et al., 2008).

2.7 Metodo di raccolta e lavorazione delle olive

Il momento della raccolta varia a seconda delle zone, della varietà di oliva e del clima. Nell'Italia centrale, tale periodo cade in genere fra novembre e dicembre, nel momento in cui hanno raggiunto le massime dimensioni e il massimo punto di inolizione. Si deve tenere presente che le olive sono soggette a progressiva "cascola", cioè distacco naturale o per eventi atmosferici delle drupe, tipico di ogni cultivar; con il passare del tempo la "cascola" porta alla perdita della quantità e della qualità del prodotto (Gucci et al., 2004).

Per oliveti di grandi estensioni servono, per la raccolta, grandi quantità di mano d'opera, infatti la meccanizzazione della raccolta non è molto diffusa e talvolta è addirittura irrealizzabile. Peraltro la progressiva carenza di mano d'opera orienta sempre più le aziende di una certa dimensione a dotarsi di strumenti per la raccolta meccanica. Le olive raccolte vengono immagazzinate e quindi, poi, lavorate al frantoio. Le tecniche adottate nella raccolta variano da regione a regione soprattutto in relazione alle caratteristiche degli alberi, alla potatura e alla conseguente altezza delle fronde. La raccolta può avvenire in diversi modi: brucatura, pettinatura, raccattatura, abbacchiatura e raccolta meccanica. La brucatura avviene raccogliendo le olive direttamente dalla pianta; è questo il sistema migliore ai fini della qualità dell'olio, ma è anche quello più faticoso e meno produttivo. La pettinatura prevede che la raccolta avvenga manualmente come la brucatura ed è meno faticosa della prima perché agevolata da attrezzi dentati detti "pettini", di conseguenza grazie all'utilizzo di macchine

agevolatrici mosse da motori elettrici o pneumatici, la raccolta è più veloce. Con la raccattatura, si raccolgono le olive che sono spontaneamente cadute a terra avendo raggiunto il punto di maturazione fisiologica, tali olive presenteranno un punto di acidità molto elevato. L'abbacchiatura, invece, consiste nel percuotere le piante con lunghi bastoni; questo sistema è poco redditizio e può provocare gravi lesioni all'albero predisponendolo alla penetrazione di malattie. Infine, la raccolta meccanica per mezzo di macchine scuotitrici che avviene per mezzo dello scuotimento della pianta e le olive, che hanno raggiunto la maturazione fisiologica, cadono in una rete posta alla base (Gucci et al., 2004).

La raccolta chimica mediante l'applicazione di ormoni cascolanti come l'acido abscissico, non ha dato risultati validi perché oltre alle olive cadono anche le foglie e se l'olivo perde oltre il 40% delle foglie viene compromessa la produzione dell'anno successivo (www.centrostudiagronomi.blogspot.com).

2.8 L'estrazione dell'olio dalle olive

Non tutto l'olio presente nelle olive è "libero": una parte di esso è racchiuso nelle cellule non rotte, una parte è sotto forma di dispersione nel sistema colloidale (microgeli) della pasta di olive ed, infine, una parte legata in emulsione con l'acqua di vegetazione. Le goccioline di olio "legato" risultano di difficile estrazione in quanto esse sono circondate da una membrana, di natura lipoproteica (fosfolipidi e proteine), che stabilizza lo stato di emulsione e di dispersione, stabilità inoltre che è tanto maggiore quanto più ridotte sono le dimensioni delle goccioline che peraltro, trovano impedimento a riunirsi in gocce più grandi.

Le operazioni che si compiono in oleificio, prima e durante la separazione della fase solida da quella liquida, hanno la finalità di incrementare la quantità di olio "libero", allo scopo di poter conseguire una più alta resa di estrazione, ad esempio facendo in modo che le goccioline si possano riunire in gocce più grandi in grado di separarsi in una fase liquida continua. La trasformazione olivicola applica diverse tecnologie di estrazione, tra le quali le più diffuse sono la pressione, la centrifugazione in due o tre fasi ed il percolamento. Qualunque sia la scelta, esiste una serie di operazioni comuni a tutti i sistemi di lavorazione, esse sono: defogliazione e lavaggio; frangitura; gramolazione; estrazione (Gucci et al., 2004).

Quando le olive giungono in frantoio, si rende necessaria l'eliminazione delle foglie ed il lavaggio che vengono effettuate da macchine automatiche provviste di un sistema di aspirazione, per l'asportazione delle foglie e, di una vasca a circolazione forzata dell'acqua,

per il lavaggio delle olive. La fase successiva è costituita dalla frangitura, operazione che ha lo scopo di rompere le cellule della polpa e determinare la fuoriuscita dell'olio dai vacuoli, con formazione di gocce di maggiori dimensioni in grado di separarsi dalle altre fasi. Successivamente, c'è la gramolazione che consiste in un movimento continuo e lento dell'impasto realizzato con apparecchiature chiamate gramolatrici, che ha lo scopo di aumentare la percentuale di olio "libero". Dalle paste derivanti dalla gramolazione, l'olio può venire estratto mediante pressione, centrifugazione e percolamento. L'estrazione dell'olio con la pressione si realizza, essenzialmente, con un sistema premente costituito da una pressa idraulica che agisce su una torre formata sovrapponendo diaframmi filtranti, chiamati "fiscoli", alternando strati di pasta di olive, distribuita a forma di corona circolare sui fiscoli, a dischi metallici. L'inserzione dei dischi metallici ha lo scopo di uniformare la distribuzione della pressione. Il sistema della centrifugazione realizza la separazione delle fasi liquide e di quella solida sfruttando la differenza tra i pesi specifici dei liquidi immiscibili e del materiale solido, esaltata dalla forza centrifuga. La centrifuga orizzontale (decanter) è costituita da un tamburo cilindro-conico che porta all'interno un corpo pieno di uguale forma con la superficie alettata a vite senza fine. Una leggera differenza tra la velocità di rotazione del tamburo e della vite interna, più veloce, permette la separazione della sansa verso un'estremità della centrifuga, mentre l'olio e l'acqua si separano dall'altra estremità. L'olio ed i mosti oleosi ottenuti vengono definitivamente separati nelle centrifughe verticali a scarico automatico. L'estrazione dell'olio dalle olive con il sistema del percolamento sfrutta la differenza di tensione superficiale tra olio ed acqua: immergendo una lamina di acciaio nella pasta di olive, essa si bagna preferenzialmente di olio in quanto la tensione interfacciale dell'olio è inferiore a quella dell'acqua di vegetazione (Gucci et al., 2004).

2.9 Composizione chimica dell'olio

Una serie di interazioni complesse tra fattori intrinseci alla materia prima (varietà, condizioni di coltivazione, stato sanitario dei frutti, stadio di maturazione) ed altri esterni, legati alla tecnologia di trasformazione (modalità di raccolta, modalità e tempi di stoccaggio delle olive, tecnologia di trasformazione, conservazione del prodotto finito) influenzano le caratteristiche dell'olio (Cabras et al., 2004).

L'olio vergine d'oliva si ottiene unicamente per estrazione meccanica, e può essere consumato direttamente, senza alcun ulteriore trattamento fisico-chimico di raffinazione o

rettificazione (Gucci et al., 2004). Come la maggior parte dei grassi vegetali, l'olio di oliva è costituito per il 98-99% da una miscela di gliceridi, esteri del glicerolo con acidi grassi, detta anche frazione "saponificabile" e, per il rimanente 1-2% da un insieme di composti minori che rappresentano "l'insaponificabile". Mentre i componenti della prima frazione, con alcune eccezioni di ordine quantitativo, sono pressoché uguali in tutti gli oli di oliva, quelli della seconda, invece, subiscono variazioni qualitative e quantitative molto importanti e tali da comportare una netta differenziazione principalmente organolettica, ma anche nutrizionale, dietetica e merceologica, sia tra i diversi tipi di oli vergini ed extravergini, sia in maniera più radicale tra questi e gli oli di oliva. Nella frazione saponificabile, accanto ai trigliceridi, sono presenti, sia pur in quantità minime, digliceridi (2-3%) e monogliceridi (0,1-0,2%). I digliceridi possono presentarsi in forma 1,2 o 1,3, in relazione a quali atomi di carbonio siano esterificati; le due forme non sono equivalenti in quanto le forme 1,3 derivano da idrolisi e le forme 1,2 da incompleta biosintesi. Le 1,2 derivando da incompleta biosintesi, predominano negli oli più freschi, e nel tempo isomerizzano verso la forma 1,3. La predominanza di 1,2 digliceridi, quindi, è stata posta in relazione alla freschezza dell'olio. Nell'olio di oliva sono presenti sia trigliceridi semplici, ovvero in cui uno stesso acido grasso esterifichi tutte le funzioni alcoliche del glicerolo, sia trigliceridi misti, in cui intervengono due o tre acidi differenti. Il trigliceride predominante nell'olio di oliva è la trioleina che costituisce circa il 41% dei trigliceridi totali. La biosintesi dei trigliceridi nel tessuto del frutto dell'olivo, a differenza di quanto avviene nei tessuti del seme, segue la regola "1,3-random 2- restricted distribution", ovvero in cui la funzione alcolica secondaria del glicerolo viene di preferenza esterificata dai due maggiori acidi grassi insaturi, a scapito degli acidi grassi saturi che si distribuiscono statisticamente nelle posizioni 1 e 3 (Cabras et al., 2004).

Gli acidi grassi, che costituiscono i composti più importanti di questa frazione, sono alla base del valore nutrizionale "tradizionale" dell'olio vergine di oliva. In passato, infatti, la qualità nutrizionale dell'olio d'oliva era attribuita solamente all'alto livello di acido oleico, il quale era presente, in elevate concentrazioni, quasi esclusivamente in questo olio vegetale (Gucci et al., 2004).

La composizione in acidi grassi dell'olio di oliva, qualunque sia la provenienza, è dominata dalla predominanza dell'acido oleico che assume valori oscillanti entro un intervallo compreso tra 59% e oltre 76%, in relazione a condizioni climatiche e varietali: è cosa nota che gli oli di zone a clima caldo presentino contenuti di acido oleico più limitati di quelli ottenuti

in zone a clima più freddo. Il contenuto di acido oleico nell'olio di oliva vergine è il più alto tra tutti gli oli ed i grassi alimentari e, si trova, in posizione 2 del gliceride in una percentuale altissima (98-99%). Nella frazione insaponificabile sono presenti, in concentrazioni molto basse, varie classi di composti chimici che svolgono un ruolo fondamentale sia nella valutazione della genuinità dell'olio di oliva sia ai fini di tipicizzazione degli oli per provenienza o cultivar. In letteratura sono segnalate circa 230 sostanze; alcune rappresentano la parte principale della nota aromatica dell'olio (profumi-sapori), altri ancora sono efficaci antiossidanti naturali in grado di conferire al prodotto resistenza all'invecchiamento ed ai processi ossidativi. Si tratta, in ogni caso, di prodotti secondari del metabolismo che rivestono un ruolo importante perché coinvolti in numerosi processi biochimici e fisiologici. L'insieme di composti minori che costituiscono l'insaponificabile sono rappresentati da: idrocarburi, alcoli alifatici, alcoli terpenici, steroli, tocoferoli, costituenti fenolici e pigmenti (Cabras et al., 2004). Alla frazione dei costituenti minori appartengono in particolare gli antiossidanti naturali degli oli vergini di oliva rappresentati dai carotenoidi, tocoferoli e sostanze fenoliche idrofile. Questi antiossidanti (Tab. 2.5), sono i composti che maggiormente possono essere correlati alla qualità salutistica dell'olio vergine di oliva (Gucci et al., 2004).

Tabella 2.5: Composti fenolici contenuti nell'olio extravergine di oliva (modificato da Gucci et al., 2004).

Acidi fenolici e derivati Acido Vanillico Acido Siringico Acido <i>p</i> -cumarico Acido <i>o</i> -cumarico Acido gallico Acido caffeico Acido protocatechico Acido <i>p</i> -idrossibenzoico Acido ferulico Acido cinnammico 4-(acetossietil)-1,2-diidrossibenzene Acido benzoico	Idrossi-isocromani Alcoli Fenolici (3,4-Diidrossifenil) etanolo (3,4 DHPEA) <i>p</i> -(Idrossifenil)etanolo (<i>p</i> -HPEA) (3,4-Diidrossifenil) etanolo-glucoside Lignani (+)-1 -Acetossipinoresinolo (+)-Pinoresinolo	Flavonidi Apigenina Luteolina
Secoiridoidi Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al 3,4-DHPEA (3,4 DHPEA-EDA) Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al <i>p</i> -HPEA (<i>p</i> , HPEA-EDA) Oleuropeina aglicone (3,4 DHPEA-EDA) Ligustroside aglicone Oleuropeina aglicone (3,4 DHPEA-EDA) Oleuropeina Forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone Forma dialdeidica del ligustroside aglicone		

Negli oli di oliva vergini, gli idrocarburi costituiscono il 30-50% in peso dell'insaponificabile. Lo squalene può costituire l'80% della parte idrocarburica. La classe di composti maggiormente studiati della frazione insaponificabile dell'olio di oliva come degli altri oli vegetali è quella degli steroli, che possono essere in parte liberi ed in parte esterificati con acidi grassi in quantità variabili. Negli oli di oliva lo sterolo principale è il β -sitosterolo. Gli oli di oliva vergini sono gli unici grassi vegetali che contengono naturalmente quantità apprezzabili di sostanze fenoliche; la maggior parte di questi composti si trova in natura in forma coniugata, esterificati o eterificati nei glicosidi. La differente presenza dei composti fenolici nell'olio e nell'oliva è da porre in relazione a reazioni di ossidazione ed idrolisi in questi composti, dovute in parte al pH acido del mezzo e al contatto con enzimi come la polifenolossidasi presente nella polpa delle olive che provocano, tra l'altro, la comparsa di fenoli liberi che a seconda della diversa solubilità, presentano un differente equilibrio di ripartizione nelle tre fasi: acquosa, grassa e solida (polpa). L'interesse per la composizione fenolica dell'oliva deriva dal fatto che accanto agli acidi fenolici ed ai flavonoidi (flavonoli, flavoni ed antociani), molto rappresentati nel mondo vegetale, sono presenti i secoiridoidi: oleuropeina, demetiloleuropeina, ligustroside e verbascoside ed i loro derivati, che sono composti specifici dell'oliva. L'oleuropeina, glucoside amaro presente nelle foglie e nelle olive verdi dell'*Olea europaea*, rientra nel gruppo dei "glucosidi secoiridoidi". Questi sono naturalmente presenti in numerose piante appartenenti alle *Oleaceae* in differenti parti anatomiche come foglie e frutti sottoforma di D-glucosidi solubili in acqua (Cabras et al., 2004). Recentemente, è stata dimostrata la presenza negli oli anche di modeste quantità di oleuropeina glucoside (Gucci et al., 2004).

Tra i secoiridoidi distinguiamo una classe definita "secoiridoidi del tipo oleuropeina" caratterizzata dalla presenza di un gruppo funzionale esociclico 8,9 olefinico. Un'altra rilevante peculiarità è l'esterificazione del gruppo carbossilico con una funzione alcolica rappresentata dal 3,4 diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo) o dal 4-idrossifeniletanolo (tirosolo) (Cabras et al., 2004).

La presenza di sostanze fenoliche idrofile nell'olio vergine di oliva è un aspetto fondamentale della sua qualità che è strettamente correlata con le numerose e specifiche funzioni di questi composti (Gucci et al., 2004).

2.10 Pigmenti

Il colore dell'olio di oliva è dovuto alla presenza di pigmenti liposolubili quali i carotenoidi e le clorofille. Nell'olio vergine di oliva differenti carotenoidi: neoxantina, xantofille, luteoxantina, violaxantina, anteraxantina, mutatoxantina, β -carotene e luteina sono presenti ad una concentrazione che varia da 0,5 a 15,0 mg/Kg in relazione alla varietà di olive, al grado di maturazione, alla conservazione dei frutti ed al metodo di estrazione dell'olio; il contenuto di tali composti diminuisce durante la maturazione dei frutti e la loro conservazione prima della estrazione. I carotenoidi sono pigmenti rossi, gialli ed arancioni, naturalmente presenti nell'olio vergine di oliva e caratterizzati dalla presenza di più unità isopreniche.

La colorazione verdastra dell'olio è attribuita ai pigmenti clorofillici costituiti da clorofilla a, clorofilla b, feofitina a e feofitina b; queste ultime sono prodotti di degradazione delle clorofille per sostituzione dello ione Mg^{2+} con H^+ . La quantità totale di clorofille nell'olio vergine dipende dalla varietà, dal grado di maturazione, dalla durata di conservazione dei frutti, dal metodo di estrazione e dalle condizioni di stoccaggio dell'olio. L'olio di oliva vergine ottenuto all'inizio della campagna oleicola presenta una quantità di clorofille maggiore rispetto a quello di fine campagna, che si ottiene da frutti più maturi (Cabras et al., 2004).

2.11 Influenza dell'ambiente di coltivazione sulle drupe e sulla composizione dell'olio di cultivar di *Olea europaea* L.

La conoscenza dell'intimo legame esistente tra la pianta ed il territorio consente di poter migliorare non solo la gestione agronomica, ma fornire utili indicazioni sulle scelte colturali da adottare al fine di rendere ottimali i rapporti tra ambiente e cultivar, permettendo la massima espressione delle potenzialità produttive, non solo da un punto di vista quantitativo, ma anche qualitativo. La qualità del prodotto primario ricavato dall'olivo, l'olio, viene influenzato da fattori genetici, agronomici ed ambientali (Cimato et al., 1990; Kiritsakis, 1991). L'ambiente, inteso come interazione tra fattori biotici e abiotici, ha un ruolo determinante nello sviluppo e nella caratterizzazione della coltura. Oltre alla pressione selettiva operata nel corso del tempo sul germoplasma, la sua interazione con il genotipo tipicizza questa coltura producendo ecotipi che si differenziano sia fisiologicamente sia per le caratteristiche sensoriali delle produzioni (Morrone et al., 2012). Per l'olivo, a differenza di quanto accade per altre colture, quali la vite, sono ancora piuttosto limitate le conoscenze sui legami esistenti tra i parametri climatici-pedologici e il risultato produttivo; sicuramente le

variabili ambientali condizionano l'efficienza produttiva ed incidono sulla qualità dell'olio. La cultivar, tuttavia, mantiene il ruolo di "fattore agronomico" maggiormente responsabile delle "impronte" chimiche e organolettiche dell'olio che ne determinano la tipicità, lo rendono diverso dagli altri grassi vegetali e particolarmente pregiato per le proprietà nutrizionali (Di Vaio et al., 2012). Le cultivar, tuttavia, possono manifestare una diversa risposta ai fattori ambientali e colturali, in ragione della loro diversa resistenza a condizioni di stress o alla differente risposta al regime termico prevalente durante lo sviluppo e la maturazione del frutto (Inglese et al., 2011). Lo stato termico può rendere marcato l'effetto dell'ambiente o dell'annata sulla composizione dell'olio, evidenziando una maggiore o minore stabilità fenotipica al variare del sito o dell'andamento climatico (Lombardo et al., 2008; Fiorino et al., 2004; D'Imperio et al., 2007). L'entità delle precipitazioni influenza il contenuto in sostanze fenoliche degli oli: le maggiori disponibilità idriche tendono a ridurre il contenuto. L'altitudine alla quale sono coltivate le piante di olivo, può influire sulle caratteristiche qualitative dell'olio di oliva e, soprattutto, sulla sua composizione in acidi grassi. L'olio ottenuto da piante coltivate ad altitudini elevate presenta una maggiore stabilità all'ossidazione rispetto a quello ottenuti a quote più basse (Osman et al., 1994; Mousa et al., 1996; Montedoro et al., 2003). Anche la temperatura svolge la sua influenza sia a livello di sviluppo della drupa, che sulla composizione dell'olio: ambienti caratterizzati da alte temperature fanno registrare un netto anticipo dell'invasatura delle drupe, con conseguente rapida degradazione della clorofilla (Mousa et al., 1996); viceversa, il suo decrescere determina un aumento della percentuale di acidi grassi insaturi (Kiritsakis et al., 1987). Vi è, infine, anche un'influenza sulla componente aromatica degli oli, in quanto la temperatura, agendo sulle attività enzimatiche della via delle lipossigenasi, può determinare una diminuzione delle sostanze volatili da esse prodotte (Di Vaio et al., 2012; Lehninger, 1983; Ridolfi et al., 2002). Tura et al. (2009) riportano, inoltre, che la qualità aromatica dell'olio di oliva dipende innanzitutto dall'anno e poi dalla cultivar. La valutazione dell'influenza della cultivar e della stagionalità e della loro interazione sulla composizione chimica ed organolettica degli oli è stata analizzata anche statisticamente e ha evidenziato che nella composizione in acidi grassi l'effetto della cultivar e dell'annata di produzione è altamente significativo (Rotondi et al., 2010).

2.11.1 Aspetti agronomici

Il genotipo (cultivar) svolge un ruolo molto importante sulle caratteristiche compositive dell'olio. Le maggiori variazioni sono osservabili per il contenuto in polifenoli, sostanze volatili e steroli. Una particolare influenza è stata rilevata sulla composizione acidica, con sensibili modificazioni del contenuto dei principali acidi grassi e del rapporto insaturi/saturi. Le variazioni più importanti sono dovute al genotipo anche se i fattori ambientali possono agire in modo rilevante su questo parametro analitico (Gucci et al., 2004). Dal punto di vista dei composti fenolici, le diversità legate alla cultivar sono di ordine quantitativo. Va, inoltre, osservato che le nuove metodologie analitiche di valutazione della frazione fenolica dimostrano l'esistenza di un interessante effetto qualitativo delle cultivar su di essa, elemento questo che potrebbe essere utilizzato nella caratterizzazione degli oli monovarietali (Gucci et al., 2004). Per quanto riguarda le sostanze volatili, la via della lipossigenasi rappresenta la principale linea biogenetica di produzione degli aromi negli oli vergini di oliva.

Esiste, comunque, una notevole variabilità compositiva relativa alle cultivar legata principalmente alla diversa attività totale dei singoli enzimi facenti parte del suddetto percorso biochimico, quali l'idroperossido-liasi, l'alcol-deidrogenasi e l'alcol-acetil-transferasi. Queste attività si traducono in un altrettanto diverso rapporto di concentrazioni tra aldeidi, alcoli ed esteri con impatto sensoriale, ai quali sono legate le note aromatiche degli oli vergini d'oliva (Gucci et al., 2004).

Il sesto di impianto determina il volume di suolo a disposizione delle radici di ogni singolo albero nell'oliveto e il volume di espansione della chioma, che a sua volta influisce sull'intercettazione della radiazione luminosa e quindi sulla biomassa potenziale prodotta dall'albero. Se gli olivi sono piantati a distanza ridotta l'uno dall'altro bisogna assicurare una sufficiente disponibilità di acqua ed elementi nutritivi nel ridotto volume di suolo a disposizione. Oliveti troppo fitti possono andare incontro a problemi di ombreggiamento reciproco dei filari con diminuzioni di produttività nelle parti inferiori della chioma più soggette ad ombreggiamento e necessita di frequenti interventi di potatura per ridurre il volume e soprattutto l'altezza degli alberi (Gucci et al., 2004).

Un'elevata umidità nel suolo durante il periodo di crescita aumenta l'attività vegetativa dell'albero, la produzione, la pezzatura e il rapporto polpa-nocciolo delle olive. L'incremento produttivo di olivi irrigati rispetto ad olivi coltivati in asciutto è tanto maggiore quanto più arido è il clima e minore la capacità di immagazzinamento dell'acqua nel terreno.

Nei climi dell'Italia meridionale e insulare l'irrigazione può consentire di raddoppiare la produzione di olio, mentre in quelli più umidi dell'Italia centrale e settentrionale l'incremento produttivo è più contenuto o addirittura assente. Anche l'andamento climatico stagionale influisce sul risultato produttivo dell'irrigazione (Gucci et al., 2004). Per determinare la quantità di acqua potenzialmente disponibile per gli olivi nel suolo, è necessario conoscere la tessitura e il contenuto in sostanza organica del terreno, la profondità dello strato esplorabile dagli apparati radicali e la frazione idrica facilmente utilizzabile per l'assorbimento radicale. Suoli poco profondi o sabbiosi o con scarso tenore in argilla e sostanza organica o ricchi di scheletro hanno scarsa capacità di immagazzinamento dell'acqua e l'irrigazione diventa indispensabile. Vantaggi indiscutibili dell'irrigazione si hanno a partire dall'impianto e per tutta la fase di allevamento in quanto la disponibilità idrica stimola l'allungamento del ramo, l'accrescimento diametrico del fusto e delle branche in formazione e lo sviluppo dell'apparato radicale (Gucci et al., 2004). La maggiore attività vegetativa consente di ottenere un rapido sviluppo dell'albero, la formazione di uno scheletro robusto e una precoce entrata in produzione. Nonostante i vantaggi suddetti, un'elevata disponibilità idrica nel terreno non necessariamente determina effetti positivi sulla quantità. Diversi studi in vari ambienti hanno mostrato che, l'eventuale aumento della produzione di olio, indotto dall'irrigazione, dipende dal livello di deficit idrico e dagli stadi fenologici in cui viene assicurata una buona disponibilità di umidità nel suolo (Gucci et al., 2004). La diversa sensibilità dei processi di crescita di organi e tessuti dell'olivo e dell'oliva è alla base della gestione dell'irrigazione in deficit controllato, ovvero la somministrazione controllata di acqua, con volumi inferiori ai fabbisogni, durante stadi fenologici particolari, per ottenere risparmi idrici senza effetti negativi sulla produzione. Un aspetto di notevole rilievo per la produzione olivicola italiana riguarda l'effetto che la disponibilità di acqua nel terreno ha sulla qualità dell'olio. In generale, l'olio italiano si caratterizza per l'alta qualità del prodotto e per le numerose denominazioni di origine a tutela della tipicità, ma gli elevati costi di produzione lo rendono poco competitivo con l'olio prodotto all'estero, inclusi i paesi dell'Unione Europea. Prove di irrigazione, condotte su diverse cultivar, hanno evidenziato che il regime idrico influisce marginalmente sulla composizione acidica mentre non ha alcun effetto sull'acidità libera e sul numero di perossidi dell'olio (Gucci et al., 2004).

La scarsa umidità nel suolo, invece, determina un aumento del contenuto di composti fenolici, e della stabilità dell'olio rispetto all'ossidazione. La quantità di olio estraibile,

espressa come efficienza produttiva della chioma, mostra un andamento diverso in funzione del modello di maturazione dei frutti. Le cultivar a maturazione tardiva, infatti, raggiungono i massimi livelli in corrispondenza della completa pigmentazione superficiale, diversamente da quelle a maturazione precoce, nelle quali la maggior quantità di olio recuperabile, si ottiene ad uno stadio di maturazione più avanzato (Gucci et al., 2004). Per quanto riguarda gli aspetti qualitativi va osservato che la composizione acidica varia nel corso della maturazione, con una diminuzione dell'acido palmitico ed un aumento dell'acido oleico per cui il rapporto insaturi/saturi aumenta. Lo stadio di maturazione del frutto influisce anche sulle componenti di interesse sensoriale e salutistico come le sostanze volatili, i composti fenolici e i pigmenti. In sintesi, la concentrazione di molti costituenti caratterizzanti la qualità organolettica del prodotto aumenta tendenzialmente con l'intensificarsi della pigmentazione fino a raggiungere un livello oltre il quale si rileva un'inversione di tendenza (Gucci et al., 2004). La fase successiva alla pigmentazione superficiale, ad esempio, costituisce un momento di profonda trasformazione fisiologica ed anatomica del frutto, che si traduce in una diminuzione complessiva delle clorofille, dei costituenti volatili e di quelli fenolici ed un conseguente appiattimento organolettico del futuro olio. Si può quindi concludere che la maturazione della drupa, comporta una modificazione complessiva di tutti quei parametri analitici che definiscono la qualità degli oli vergini di oliva (Gucci et al., 2004).

Il carico di frutti, ovvero la quantità di frutti prodotti per albero, è una variabile spesso trascurata per quanto riguarda gli effetti sulle caratteristiche analitiche ed organolettiche degli oli. Il carico di frutti incide sulla qualità degli stessi e sull'accumulo di olio nella drupa, mentre elevate produzioni per albero determinano una diminuzione nelle dimensioni, peso fresco e rapporto polpa-nocciolo delle olive. Meno evidente l'effetto sul peso secco della drupa. Inoltre, produzioni abbondanti producono un minor accumulo di olio nella drupa (Gucci et al., 2004).

La tecnica di potatura non sembra influire sulle caratteristiche analitiche e sensoriali dell'olio, purché sia eseguita in modo da consentire una buona illuminazione della superficie fruttificante e un agevole accesso alla chioma per la difesa fitosanitaria. La tecnica e l'intensità di potatura non hanno effetto sulla qualità del prodotto. Variazioni nelle caratteristiche organolettiche degli oli possono essere causate dal diverso stadio di maturazione in cui vengono raccolte le olive per scuotitura meccanica o a mano, in quanto la raccolta meccanica di solito viene iniziata più tardi rispetto a quella manuale per avere frutti

con minore forza di ritenzione sul ramo (Gucci et al., 2004). D'altro canto, la raccolta meccanica procede più velocemente e consente di raccogliere più tempestivamente della raccolta manuale olive a maturazione contemporanea. Scadimenti qualitativi si ottengono se le olive sono raccolte da terra in seguito a cascola naturale o attacchi parassitari, in quanto i processi ossidativi peggiorano nettamente le caratteristiche sensoriali e salutistiche dell'olio. La raccolta meccanizzata con pettini pneumatici o elettrici può risultare in danni qualitativi, non tanto per le lesioni provocate sulle olive direttamente dai pettini, quanto per lo schiacciamento dei frutti sul telo dovuto al calpestio (Gucci et al., 2004).

2.12 Il concetto di cultivar

Col termine cultivar (abbreviato in cv. secondo il Codice Internazionale per la Nomenclatura delle Piante Coltivate), si intende una varietà di pianta coltivata, ottenuta con il miglioramento genetico, che riassume un insieme di specifici caratteri morfologici, fisiologici, agronomici e merceologici di particolare interesse e trasmissibili con la propagazione, sia per seme sia per parti di pianta. Da un punto di vista pratico, la cultivar sarebbe analoga alla razza di una specie animale realizzata con la domesticazione e la selezione. La cultivar si identifica perciò in un particolare genotipo. Il termine cultivar deriva dalla contrazione della locuzione inglese *cultivated variety* ("varietà coltivata"), a sua volta calco del latino *varietas culta*, ed è stato ufficialmente adottato dal XIII Congresso di Orticoltura tenutosi a Londra nel 1952. Le convenzioni di nomenclatura sono regolamentate dal Codice Internazionale per la Nomenclatura delle Piante Coltivate (CINPC) e l'applicazione della normativa e delle convenzioni è affidata a specifici organismi internazionali o nazionali. In agronomia si usa spesso, impropriamente, il termine di varietà come sinonimo di cultivar. L'uso è tuttavia improprio in quanto varietà va riservato esclusivamente all'accezione botanica del termine e fa quindi riferimento ad un particolare tipo genetico che, nell'ambito di una specie, si è selezionato e propagato spontaneamente costituendo una popolazione (specie selvatica). In genere l'insieme delle cultivar di una specie agraria si identifica con una varietà botanica, per quanto questa correlazione non sia formalmente e rigorosamente definita. Dalle cultivar in senso stretto vanno distinti anche gli ecotipi. L'ecotipo è una popolazione di piante geneticamente omogenea, ottenuta con la selezione massale in un contesto territoriale circoscritto come un comprensorio, una regione). L'identità degli ecotipi è perciò associata al territorio ed è l'espressione dell'interazione fra il germoplasma di una specie con le specifiche

condizioni ambientali di una regione con l'influenza dell'uomo. Pur non presentando un'identità genetica e sistematica definita, gli ecotipi sono spesso di notevole importanza agronomica ed economica, in quanto impiegati sia per la conservazione del germoplasma e la tutela della biodiversità genetica, sia per la valorizzazione di prodotti tipici regionali.

Il paesaggio Mediterraneo è contraddistinto dalla presenza di un enorme patrimonio genetico che riunisce varietà (cultivar) di olivo dalle molteplici caratteristiche e significative diversità biologiche, radicate in ambienti e territori diversi. L'origine della varietà risale ad un gruppo di piante "affermate e riconosciute" che forniscono l'attuale produzione olivicola. In questi anni, cambiamenti climatici, legati a fenomeni di inquinamenti industriali, catastrofi naturali e scelte della società, hanno creato una notevole riduzione delle diversità naturale e della sua espressione genetica; è evidente che neanche l'olivo è stato sottratto a tale evento. Si è, in pratica, ridotto il *range* di opzioni per operatori, produttori del settore o chiunque si trovi nella posizione di scegliere una varietà che debba rispondere e ben precise esigenze economiche. La scomparsa della biodiversità ha acquisito nel tempo importanza internazionale. In considerazione del valore ecologico, genetico, scientifico, educativo, culturale ed economico per le risorse genetiche per il futuro delle attività produttive del genere umano, la FAO, come Azienda dell'ONU per l'agricoltura e l'alimentazione, ha elaborato il "Piano di azione Globale" in cui sono coinvolte le istituzioni di ricerca che hanno attivato interventi comuni per prevenire e attaccare alla fonte le cause della significativa riduzione o perdita della diversità e per realizzare iniziative per la salvaguardia delle risorse genetiche. Le conoscenze relative al patrimonio genetico in olivicoltura mostrano che una stessa cultivar può avere dimensioni diverse secondo la provincia e il territorio di appartenenza. Il principale criterio di classificazione delle cultivar di olivo è la trasformazione a cui sono destinate le olive (Sacchi et al., 2001):

- Cultivar da olio: sono destinate prevalentemente all'estrazione dell'olio di oliva per vari motivi, spesso concomitanti quali pezzatura piccola, difficoltà di raccolta, ampia diffusione, buona resa in olio, condizioni socio-economiche sfavorevoli alla brucatura, sensibilità ad alcune avversità che deturpano l'oliva.
- Cultivar da mensa: sono destinate quasi esclusivamente alla trasformazione in oliva da mensa, anche in questo caso per motivi diversi come una grande pezzatura, facilità di raccolta con la brucatura, limitata vocazione elaiotecnica del comprensorio, resistenza della drupa alle manipolazioni, bassa resa in olio.

- Cultivar a duplice attitudine: sono generalmente destinate all'estrazione dell'olio di oliva, ma per la pezzatura media e per altri motivi contingenti, si prestano anche ad essere trasformate in olive da mensa, perciò una parte della produzione, in genere quella qualitativamente migliore (pezzatura e estetica) è destinata all'oliva da mensa.

2.13 Caratteristiche pedo e fitochimiche di alcune cultivar italiane

Le cultivar autoctone di olivo rappresentano la strategia di punta per la valorizzazione commerciale degli oli extravergini italiani. L'Italia, 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, numerosi sono gli studi sul patrimonio genetico di olivo che hanno portato alla pubblicazione di lavori sul germoplasma (Di Vaio et al., 2013).

Le varietà dell'olivo che oggi vengono coltivate sono numerose. La composizione dell'olio è influenzata fortemente dalla varietà, dallo stato di maturazione e dall'integrità del frutto. Il controllo della varietà e della qualità delle olive è il primo punto critico nella produzione dell'olio extra vergine di oliva (Sacchi et al., 2001).

Il fattore varietale, condizionando la maturazione dei frutti e conseguentemente la loro composizione, partecipa in maniera determinante all'acquisizione di specifici requisiti qualitativi degli oli, caratterizzando e qualificando le produzioni (Montedoro et al., 1992).

Solo un'approfondita conoscenza degli aspetti bio-agronomici delle cultivar costituenti il vasto patrimonio varietale autoctono, può esaltare le peculiarità di ciascun genotipo, tanto da delineare un vero e proprio percorso di qualità che investe l'intera filiera produttiva a partire dalla coltivazione fino alla trasformazione (Pugliano, 2002).

Lo studio di varietà autoctone delle aree olivicole più rappresentative dell'Italia, oltre a valorizzare l'olivicoltura regionale di pregio, ha l'obiettivo di conoscere e recuperare la biodiversità del patrimonio olivicolo.

Questa enorme ricchezza in termini di biodiversità scaturisce dalla combinazione di una serie di circostanze storiche e ambientali senza eguali che, favorendo nel corso di lunghi secoli di olivicoltura l'acclimatazione e l'insediamento delle diverse varietà, hanno fatto dell'Italia un territorio unico sul piano della vocazione alla coltura dell'olivo. Quale terra può vantare, infatti, oltre che una tradizione olivicola plurimillennaria, una tale diversità negli ambienti di coltivazione? Il succedersi di generazioni di olivicoltori ha saputo scovare,

scegliere, migliorare e conservare di volta in volta il tipo genetico più adatto, più resistente o più apprezzato per la qualità dell'olio. Si direbbe quasi che i luoghi e le varietà si siano "scelti" a vicenda, dando così origine ad un legame tra pianta ed ambiente, profondo a tal punto che l'uno sembra ormai non poter esistere senza l'altro. Le diverse tipologie e i vari ambienti olivicoli trovano le loro migliori espressioni negli oli extravergini di oliva a Denominazione di Origine Protetta (DOP) della Campania e dell'Umbria. Inoltre, l'olio ottenuto da queste cultivar, di eccellente qualità, si caratterizza per profumi e sapori accattivanti ed assolutamente tipici. Il successo delle produzioni campane è testimoniato dalle numerose Denominazioni di Origine Protetta che oggi la regione può vantare e dal crescente interesse del consumatore per la qualità, l'originalità e la genuinità di un olio del quale, tra l'altro, è possibile seguire la tracciabilità, in ogni fase della produzione. Inoltre, il 90% dell'olivicoltura campana interessa territori collinari, quelli spesso a più alto rischio di smottamenti e frane; l'olivo diviene così, oltre che importante e talvolta unica fonte di reddito per le popolazioni locali, anche presidio del territorio, che esso stesso impreziosisce da secoli con la sua immutabile presenza.

Nella regione Umbra, unico caso in Italia, l'olio extravergine a denominazione di origine protetta DOP copre il 90% della produzione regionale. Infatti, gli ulivi coltivati in Umbria godono di particolari condizioni climatiche che consentono una maturazione del frutto molto lenta, tale da determinare un tasso di acidità estremamente contenuto.

In Italia l'olivo ha, quindi, trovato il suo ambiente ideale: la natura spesso vulcanica dei terreni ed il clima tipicamente mediterraneo hanno favorito il diffondersi di questa coltura, che oltre agli aspetti economici, riveste particolare importanza anche per la salvaguardia del territorio e la tutela del paesaggio.

La prima cultivar presa in esame per questo progetto di ricerca è stata come detto poc'anzi la *Pisciottana* (olio DOP Cilento Reg. CE n. 1065 del 12.06.97), il cui areale di produzione DOP Cilento comprende 62 comuni noti internazionalmente per caratteristiche ambientali e storiche, e rientra interamente nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, un territorio incontaminato dichiarato patrimonio mondiale dall'Unesco. La DOP Cilento interessa circa 18 mila ettari, pari al 30% circa del totale regionale e al 50% della provincia di Salerno (D'Aponte et al., 2012). Grazie alle peculiari condizioni pedo-climatiche l'olivo trova in questa zona un habitat ideale. L'area è molto diversificata per orografia e natura dei terreni. I terreni olivetati si presentano di natura argillosa-calcareo, ricchi in potassio, fosforo,

ferro e calcio. Gli impianti sono di tipo tradizionale, con piante di grossa taglia spesso secolari, allevate a vaso, impalcate alte e con sestri d'impianto ampi e irregolari. Solo in oliveti di recente costituzione si trovano forme di allevamento a vaso polifonico, monocono o globo. Rigoroso è il disciplinare di produzione, che impone che le olive vengano raccolte a mano e molite entro il secondo giorno dalla raccolta. L'olio si ottiene dalla spremiture di olive della cultivar *Pisciottana* per almeno l'85%; possono inoltre concorrere altre cultivar locali presenti nell'area di produzione in misura non superiore al 15%. L'olio si presenta di colore verde fino al giallo paglierino più o meno intenso, con un fruttato medio/leggero e note medie di amaro e di piccante.

Una delle peculiarità dell'olivicoltura irpina è rappresentata dalla presenza di una varietà autoctona di grande pregio, la *Ravece* (olio DOP Irpinia - Colline dell'Ufita G.U. n. 51 del 3.3.2005), nota anche come *Curatone* e *Olivona*. Si tratta di una varietà rustica, molto apprezzata per la sua costante produttività e per l'elevata qualità dell'olio che produce, sebbene la resa sia piuttosto bassa e non superi il 16%. Gli oli irpini sono il risultato della perfetta armonia tra ambiente, cultivar, capacità imprenditoriale e tradizione, che qui è antichissima. L'area di produzione dell'olio extravergine di oliva Irpinia - Colline dell'Ufita DOP comprende 38 comuni nella parte centro-settentrionale della provincia di Avellino con una superficie olivetata che si aggira intorno ai 3500 ettari interessando oltre 9000 aziende produttrici. L'olio Irpinia - Colline dell'Ufita deriva per non meno del 60% dalla varietà *Ravece*, mentre per la restante parte dalle varietà *Ogliarola*, molto diffusa nella provincia di Avellino, *Marinese*, *Olivella di Carife* e *Ruveia*. Secondo il disciplinare, la produzione non deve superare i 60 kg per pianta e la resa in olio non deve eccedere il 20%. La raccolta effettuata a mano, avviene entro la metà del mese di dicembre e la molitura deve avvenire entro il secondo giorno. Quest'olio, dalle pregevoli caratteristiche organolettiche, scaturisce dalla straordinaria e unica combinazione tra le favorevoli condizioni di suolo e clima, che permettono agli agricoltori locali di produrre olive di notevole fattura e le tecniche tradizionali di molitura. La *Ravece* si riconosce per il colore verde, se giovane, oppure giallo paglierino; il profumo è fruttato con note erbacee a soprattutto spiccano i sentori di pomodoro, percepibili distintamente anche all'assaggio. Il sapore è armonico, con intense ma gradevoli punte di amaro e piccante.

L'*Ortice* (olio DOP Colline Beneventane G.U. n. 169 del 21.07.04), varietà autoctona di grande pregio delle Colline Beneventane, ha un'areale di produzione che racchiude 44

comuni distribuiti su un territorio complesso dal punto di vista geomorfologico, caratterizzato da terreni collinari in cui la coltivazione prevalente è appunto l'olivo. La produzione, secondo quanto stabilito dal disciplinare, non può superare i 100 quintali ad ettaro e la resa al frantoio non deve essere maggiore del 23%. Gli elementi di tipicità dell'olivicoltura beneventana consistono, oltre che nella natura del territorio, anche nella presenza di varietà locali esclusive di quest'area: la varietà *Ortice*, ad esempio, sebbene sia presente in altre zone del Sannio, trova nelle Colline Beneventane il suo areale di elezione. Il disciplinare di produzione proposto è molto rigoroso nei procedimenti di estrazione, che possono essere solo meccanici e fisici: è vietata ogni aggiunta di prodotti ad azione chimica e biochimica; la temperatura di gramolazione della pasta di olive non deve superare i 27°C e i 40 minuti di lavorazione, al fine di non alterare le caratteristiche organolettiche del frutto. Ottima anche come oliva da mensa, in salamoia o disidratata al sole, la varietà *Ortice* si fa apprezzare in particolare per le spiccate note di pomodoro che si avvertono nell'olio Colline Beneventane. L'originalità olfattiva di quest'olio è proprio legata alla preponderante presenza (70%) della varietà *Ortice*, che si riconosce per il colore giallo, caratterizzato da intense sfumature verdi. Il profumo ricorda oltre al pomodoro, anche gli aromi erbacei; il sapore è armonico, con gradevoli e talvolta intense note di amaro e piccante, in armonia con l'elevata percentuale in polifenoli.

L'ambiente pedoclimatico dell'Umbria, pur non essendo ottimale ai fini quantitativi della produzione dell'olivo, favorisce l'ottenimento di oli di particolare pregio. Le escursioni termiche, che si registrano in settembre e ottobre, stimolano le piante alla difesa dallo stress subito, portandole ad accumulare sostanze fenoliche in grado di proteggere dal degrado l'olio nelle cellule della polpa. Il patrimonio varietale infatti interagisce soprattutto con il clima, con un risultato di massima qualità organolettica, favorendo l'adattamento dell'olivo anche in zone non particolarmente vocate, dove la cultivar trova condizioni pedologiche e climatiche ottimali ai fini per lo più qualitativi. La realtà olivicola umbra è caratterizzata da 17 tipi di cultivar, le più presenti sono: *Frantoio*, *Moraiolo*, *Leccino*, *San Felice*, *Pendolino* e *Agogia*. Con una superficie olivata di 27mila ettari, 7 milioni e mezzo di piante d'olivo, 27mila produttori olivicoli e 250 frantoi, l'Umbria riesce a collocarsi tra le aree a più solida vocazione olearia d'Italia. La DOP Umbria è l'unica regione ad avere avuto l'ottenimento del marchio DOP per l'intera produzione di olio nell'intero territorio regionale, "DOP Umbria" (DM 6 agosto 1998-GURI n. 193 del 20 agosto 1998), suddivisa solo in cinque sottozone di produzione: Colli Martani, Colli Assisi Spoleto, Colli Amerini, Colli Orvietani, Colli del

Trasimeno) ed è stata la prima in Italia ad essere riconosciuta, nel 1997, con la prima certificazione di processo e di prodotto avvenuta nel 1998. La sottozona presa in esame per il presente progetto di dottorato è quella dei Colli Assisi Spoleto, con le cultivar *Frantoio* e *Moraiolo*. La zona di produzione, ricade nei comuni di: Nocera Umbra, Gubbio, Scheggia e Pascelupo, Costacciaro, Sigillo, Fossato di Vico, Gualdo Tadino, Valfabbrica, Assisi, Spello, Valtopina, Foligno, Trevi, Sellano, Campello sul Clitunno, Spoleto, Scheggino, S. Anatolia di Narco, Vallo di Nera, Cerreto di Spoleto, Preci, Norcia, Cascia, Poggiodomo, Monteleone di Spoleto, Montefranco, Arrone, Polino, Ferentillo, Terni, Stroncone. La varietà *Frantoio* pur rientrando tra gli olivi di media grandezza, ha le dimensioni maggiori rispetto alle altre cultivar umbre. Si caratterizza per avere i rami principali molto tortuosi ed inclinati e i rami minori tipicamente penduli. Le sue olive sono piuttosto grosse e ricche di polpa, con forma ovoidale allungata e grande contenuto di olio di ottima qualità. La sua produttività è costante ed ha una media capacità di resistenza al freddo.

La cultivar che rappresenta tutta l'Umbria è di certo il *Moraiolo*, una pianta che ben si addice al carattere degli umbri; piccola di dimensioni, ma forte e resistente; schiva ma che da un olio da una forte personalità organolettica. Si caratterizza per avere i rami principali e i rami fruttiferi diretti, che si innalzano in modo caratteristico. Ha un frutto piccolo e una maturazione tardiva e scalare, con una forte resistenza al distacco. L'oliva è di medie dimensioni, con forma tondeggianti ed è polposa e molto ricca di olio considerato di ottima qualità. La sua produttività è notevole e anche costante: caratteristica, unitamente alla qualità, che lo fa prediligere dagli olivicoltori umbri. Resiste bene al freddo e ama posizioni un po' elevate, altro aspetto che ne ha determinato la diffusione in Umbria. La cultivar *Moraiolo* è sicuramente la più conosciuta e apprezzata. Di sviluppo contenuto, è stata da sempre quella che si è adattata meglio nei terreni rocciosi e dal ridotto profilo. È proprio questa sua rusticità il movente che ha portato la varietà ad essere usata in luoghi dove non esiste alternativa culturale e varietale. La denominazione di origine controllata "Umbria" accompagnata dalla menzione geografica "Colli Assisi-Spoleto" è riservata all'olio extravergine di oliva ottenuto dalle seguenti varietà di olivo: *Moraiolo* in misura non inferiore al 60%; *Leccino* e *Frantoio*, presenti da sole o congiuntamente, in misura non superiore al 30%. Possono, altresì, concorrere altre varietà fino al limite massimo del 10%.

Capitolo 3. Obiettivo della ricerca

Il suolo rappresenta il substrato naturale per la crescita e la produttività degli organismi vegetali che da esso traggono i nutrienti indispensabili al loro sviluppo. Non bisogna dimenticare, però, che il suolo è una risorsa limitata e non rinnovabile; pertanto, è di fondamentale importanza preservare tale risorsa valutandone la qualità, lo stato di salute e proponendo sistemi di protezione e riqualificazione.

Il terreno naturale è un sistema ecologico aperto, che riceve e perde energia. Le modificazioni energetiche a cui va incontro sono determinate dalla nutrizione e dalla respirazione delle popolazioni microbiche, dal trasferimento e circolazione degli elementi, dalla sintesi e degradazione della sostanza organica (Sequi et al., 2003).

Si può affermare che la salute ed il funzionamento di un suolo naturale, cioè non coltivato, sono regolati da quattro parametri: bioenergetica, trasformazioni cicliche, unificazione e pedogenesi, strettamente connessi l'uno con l'altro in modo da mantenere in equilibrio ecologico il terreno con l'ambiente (Sequi et al., 2003).

Allo stato attuale, lo sfruttamento agricolo modifica questi rapporti, le pratiche agronomiche ad esempio accelerano le trasformazioni cicliche. Questa maggiore dinamicità fa sì che il terreno agrario abbia rispetto al terreno naturale un minor grado di stabilità; ciò a lungo andare comporta una riduzione della biodiversità agricola, che inesorabilmente si ripercuoterà su quella alimentare.

Una delle funzioni più importanti dei microrganismi edafici è appunto quella di presiedere alle trasformazioni a carico degli elementi nutritivi in modo da mantenere un equilibrio di scambio tra suolo e pianta, contribuendo così allo stato di fertilità dei terreni e al suo mantenimento (Sequi et al., 2003).

I processi del metabolismo del suolo, intesi come trasformazioni di materiali ed energetiche, sono fondamentalmente connessi al turnover microbico sotto l'azione di fattori limitanti sia abiologici che di coazione biologica (Sequi et al., 2003). La moderna agricoltura dovrebbe infatti prefiggersi lo scopo di raggiungere la massima produttività consentita dalle condizioni edafiche, mantenendo elevato non solo il livello della fertilità chimica, ma anche quello della fertilità biologica.

La fertilità biologica di un terreno può essere dunque definita come una espressione della vita microbica dei suoli e dipende soprattutto dalla sostanza organica e dall'ambiente. L'ambiente inteso come clima non solo condiziona lo sviluppo dei microrganismi ma anche la

loro attività e quindi l'evoluzione della sostanza organica, che è la fonte di energia necessaria per lo svolgimento della vita microbica. La sostanza organica è dunque un parametro molto importante per la fertilità biologica perché interviene non solo sulla formazione dell'humus, ma anche sulla formazione di sostanze specifiche microbiche e sul loro metabolismo.

La fertilità biologica unitamente alla fertilità chimica ed a quella fisica costituisce la fertilità agronomica o integrale dalla quale dipende la produttività. La fertilità tuttavia non è sinonimo di produttività in quanto la prima dipende dal terreno mentre la seconda sia dal terreno che dalla pianta. Inoltre le basi biologiche della produttività riferite ad un terreno naturale non coincidono con quelle della produttività agronomica in quanto quest'ultima rappresenta un livello produttivo superiore a quello naturale (Mocali, 2010; Sequi et al., 2003).

La produttività di un suolo è strettamente correlata, invece, al concetto di "qualità" (Rodale Institute, 1991). In questi ultimi anni sono state date molte definizioni di qualità del suolo, ma quella che sembra riassumere meglio il concetto è stata proposta da Doran & Parkin, (1994): "La capacità del suolo di interagire con l'ecosistema per mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale e promuovere la salute animale e vegetale". In particolare, Mc Grath (1998) ha espresso che la qualità del suolo coincide con la sua funzione da cui la biosfera dipende per la sua continua sopravvivenza, poiché il suolo è considerato il supporto per la crescita delle piante. Ovviamente tra le piante quelle essenziali per la nutrizione umana, rivestono grande importanza, e un esempio è dato da *Olea europaea* L. dalla quale si ottiene l'olio extravergine di oliva, a cui sono attribuiti i principali effetti salutistici della Dieta Mediterranea. A tal proposito presso l'OCSE è in corso una attività per la definizione degli indicatori agro-ambientali tra i quali quelli inerenti la qualità del suolo che costituisce appunto, la base per la produzione alimentare. Quindi risulta strettamente correlato al concetto di "qualità di un suolo" quello che riguarda la "qualità di un alimento". Secondo Peri (1995); Magli & Rotondi, (1998), con il termine "qualità" si intende "l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite del consumatore". Per gli oli di oliva i parametri di qualità per l'attribuzione della categoria merceologica sono ovviamente regolamentati (Reg. CE 2568/91 e successive modifiche Reg. CE 796/02; Reg. CE 1989/03).

Il progetto di ricerca di questi anni di Dottorato si è, proposto di mettere in relazione: le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo, sotto diverse cultivar di *Olea*

europaea L. per stimare fertilità e qualità degli stessi; le caratteristiche funzionali fogliari, le caratteristiche chimico-fisiche dei frutti e quelle qualitative dei rispettivi oli estratti sperimentalmente. È infatti noto dalla letteratura che a ciascuna cultivar sono generalmente associati tratti fogliari funzionali, e di fruttificazione, che riflettono bene la capacità di adattamento della pianta nel suo luogo di crescita e la sua capacità di risposta agli stimoli ambientali (Loussert, 1978). Le foglie possono essere considerate i “primi recettori” delle risorse abiotiche, per cui, piante con una buona struttura fogliare sono sintomo di qualità dell’olivo, ed espressione di una efficiente capacità della pianta di acquisire e di utilizzare le risorse ambientali (luce, acqua e nutrienti) (Poorter et al., 2006). Le variazioni delle caratteristiche del frutto inoltre, possono dare utili informazioni sulla qualità degli oli prodotti dalle diverse cultivar così come la possibilità di effettuare prelievi in siti diversi per la stessa cultivar consente, di evidenziare effetti non più legati alla varietà della pianta, ma al tipo di suolo, alle condizioni climatiche e le risposte a specifici fattori di disturbo della pianta e dei suoi prodotti (Di Vaio et al., 2013).

Cercare di comprendere la relazione esistente tra la qualità dei suoli, dell’intera pianta con la qualità degli oli prodotti da diverse varietà genetiche e soprattutto cercare di verificare se questa relazione tra le quattro matrici di studio (suoli, foglie, frutti e oli) fosse legata a problematiche ambientali (luce, temperatura, precipitazioni, localizzazioni geografica) o varietali (cultivar) è stato quindi l’obiettivo di tale ricerca.

Le cultivar di *Olea europaea* L., prese in esame in questo lavoro di tesi di dottorato ricadono in specifiche aree produttive dell’Italia centro-meridionale; in particolare, sono autoctone della Regione Campania (*Pisciottana*, *Ravece*, *Ortice*) e della Regione Umbria (*Frantoio* e *Moraiolo*). In questo modo è stato possibile effettuare un confronto inter-regionale. Inoltre, in tutti i casi sono stati scelti siti qualificanti alcuni ambienti e situazioni gestionali specifiche. Le aree di campionamento scelte sono le seguenti: Pisciotta (Sa) per la cultivar *Pisciottana*; Avellino per la varietà *Ravece*; Benevento la cultivar *Ortice* ed infine, *Frantoio* e *Moraiolo* provenienti da Perugia.

Al fine di andare a valutare come la stessa varietà genetica campionata in due siti diversi consente di evidenziare effetti del suolo, delle condizioni climatiche e di eventuali fattori di disturbo sulle olive e sugli oli, le cultivar *Frantoio* e *Moraiolo* sono state campionate a Perugia, in uliveti puri, e ad Assisi in un uliveto misto mentre la varietà *Pisciottana* è stata campionata nei territori di Pisciotta e Licosa (SA). Inoltre, la possibilità di effettuare prelievi

in siti diversi per la stessa cultivar ha permesso anche di valutare, proprio nell'area di Licosa, gli effetti che le cosiddette "arature" del cinghiale (*Sus scrofa* L.) possono avere sulle proprietà chimico-fisiche del suolo e di conseguenza sulla produttività delle specie vegetali di interesse colturale che albergano sui suoli sottoposti a "grufolaggio". Gli effetti del pascolo sulla struttura ed il funzionamento degli ecosistemi possono essere variabili (Chase et al., 2000; Milchunas et al., 1993; Oesterheld et al., 1999). Il pascolo provoca variazioni nella qualità e quantità della vegetazione presente così come modifiche nell'abbondanza e nella composizione della fauna del suolo (Battigelli et al., 2003). Anche gli effetti del pascolo sul contenuto di materia organica del suolo, sulla struttura e sulla sua componente microbica sono variabili.

Il progetto ha previsto la realizzazione di due campionamenti, il primo nell'autunno 2012 e il secondo nell'autunno 2013 per ottenere una riconferma dei dati anche in seguito al diverso regime termo pluviometrico registrato nelle stazioni monitorate, ed inoltre, il prelievo di suolo è stato effettuato fino a 40cm di profondità (0-15cm e 15-40cm), ossia nel tratto di suolo dove l'attività radicale di *Olea europaea* L. è probabilmente molto intensa. Per il suolo è stata effettuata una caratterizzazione di base in termini fisici, chimici e biologici, attraverso la valutazione di: contenuto di sostanza organica; pH; contenuto idrico; contenuto di C e N totale; rapporto C/N; capacità di scambio cationico (CSC). Tra gli indicatori biologici sono stati considerati: biomassa e respirazione microbica; quoziente metabolico (qCO_2); coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM); biomassa fungina totale. I tratti fogliari analizzati sono stati: Area fogliare specifica (SLA), contenuto fogliare di materia organica secca (LDMC), tenore idrico delle foglie, contenuto idrico relativo delle foglie (RWC), contenuto in N e C; massima efficienza fotochimica (Fv/Fm); resa quantica del trasporto elettronico lineare del PSII (Φ PSII). Per determinare poi, variazioni della qualità del frutto sono stati determinati alcuni parametri chimico-fisici delle drupe di *Olea europaea* L. provenienti dalle diverse cultivar: rapporto polpa/nocciolo; contenuto idrico nell'intero frutto, contenuto di proteine nella polpa e nel nocciolo di olive; contenuto di lipidi totali; dosaggio dei polifenoli totali, determinazione dell'attività antiossidante degli estratti metanolici della polpa di olive. Le analisi condotte sui campioni di olio hanno perseguito come obiettivo quello di apprezzare la qualità di oli ricavati da ciascuna varietà di olivo, attraverso indici di qualità come: acidità libera, numero di perossidi e indici spettrofotometrici; dosaggio di polifenoli totali; determinazione del contenuto in carotenoidi e clorofille.

Capitolo 4. Materiali e metodi

4.1 Aree di studio

Le cultivar di *Olea europaea* L., prese in esame in questo progetto di ricerca, ricadono in specifiche aree produttive; sono tra le più rappresentative della Regione Campania (*Pisciottana*, *Ravece*, *Ortice*) e sono stati scelti siti qualificanti alcuni ambienti specifici e situazioni gestionali uniformi. Inoltre, per poter effettuare un confronto inter-regionale sono state prese in esame due cultivar della Regione Umbra (*Frantoio* e *Moraiolo*).

Pisciotta (40°7'0''N, 15°14'0''E), inserita nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, è una delle aree di campionamento presa in esame dell'areale del Cilento, e da cui prende il nome la cultivar *Pisciottana* che è quasi l'unica varietà genetica esistente. L'abitato principale di Pisciotta, a circa 100 km a sud del capoluogo (Salerno), si è sviluppato intorno alla cima di una bassa e ripida collina prospiciente il mar Tirreno, sui cui fianchi scorrono i torrenti Fiori e S. Macario. Le foci dei due corsi d'acqua delimitano più a valle la minuscola frazione di Marina di Pisciotta, sul litorale sottostante, distante circa tre km di strada. La zona è contraddistinta da clima mediterraneo; le aree interne e i massicci montuosi sono caratterizzati da precipitazioni, di norma, molto abbondanti (Fig. 4.1). La temperatura media annuale è 17°C per l'anno 2012 e 17,1°C per il 2013, mentre l'ammontare delle precipitazioni è pari a 1065 mm per l'anno 2012 e 1463,8 mm per il 2013. Tale area è costituita da zone di collina e montagna, con limitate zone pianeggianti in prossimità della costa. Il territorio è ricco di contrasti, l'altimetria passa velocemente dal livello del mare delle aree costiere ai quasi duemila metri di altitudine dei Monti Cervati, Gelbison e degli Alburni.

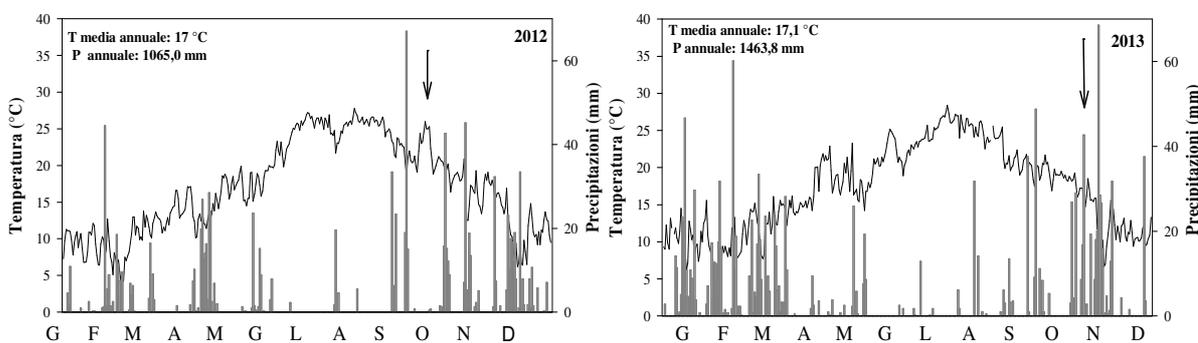


Figura 4.1: Temperature medie (linea continua) e precipitazioni (istogrammi) giornaliere registrate nella stazione meteorologica di Policastro (Sa) negli anni 2012 e 2013. Le frecce indicano la data del campionamento. Sono riportati in grafico anche le medie annuali di temperatura e l'ammontare annuale delle precipitazioni.

La cv. *Ravece*, proviene dal territorio di Luogosano (40°59'18''N, 14°59'30''E), della provincia di Avellino. Morfologicamente il territorio comunale, posto al centro dell'Irpinia, si distende lungo i fianchi di una collina, mentre ai piedi, a Sud, scorre il Fiume Calore. Il paese, infatti, disposto nella media Valle del Calore, ricade nel Percorso Naturalistico del fiume Calore Irpino a 370 metri s.l.m. Il basso livello di antropizzazione ha consentito, dal punto di vista ecologico, la conservazione e la continuità della rete ecologica ed una stabilizzazione dell'equilibrio e dell'habitat. Tra questi spicca certamente l'area che vede la confluenza del torrente Fredane nel Fiume Calore, caratterizzata dalla tipica flora e da un'abbondante fauna, tra cui si ricorda l'airone rosa. Luogosano sorge ai piedi del Monte Pidocchio, la cui cima è raggiungibile esclusivamente attraverso sentieri, per potere godere dall'alto la vista della sottostante gola del Calore. Indubbiamente come per la vite, di cui l'Irpinia è culla di produzioni enologiche di gran pregio, anche per l'olivo risulta determinante, ai fini dell'alta qualità delle produzioni, l'ambiente pedoclimatico: la natura dei terreni, ricchi di sedimenti vulcanici ed il clima, influenzato dalla presenza della dorsale appenninica che attraversa l'intero territorio. Il clima mite ma con eccezionali punte di freddo (Fig. 4.2), nonché l'ubicazione degli oliveti ad altitudini elevate, sono i fattori principali che hanno determinato il consolidarsi nel territorio della cultivar *Ravece*, capace di resistere alle gelate e alle nevicate invernali e primaverili. Come nel caso del Cilento i due anni presi in esame presentano differenze nell'ammontare delle precipitazioni. Infatti il 2012 è stato un anno meno piovoso con precipitazioni complessive di 734,4 mm rispetto ai 1014,2 mm che hanno interessato la stessa zona l'anno successivo.

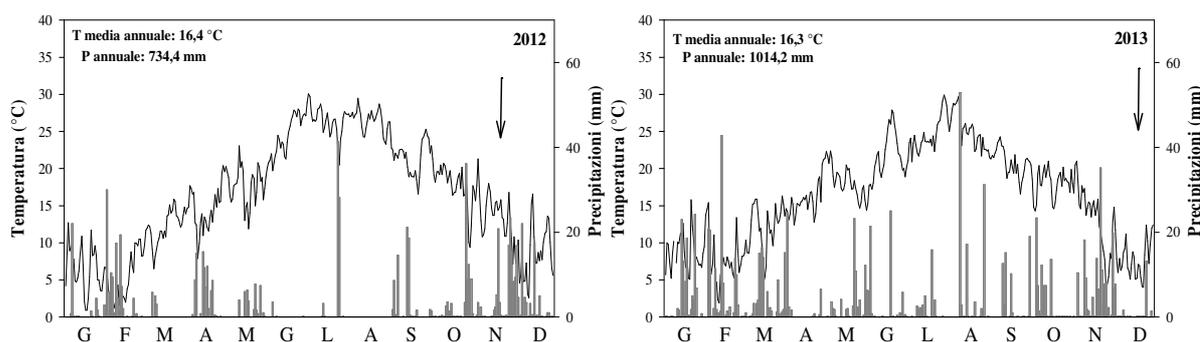


Figura 4.2: Temperature medie (linea continua) e precipitazioni (istogrammi) giornaliere registrate nella stazione meteorologica di Mirabella Eclano (Av) negli anni 2012 e 2013. Le frecce indicano la data del campionamento. Sono riportati in grafico anche le medie annuali di temperatura e l'ammontare annuale delle precipitazioni.

La cultivar *Ortice*, caratteristica di molte aree del Sannio è stata valutata nel territorio di Molinara (41°18'00''N, 14°55'00''E), in provincia di Benevento. Molinara è situata a destra del capoluogo (Benevento), dal quale dista circa 30 Km. È a circa 580 metri sul livello del mare, sulla costa orientale del Monte Caffarello e sorge in posizione elevata in affaccio sulla valle del Tammaricchio, affluente del Tammaro, sull'Appennino Sannita, fra la Montagna di San Giorgio e il San Marco. Il Territorio comunale ha la forma di un triangolo i cui 2/3 sono situati in montagna e solo 1/3 è più basso. Il comune dal punto di vista geomorfologico è caratterizzato da terreni collinari ed è contraddistinto da clima mediterraneo con la presenza nelle aree interne e sui massicci montuosi di precipitazioni, anche nevose, di norma, molto abbondanti (Fig. 4.3), nel periodo tardo-autunnale e invernale. Le temperature medie annue registrate intorno ai 13°C sono risultate più basse rispetto ai due siti precedenti (Fig. 4.3). Le precipitazioni sono simili a quelle registrate per il sito Irpino con analoghe differenze tra i due anni indagati (Fig. 4.3).

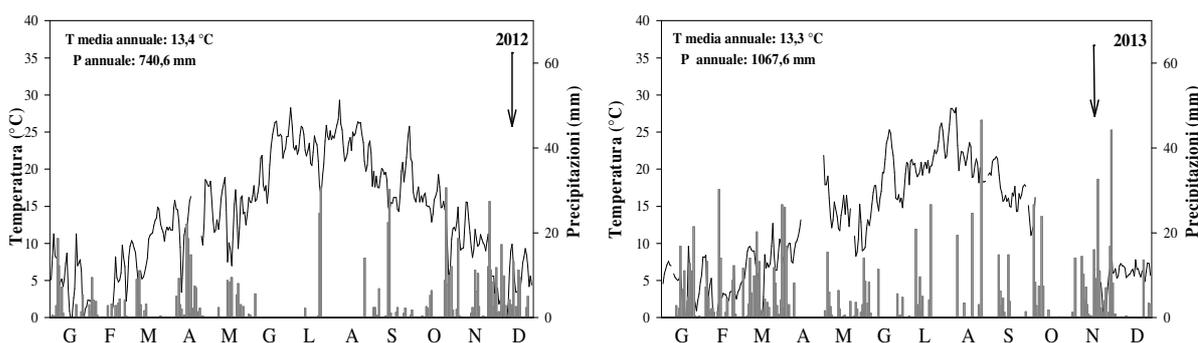


Figura 4.3: Temperature medie (linea continua) e precipitazioni (istogrammi) giornaliere registrate nella stazione meteorologica di san Marco dei Cavoti (Bn). Le frecce indicano la data del campionamento. I dati si riferiscono agli anni 2012 e 2013 e sono riportati per i due anni anche la temperatura media e l'ammontare delle precipitazioni annuali.

Per la cultivar *Pisciottana*, il campionamento è stato effettuato non solo a Pisciotta ma anche a Licosia (40°15'00''N, 14°54'00''E), nella provincia di Salerno. Licosia è una frazione del comune di Castellabate in provincia di Salerno, costituita da un promontorio denominato Enipeo da Licofrone o Posidio da Strabone che ospita un vasto parco forestale di macchia mediterranea.

La località si trova sulla costa tirrenica a nord del Cilento, il suo territorio è totalmente all'interno del Parco Nazionale del Cilento, Vallo di Diano e Alburni. Si trova nella parte meridionale del comune di Castellabate, fra le frazioni di San Marco e Ogliastro Marina.

L'area forestale, composta da macchia mediterranea che arriva fino al mare, tutelato dall'istituzione dell'area marina protetta Santa Maria di Castellabate, ospita al centro la frazione costituita da un piccolo borgo di alcune decine di abitanti posto alle pendici del Monte Licosa (326 m s.l.m.). La sua estremità, in corrispondenza della quale si colloca l'isoletta omonima con il faro, chiude a sud il golfo di Salerno, e rappresenta un punto importante per la navigazione fin dai tempi antichi. L'Isola ospita l'habitat naturale di un particolare tipo di lucertola endemica dalla livrea verde e azzurra, la *Podarcis sicula* Klemmeri. L'area di Punta Licosa interessata da questo studio è di circa 10 kmq e soprattutto è interessata dalla presenza di diversi gruppi familiari di cinghiali, con una densità stimata intorno a 10 ind/km² (Piano di Azione per la Gestione del Cinghiale (*Sus scrofa*) nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano).

Lungo la fascia costiera il clima, mitigato dalla presenza del mare, è di tipo temperato caldo, con estati calde e inverni miti (Fig. 4.4). Le precipitazioni, molto scarse nei mesi estivi, sono concentrate nel periodo primaverile e tardo-autunnale e superano i 1000 mm per entrambi gli anni considerati (Fig. 4.4). Le temperature medie del mese più freddo, gennaio, vanno da una minima di 4°C a una massima di 12°C, mentre in luglio e agosto si passa dai 18°C ai 29°C. Il clima tipicamente mediterraneo è favorito anche dalla protezione dell'Appennino campano, che ripara la zona dai venti freddi in inverno.

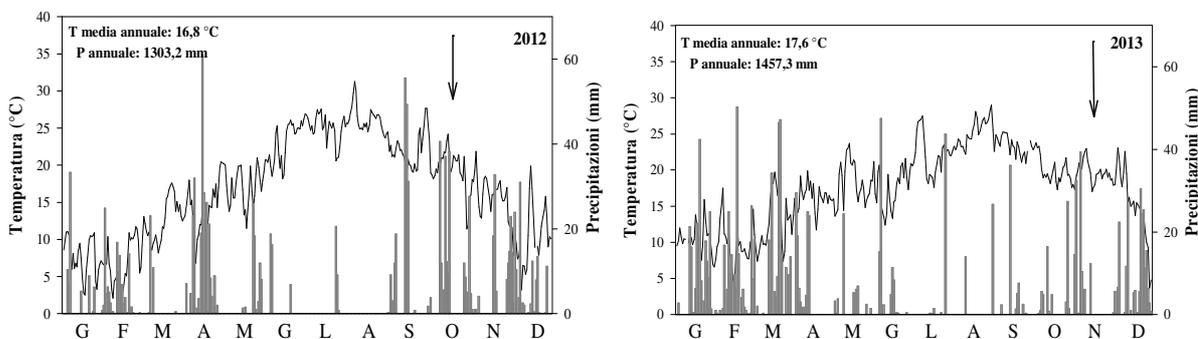


Figura 4.4: Temperature medie (linea continua) e precipitazioni (istogrammi) giornaliere registrate nella stazione meteorologica di Stella Cilento (Sa) negli anni 2012 e 2013. Le frecce indicano la data del campionamento. Sono riportati in grafico anche le medie annuali di temperatura e l'ammontare annuale delle precipitazioni.

La sua peculiare posizione geografica, le coste, i numerosi corsi di acqua e i massicci montuosi conferiscono al territorio una variegata orografia che si manifesta con una complessità di ambienti e una duplice natura geologica delle rocce che lo costituiscono.

Presenta, infatti, una vasta zona di calcare mesozoico alla base, ricoperta da argille dell'Eocene. Il terreno di natura silicio-calcareo, tendente allo sciolto, è ricco di elementi nutritivi, di pronto impiego, in grado di condizionare lo sviluppo vegetativo e la produttività dell'olivo, che trova quindi, in questi terreni, condizioni di sviluppo molto favorevoli.

Per quanto riguarda i campionamenti effettuati nella Regione Umbria, sono stati esaminati due uliveti puri, per le cultivar *Frantoio* e *Moraiolo* nella città di Perugia (43°08'00''N, 12°22'00''E). Il capoluogo della Regione Umbra è ubicato a 450 s.l.m., gode di un clima temperato di tipo sublitoraneo interno con una temperatura media annua di poco superiore a 13°C. Il mese più freddo è gennaio, con una temperatura media di 4,2°C, il più caldo luglio, con medie leggermente al di sotto i 23°C. Le precipitazioni annue sono (Fig.4.5) leggermente più alte di quelle di Assisi per il 2012 e molto simili per il 2013 che anche per questa stagione rimane l'anno più piovoso.

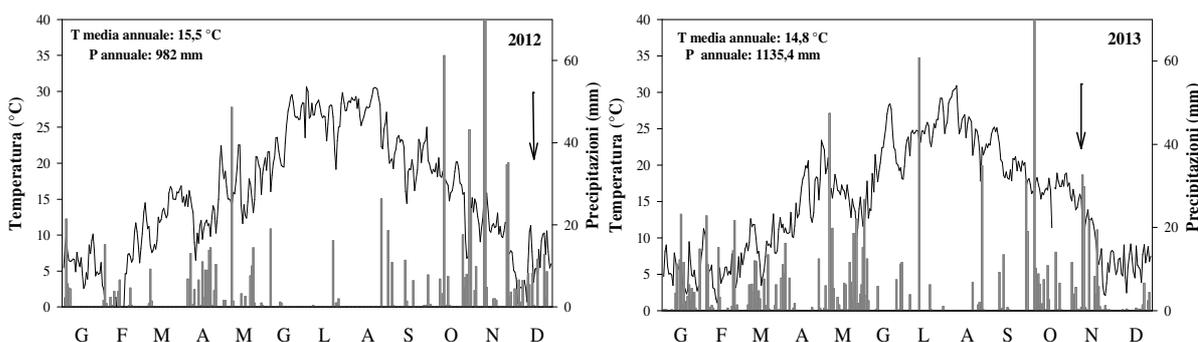


Figura 4.5: Temperature medie (linea continua) e precipitazioni (istogrammi) giornaliere registrate nella stazione meteorologica di Perugia Santa Giuliana (Pg) negli anni 2012 e 2013. Le frecce indicano la data del campionamento. Sono riportati in grafico anche le medie annuali di temperatura e l'ammontare annuale delle precipitazioni.

Questo clima è determinato dalla dorsale appenninica che costituisce una barriera sia alla penetrazione degli influssi del mare Adriatico, ma anche alle masse di aria fredda provenienti da nord-est.

Per le stesse cultivar *Frantoio* e *Moraiolo*, un ulteriore campionamento ha interessato un uliveto misto nella città di Sterpeto (40°47'00''N, 15°41'00''E), che fa parte del comune di Assisi, in provincia di Perugia. La frazione o località di Sterpeto sorge a 344 metri sul livello del mare. Il territorio comunale assisano comprende porzioni sia pianeggianti sia collinari che di bassa montagna. Sterpeto grazie alla sua posizione posta in collina ed affacciata sulla Valle Umbra, presenta un clima gradevole ma di transizione tra l'area di pianura ad ovest e quella più montuosa ad est, con estati calde ma non troppo afose ed inverni non eccessivamente

rigidi. Caratteristica invernale sono le temperature percepite dal corpo umano a seguito dei freddi venti di tramontana che scorrono lungo il bordo nord occidentale del Monte Subasio, poiché solitamente tendono ad essere intensi, ed il loro *wind chill* associato è di vari gradi sotto lo zero. Durante l'anno compare anche la neve, ma grazie alla propria posizione riparata, molto difficilmente cade in quantità rilevanti (Fig. 4.6).

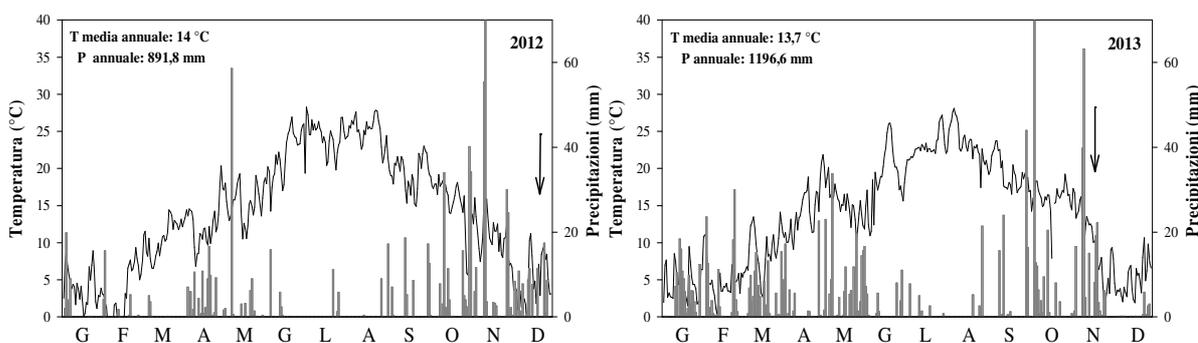


Figura 4.6: Temperature medie (linea continua) e precipitazioni (istogrammi) giornaliere registrate nella stazione meteorologica di Pianello (Pg) negli anni 2012 e 2013. Le frecce indicano la data del campionamento. Sono riportati in grafico anche le medie annuali di temperatura e l'ammontare annuale delle precipitazioni.

La primavera e l'autunno tendono ad essere piovose e piuttosto tiepide. Anche per Assisi il 2012 è stato un anno meno piovoso. Questo clima favorisce la presenza di una vegetazione di tipo mediterraneo, con la presenza di specie come l'olivo. Il territorio è caratterizzato da una grande variabilità geologica, che si traduce in una complessità morfologica all'interno di una superficie relativamente modesta come quella dell'intera regione (8600 Km³ circa). Sono pertanto individuabili, a grande scala, specifiche "unità di paesaggio": quella delle strutture calcaree dell'Appennino; quella delle formazioni arenacee che, per le loro caratteristiche mineralogico-petrografiche, risultano particolarmente vulnerabili ai processi di degradazione, costituendo la componente collinare della regione, con versanti poco acclivi e ben raccordati ai fondovalle; la parte centrale pianeggiante che comprende essenzialmente la Valle Umbra; e infine l'unità di paesaggio caratterizzata da rocce ignee, legate all'attività dell'apparato vulcanico di Bolsena. In particolare, si tratta di un ambiente sedimentario sviluppatosi dall'accumulo di materiale detritico (ghiaia, sabbie, argilla) proveniente dai rilievi.

4.2 Campionamento

Il campionamento costituisce la prima fase di ogni procedimento di analisi e la sua corretta esecuzione è fondamentale per lo sviluppo dell'intero processo (Stolbovoy et al., 2005).

Il presente progetto di dottorato ha previsto la realizzazione di prelievi in Campania e in Umbria e la scelta di siti qualificanti alcuni ambienti e situazioni gestionali specifiche. I prelievi sono stati realizzati per ottenere campioni di suolo, foglie, frutti e oli delle cultivar *Pisciottana*, *Ravece*, *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo*. I prelievi effettuati a Punta Licosa e Pisciotta, che ricadono all'interno del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, sono stati realizzati in uliveti privati. L'uliveto di Punta Licosa è caratterizzato da un sovrappascolo di cinghiali. I suoli di questa area sono fortemente influenzati dall'azione di *Sus scrofa* L., che grufola arando il terreno in profondità e in alcuni casi provoca danni diretti alla vegetazione arborea, sfregando il dorso sulla corteccia, asportando grossi frammenti. I campionamenti, quindi, sono stati realizzati sia da alberi con terreni grufolati (UG), che da alberi dove non erano evidenti i segni dell'azione dei cinghiali (UNG).

I prelievi per la cultivar *Ravece* e la cultivar *Ortice* sono stati effettuati presso uliveti privati in particolare nell'azienda agricola "La Molarà", situata nel comune di Luogosano, e nell'azienda agricola "Gentilcore" di Molinara, rispettivamente.

Infine, per le cultivar *Frantoio* e *Moraiolo*, i campionamenti sono stati realizzati in uliveti di Perugia e di Sterpeto vicino ad Assisi, gestiti dal dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia. In particolare l'uliveto di Perugia era caratterizzato da raggruppamenti di alberi appartenenti alle diverse cultivar mentre quello di Sterpeto era un uliveto misto organizzato in filari alternati delle due varietà.

4.3 Campionamento di suoli

In ciascuna delle aree esaminate sono stati effettuati campionamenti nell'autunno 2012 e nell'autunno 2013 subito prima o durante la raccolta delle olive. Simultaneamente, è stato realizzato il campionamento di suoli, foglie e frutti dai quali poi sono stati estratti gli oli.

Il campionamento di carote di suolo per la determinazione di diversi parametri biologici e chimico-fisici è stato standardizzato per ciascun sito scelto, in modo da far risultare il campione casuale, rappresentativo e omogeneo. Ciascun sito di campionamento è stato suddiviso in sub-aree, generalmente tre, in ognuno dei quali sono prese più carote di suolo. Questa modalità di campionamento ha consentito di ottenere un campione

rappresentativo di ciascuna sub-area, senza perdere l'informazione legata alla variabilità spaziale di ciascuna area di campionamento.

La raccolta dei campioni di suolo nelle diverse sub-aree è stata effettuata sotto la chioma di almeno 3 alberi per cultivar in ciascun sito. Fa eccezione l'uliveto misto di Sterpeto, dove per il campionamento è stato scelto un punto intermedio tra i filari alternati di alberi appartenenti alle cultivar *Frantoio* e *Moraiolo*.

Tutti i campioni di suolo sono stati raccolti attraverso un carotaggio utilizzando appositi carotatori cilindrici a banda stagnata. Il campionamento di suolo è stato effettuato fino a 40 cm di profondità dove si esplica la maggiore attività radicale di alberi secolari come gli ulivi. Dopo aver allontanato la lettiera, per ogni sito sono state prelevate tre carote di suolo e direttamente in campo sono state separate in sub-campioni alle profondità 0-15cm e 15-40cm, poi unite a formare un unico campione composito omogeneo. Contestualmente, in ciascuna sub-area sono stati prelevati campioni (0-15cm) per la determinazione della capacità idrica massimale (CIM). Una volta in laboratorio, i singoli campioni di suolo sono poi stati setacciati, mediante un setaccio in plastica con maglie di 2 mm, in modo da eliminare lo scheletro, eventuali residui di lettiera e la pedofauna di grosse dimensioni. Le analisi biologiche sono state effettuate su suolo fresco e realizzate entro una settimana dal campionamento conservando i terreni in frigo a 4°C, per bloccare l'attività biologica senza creare danni ai microrganismi. Le analisi di tipo chimico-fisico sono state realizzate su campioni di suolo seccati in stufa a 105°C per 48h, temperatura alla quale viene bloccata l'attività biologica senza tuttavia mineralizzare la sostanza organica. Un'aliquota di ciascun sub-campione, seccato in stufa, è stata, poi, polverizzata mediante un polverizzatore (Fritsch, analusette 3, Spartan Puerisette, voltage 100-120; 200-240, frequency (Hz) 50-60), con biglia e pareti in agata, al fine di evitare la contaminazione dei campioni con metalli. La polverizzazione è necessaria per effettuare determinazioni del contenuto di C e N.

4.4 Determinazione dei parametri chimico-fisici del suolo

Il monitoraggio della qualità dei suoli, finalizzato alla conservazione della fertilità fisica, chimica e biologica è stato effettuato attraverso i seguenti parametri chimico-fisici: contenuto idrico e capacità idrica massimale (Metodi Ufficiali di Analisi Chimica del Suolo, 2000); pH misurato per via potenziometrica; contenuto di sostanza organica secondo Allen (1989); capacità di scambio cationico (CSC) con bario cloruro e trietanolammina (Metodo

Ufficiale n° XIII.2 Supplemento Ordinario G.U. n°248 del 21.10.1999); contenuto di C e N totale per combustione attraverso gas-cromatografia (Elemental Analyser Flash 112 Series EA).

4.4.1 Tenore idrico

Il tenore idrico che rappresenta la quantità di acqua presente nel suolo al momento del prelievo. Questo parametro varia con le condizioni climatiche, in particolare precipitazioni e periodi di aridità; inoltre, dipende dalla porosità del terreno che a sua volta è correlata alla tessitura: l'assestamento spaziale delle particelle fa sì che a parità di condizioni i terreni con tessitura fine abbiano un maggiore volume di spazi vuoti rispetto a quelli con tessitura grossolana. In generale, la porosità, e quindi la capacità del terreno a trattenere acqua, aumenta passando da un terreno sabbioso, a uno limoso, e infine ad uno argilloso.

Il Tenore idrico (T.I.), è stato determinato con metodo gravimetrico (Metodi Ufficiali di Analisi Chimica del Suolo, 2000), pesando 5 grammi di suolo fresco setacciato (2 mm) e seccandolo in stufa a 105°C per 48h, fino al raggiungimento di un peso costante. La quantità di acqua presente nel suolo, calcolata come differenza di peso tra campione fresco e campione secco, è stata espressa come percentuale rispetto al peso secco del suolo.

$$T.I. = [(\text{peso fresco netto} - \text{peso secco netto}) / \text{peso secco netto}] * 100$$

L'operazione è stata eseguita in modo da ottenere tre repliche per ogni campione.

4.4.2 Capacità idrica massimale (CIM)

La Capacità Idrica Massimale (CIM) è la massima quantità di acqua che il terreno riesce a trattenere contro la forza di gravità ed è stata determinata secondo i Metodi Ufficiali di Analisi Chimica del Suolo (2000). Per ciascun sito i prelievi di terreno sono stati effettuati utilizzando dei carotatori di plastica lunghi 15 cm e del diametro di 5 cm, di tara nota, con fondo forato internamente ricoperto da carta assorbente, in modo da evitare la fuoriuscita di terreno. La saturazione del terreno viene effettuata ponendo le carote di suolo integre in un contenitore con acqua che imbibisce i campioni risalendo per capillarità. Dopo l'imbibizione si elimina l'acqua gravitazionale mediante percolazione, e si ottiene il valore del peso lordo a saturazione. I carotatori poi vengono posti in stufa a 105°C fino al raggiungimento di un peso secco costante. La quantità di acqua trattenuta è data dal rapporto:

$$C.I.M. = [(\text{peso a saturazione} - \text{peso secco}) / \text{peso secco}] * 100$$

La capacità idrica massimale è espressa in grammi di acqua trattenuta contro la forza di gravità, da 100 grammi di terreno secco.

4.4.3 pH

Il pH rappresenta il grado di reazione di un suolo, ovvero la misura della sua acidità o alcalinità. Il pH del suolo può variare molto da orizzonte a orizzonte (Sanesi, 2000). Si considera come pH di un suolo quello di una soluzione acquosa in equilibrio con la parte solida del suolo stesso. Per determinare il pH del suolo è stato utilizzato un pH-metro e la misura è stata fatta per via potenziometrica. Il pH è stato misurato su suolo fresco, in triplicato: in una beuta di 100 ml sono stati pesati 10 g di terreno a cui sono stati aggiunti 25 ml di acqua distillata, per ottenere un rapporto acqua:terreno pari a 2,5:1. Tali beute sono state poste su di un piano oscillante per 20 minuti, avendo cura, dopo 10 minuti, di ruotarle di 90° per spostare la direzione di oscillazione del liquido ed ottenere un miscuglio omogeneo. Dopo l'agitazione, le beute sono state lasciate sedimentare per circa mezz'ora, passata la quale s'è provveduto a prelevare il surnatante e trasferirlo in un becker nel quale è stato misurato il pH.

4.4.4 Sostanza organica

Il contenuto in sostanza organica (SOM) di un suolo rappresenta uno dei principali indicatori chimici della qualità del suolo (Schoenholtz et al., 2000). La sostanza organica favorisce la formazione di struttura, aumenta la porosità del suolo, la ritenzione di acqua e migliora la capacità di scambio cationico (Sanesi, 2000).

La sostanza organica contenuta nel suolo è stata determinata su terreno secco, secondo Allen, (1989). Sono stati pesati per ogni campione 3 grammi di suolo e sono stati posti in capsule di ceramica, di peso noto, insieme a 8 ml di HCl (10% v:v) per un'intera notte. Successivamente le capsule sono state poste su di una piastra riscaldante per far evaporare l'HCl per circa 15 minuti. Una volta raffreddati, i campioni sono stati, poi, inceneriti in muffola per circa 2h a 550°C. Le capsule sono state poi prelevate per pesare le ceneri. La quantità di sostanza organica è espressa in percentuale e calcolata tramite la formula:

$$S.O. = \frac{(\text{peso netto secco} - \text{peso netto ceneri})}{\text{peso netto secco}} * 100$$

Sono state effettuate tre repliche per ciascun campione.

4.4.5 Capacità di Scambio Cationico

La Capacità di Scambio Cationico (CSC) è la capacità di una particella del suolo di assorbire ioni con carica positiva. Rappresenta, di conseguenza, la quantità massima di cationi adsorbibili (cationi scambiabili) dai colloidali organici e minerali del suolo (Gessa et al., 1989). La capacità di scambio cationico rappresenta un buon indicatore di qualità del suolo in quanto fornisce un'indicazione sulla fertilità potenziale e sulla natura di materiali argillosi. I cationi presenti nella soluzione del suolo sono calcio, magnesio e ammonio. Nella maggior parte dei suoli della zona temperata lo scambio cationico è predominante su quello anionico. La capacità di scambio cationico è definito il numero totale di siti con carica negativa, disposti sui bordi delle particelle di argilla e della sostanza organica del suolo. Queste cariche negative consentono a un suolo di prevenire la perdita per lisciviazione dei nutrienti con carica positiva (Smith et al., 2009).

La capacità di scambio cationico (CSC) è stata determinata con bario cloruro e trietanolamina secondo il Metodo Ufficiale n° XIII.2 Supplemento Ordinario G.U. n°248 del 21.10.1999. Il principio di tale metodica prevede che il campione di suolo viene monosaturato con bario per ripetuti trattamenti con soluzione di bario cloruro tamponata a pH 8,2. Successivamente, al campione Ba-saturato viene aggiunta più volte una quantità definita di una soluzione a titolo noto di magnesio solfato. La reazione porta alla formazione di bario solfato insolubile e, quindi, allo scambio completo Ba/Mg. L'eccesso di magnesio in soluzione viene determinato per titolazione complessometrica. Calcolata la quantità di magnesio adsorbito, che corrisponde alla quantità di bario scambiato, si accerta il valore della capacità di scambio cationico.

Il procedimento ha previsto innanzitutto l'utilizzo di suolo precedentemente essiccato in stufa a 105°C ed essendo quelli presi in esame, suoli argillosi, , si è ritenuto opportuno pesare 1 g di ciascun campione, come suggerito dal protocollo ufficiale. Il tutto è stato trasferito in tubo da centrifuga da 50 ml, di peso noto, e successivamente è rilevata la massa del tubo con il campione. Ad ogni tubo da centrifuga sono aggiunti 30 ml della soluzione bario cloruro ($\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) e trietanolamina (TEA) $[\text{N}(\text{CH}_2\text{OHCH}_2)_3]$ 98%, tamponata a pH 8,2 con HCl ($1 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$). L'aggiunta della soluzione di cloruro di bario e TEA ai campioni di suolo, determina una sostituzione dei cationi presenti sulla superficie di scambio con il bario.

I campioni così preparati vengono posti su un agitatore per 1 ora, dopodiché centrifugati a $3000 \text{ giri} \times \text{minuto}^{-1}$ per 10 minuti. La soluzione limpida è fatta decantare in un

matraccio tarato da 100 ml. Il trattamento è ripetuto altre due volte decantando le soluzioni limpide nello stesso matraccio da 100 ml. Il campione, poi, viene lavato con 30 ml di H₂O distillata e successivamente, centrifugato a 3000 giri x minuto⁻¹ per 10 minuti. Dopo aver scartato il surnatante, viene rilevata nuovamente la massa del tubo con il campione. Successivamente sono prelevati con buretta di precisione e trasferiti nel tubo da centrifuga 30 ml della soluzione (5 cmoli x L⁻¹) di magnesio solfato (MgSO₄ x 7 H₂O). Viene, poi, effettuata un'agitazione manuale, fino a dispersione completa del campione, dopodiché i campioni sono inseriti su un agitatore per 2 ore. Si effettua nuovamente una centrifuga a 3000 giri x minuto⁻¹ per 10 minuti e si provvede a prelevare e poi trasferire, in matraccio conico di Erlenmeyer da 250 ml, 10 ml della soluzione limpida, a cui sono aggiunti 100 ml di acqua distillata, 10 ml della soluzione tampone a pH 10 di ammonio cloruro ed una punta di spatola di indicatore costituito da sodio cloruro e nerio eriocromo T (C₂₀H₁₂N₃NaO₇S). La soluzione della prova in bianco è preparata trasferendo in matraccio conico di Erlenmeyer da 250 ml, 100 ml di H₂O distillata, 10 ml della soluzione (5 cmoli x L⁻¹) di magnesio solfato, 10 ml della soluzione tampone di ammonio cloruro e una punta di spatola dell'indicatore. La soluzione della prova in bianco e quella del campione è titolata con la soluzione (2,5 cmoli x L⁻¹) di EDTA fino a colorazione azzurra.

La CSC è espressa in centimoli per kg di suolo (cmol₍₊₎ x kg⁻¹), ciascuna misura è stata eseguita in triplicato e per il calcolo è stata utilizzata la seguente equazione:

$$CSC = [(VB - VA) (30 + B - A)] * M/m$$

dove:

VA = volume della soluzione di EDTA utilizzato per la titolazione della soluzione del campione, espresso in millilitri;

VB = volume della soluzione di EDTA utilizzato per la titolazione della soluzione della prova in bianco, espresso in millilitri;

A = massa del tubo da centrifuga + il campione, espressa in g

B = massa del tubo da centrifuga + il campione dopo saturazione con soluzione di bario cloruro e lavaggio con acqua, 30 ml/10 ml = rapporto volumetrico;

M = concentrazione della soluzione di EDTA espressa in c moli L⁻¹;

m = massa del campione utilizzata, espressa in grammi.

4.4.6 Contenuto di Carbonio e Azoto

Un altro parametro di grande importanza, ai fini della valutazione della fertilità di un terreno, è sicuramente il contenuto di Carbonio e Azoto dai quali è possibile calcolare il rapporto C/N. Tale rapporto, consente di verificare lo stato metabolico dei suoli presi in esame ed è un importante indice della degradabilità e recalcitranza della sostanza organica.

Sui campioni di suolo campionati alle diverse profondità sono state realizzate misure del contenuto totale di C e N, dalle quali è stato ricavato il rapporto C/N. Le misure sono state realizzate su campioni precedentemente essiccati in stufa a 105°C e finemente polverizzati come descritto poc' anzi, mediante un polverizzatore. Tali determinazioni sono state effettuate in triplicato per ciascun campione. Il contenuto di C e di N totale è stato misurato attraverso un analizzatore C, N, S (Elemental Analyser, Flash 112 Series EA).

Per questa determinazione sono stati pesati in capsuline di stagno, circa 15 mg di suolo minerale, alle diverse profondità. Le capsuline, contenenti i campioni, sono state trasferite nel campionatore automatico del gas-cromatografo, dove il campione viene prima di tutto introdotto in una camera di combustione ad alta temperatura e, poi, ossidato completamente e istantaneamente a temperature di 1800°C fino a produrre CO₂ e NO_x. I gas prodotti da questo processo vengono fatti passare su uno specifico catalizzatore (ossido di cobalto argentato e ossido di cromo) per completare il processo di ossidazione. Al fine di ridurre gli ossidi di azoto ad azoto molecolare (N₂), i gas passano poi in una colonna contenente rame ridotto (colonna di riduzione, 840°C). Sulla linea è, inoltre, montato un filtro di perclorato di magnesio anidro (Mg(ClO₄)) che assorbe il vapore acqueo. La separazione dei differenti prodotti avviene mediante una colonna cromatografica (impaccata con Porapac Q). Infine, i gas (CO₂, N₂) sono rilevati da un TCD-thermal conductivity detector che, al passaggio degli ossidi, registra i segnali come variazioni della differenza di potenziale necessarie a mantenere costante la temperatura del detector stesso (60°C). Il contenuto di carbonio e quello di azoto totale, espressi come percentuale su peso secco di campione, sono forniti direttamente dallo strumento sulla base della curva di taratura (ER) realizzata utilizzando 4 standard di foglie di leccio di peso crescente (C= 49.81% e N= 1.855%), certificato dalla Carlo Erba Instruments (Milano).

4.5 Determinazione dei parametri biologici del suolo

Tra gli indicatori biologici, per valutare la qualità e lo stato di salute dei suoli presi in esame, sono stati considerati parametri caratterizzanti sia l'entità che l'attività della biomassa

microbica nel suolo: biomassa e respirazione microbica secondo Degens et al. (2001); quoziente metabolico (qCO_2); coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM); biomassa fungina attiva e totale secondo Olson (1950) e Söderström (1979).

4.5.1 Biomassa microbica

La biomassa microbica è stata definita come la frazione vivente della sostanza organica del suolo, escludendo le radici delle piante e la pedofauna (Jenkinson et al., 1981). La quantità di biomassa microbica nel suolo rispecchia generalmente il contenuto di sostanza organica, con un rapporto carbonio microbico/carbonio organico compreso in media tra 1 e 5% in peso (Sparling, 1997).

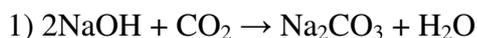
La biomassa microbica è stata stimata con il metodo della Substrate Induced Respiration (SIR, Sparling, 1997; Degens et al., 2001), che si basa sulla misura dell'evoluzione di CO_2 dal suolo in risposta all'aggiunta di glucosio, un substrato facilmente mineralizzabile dalla microflora edafica, dopo incubazione del suolo in condizioni controllate di temperatura e umidità. Il valore di risposta respiratoria così ottenuto è risultato correlato alla quantità di biomassa microbica attiva presente nel campione e per questo può essere convertito in quantità di biomassa microbica. Si è proceduto a pesare una quantità di suolo fresco equivalente a 3 g di suolo secco a cui sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione di D-glucosio ad una concentrazione di 30 mg ml^{-1} . Ciascun campione di suolo con aggiunta di glucosio è stato incubato in barattoli di vetro a chiusura ermetica con becker contenenti circa 15 ml di acqua, in modo da garantire un ambiente umido, e 10 ml di una soluzione 0,1 N di NaOH. I barattoli sono stati incubati per 4 notti, al buio a 25°C in camera termostata. La soluzione di NaOH funge da trappola per la CO_2 liberata dal suolo che resta imprigionata nel barattolo chiuso ermeticamente. Aggiungendo un eccesso di D-glucosio, facilmente utilizzabile dalle specie viventi, è possibile stimare l'evoluzione di CO_2 e quindi l'attività dei microrganismi presenti nei campioni in esame. L'anidride carbonica lega la soluzione di idrossido di sodio presente nel barattolo e l'evoluzione di CO_2 è proporzionale alla quantità di microrganismi del campione. La quantità di carbonio della biomassa microbica è stata ricavata mediante la seguente formula:

$$\text{Biomassa microbica} = \text{mg C-CO}_2 \text{ g suolo secco}^{-1} \text{ h}^{-1} * Kc$$

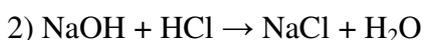
dove K_c è la frazione di carbonio della biomassa mineralizzata a CO_2 durante i 4 giorni di incubazione (Jankinson et al., 1981). Tali determinazioni sono state effettuate in tre repliche di laboratorio per ciascun campione.

4.5.2 Respirazione microbica

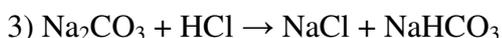
L'attività microbica viene determinata come respirazione del suolo (evoluzione di CO_2 dal suolo), che costituisce un indicatore del livello di attività di decomposizione della materia organica operata dai microrganismi edafici (Anderson, 1982; Insam, 1989). La respirazione basale del suolo, misurata come evoluzione di CO_2 , rappresenta una stima del metabolismo degli organismi edafici; più ricca e più attiva è la comunità edafica, maggiore è l'evoluzione di CO_2 dal suolo. Secondo Parker et al. (1983) l'attività microbica è responsabile del 71% dell'evoluzione totale di CO_2 dal suolo. La misura della respirazione condotta in laboratorio costituisce una stima del metabolismo della microflora e della microfauna, dato che le analisi sono state effettuate su suoli setacciati, privi delle radici delle piante e della fauna di maggiori dimensioni. Per stimare la respirazione i campioni di suolo, presi in esame, analogamente a quanto fatto per la determinazione della biomassa microbica con il glucosio, sono stati incubati nelle stesse condizioni, per lo stesso periodo, dopo aggiunta di sola acqua distillata (3 ml). Insieme ai barattoli contenenti i campioni di suolo con H_2O e con aggiunta di glucosio, sono stati incubati tre bianchi, ovvero, barattoli contenenti solo la $NaOH$ (0,1 N) e il becker con acqua distillata, per sottrarre la quantità di CO_2 già presente nel barattolo, da quella frutto dell'attività dei microrganismi del suolo. Dopo l'incubazione è stata eseguita una doppia titolazione con due indicatori, la fenolftaleina e il metilarancio, ed una soluzione titolante di HCl (0,05 N). Durante l'incubazione l'idrossido di sodio reagisce con la CO_2 racchiusa nel barattolo ed evoluta dagli organismi del suolo, producendo Na_2CO_3 , secondo la seguente reazione:



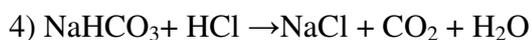
Durante la prima titolazione, nella quale si utilizza come indicatore la fenolftaleina, l'acido cloridrico neutralizza la soda in eccesso, che non ha reagito con la CO_2 , secondo la reazione:



Successivamente l'acido reagisce con il carbonato di sodio ottenuto dalla reazione (1):



Quando tutto il carbonato è stato convertito in bicarbonato, la fenolftaleina vira da violetto ad incolore. Nella seconda titolazione viene usato come indicatore il metilarancio, che vira da giallo ad arancio quando tutta la CO₂ viene liberata dal bicarbonato di sodio, secondo la seguente reazione:



La quantità di carbonio evoluta come CO₂ da ciascun campione, è ricavata mediante la formula seguente:

$$5) \text{mg CO}_2 = 2 * (a - b) * 1.1$$

dove:

a = ml di HCl utilizzati nella seconda titolazione del campione

b = ml di HCl utilizzati nella seconda titolazione del bianco, che indica la CO₂ presente nell'atmosfera dei barattoli, indipendentemente dal terreno.

Dalla stechiometria delle reazioni si ricava che l'evoluzione di una mole di CO₂ a partire dal carbonato di sodio, in cui è immobilizzata, (reazioni 3 e 4) richiede due moli di HCl: una mole per convertire il carbonato in bicarbonato (reazione 3) ed una mole per liberare la CO₂ dal bicarbonato (reazione 4). Poiché i millilitri di HCl presi in considerazione nella formula sono soltanto quelli della seconda titolazione (reazione 4), questi vanno moltiplicati per 2. Inoltre, sapendo che ad ogni ml di HCl 0,05 N, utilizzato nella titolazione corrispondono 1.1 mg di CO₂, i millilitri di HCl utilizzati nella seconda titolazione vanno ancora moltiplicati per 1.1. I mg di CO₂ evoluta, così ottenuti, vengono riferiti a grammo di peso secco di suolo, nell'unità di tempo. Tali determinazioni sono state effettuate in triplicato.

4.5.3 Quoziente metabolico (qCO₂)

Dalla respirazione del suolo è possibile calcolare interessanti indici del metabolismo microbico, quali il quoziente metabolico e il coefficiente di mineralizzazione endogena.

Il quoziente metabolico (qCO₂) rappresenta il tasso di respirazione per unità di biomassa microbica ed unità di tempo (Anderson & Domsch, 1993):

$$q\text{CO}_2 = \text{mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} * \text{C microbico}$$

Secondo la teoria di Odum (1969) sulla strategia di sviluppo degli ecosistemi, il tasso di respirazione per unità di biomassa si riduce, all'interno di un ecosistema, nel corso di una successione, in quanto il sistema tende ad ottimizzare l'uso delle risorse energetiche disponibili. In un sistema giovane c'è una minore competizione per accedere alle risorse e gli

organismi presentano una più bassa efficienza di utilizzazione delle risorse. Quando l'ecosistema evolve verso stadi più maturi, c'è una maggiore competizione per le risorse e la pressione selettiva favorisce gli individui che utilizzano le risorse con maggiore efficienza (Insam & Haselwandter, 1989). Il quoziente metabolico rappresenta una sintesi di questo concetto ed è stato applicato alle comunità microbiche del suolo; una riduzione del quoziente metabolico indica un miglioramento dell'efficienza di utilizzazione delle risorse da parte dei microrganismi (Insam & Haselwandter, 1989), mentre il suo aumento indica l'instaurarsi di condizioni di stress, poiché le cellule tendono in tal caso a consumare più energia per riparare i sistemi cellulari danneggiati (Anderson & Domsch, 1993). Inoltre in condizioni di stress i microrganismi consumano una quantità maggiore di energia per il mantenimento (Odum, 1985). Alcuni autori ritengono che il quoziente metabolico sia più sensibile ai cambiamenti ambientali rispetto sia alla respirazione che alla biomassa microbica (Anderson & Domsch, 1986).

4.5.4 Coefficiente di Mineralizzazione Endogena (CEM)

Il coefficiente di mineralizzazione endogena rappresenta la frazione di carbonio organico che viene mineralizzata a CO₂ nell'unità di tempo:

$$\text{CEM} = \text{mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} * \text{C organico}$$

Questo indice può fornire interessanti informazioni sul tasso di mineralizzazione della sostanza organica e sulla capacità potenziale del suolo di accumulare o dissipare carbonio.

Il tasso di respirazione della comunità microbica del suolo dipende dalle condizioni fisiche (umidità e temperatura) e chimiche (contenuto di sostanza organica) del suolo. In condizioni standard di laboratorio, non limitanti per i microrganismi, valori più elevati di respirazione, non associati ad un incremento di pari grado del contenuto di carbonio organico, si traducono in valori più elevati di CEM. Questo fenomeno potrebbe essere correlato all'instaurarsi di condizioni sfavorevoli per la comunità microbica. Infatti, in condizioni di stress, i microrganismi consumano una quantità maggiore di energia per il mantenimento (Odum, 1985) e quindi dissipano una maggiore frazione di carbonio organico.

4.5.5 Biomassa Fungina Totale

Una componente della biomassa microbica particolarmente sensibile alle variazioni delle condizioni del suolo è rappresentata dai funghi. Si tratta di una componente molto

abbondante nei suoli, circa 500 kg di biomassa fungina in un ettaro di suolo di media fertilità (Florenzano, 1983), che esplica differenti attività. Le specie saprofiti svolgono un ruolo fondamentale nella decomposizione della sostanza organica, degradando sostanze più recalcitranti, come la lignina; altre specie sono parassite delle piante o in grado di formare importanti rapporti simbiotici con le radici delle piante (micorrize). Il contenuto nel suolo della componente fungina rappresenta un buon indicatore della qualità del suolo poiché i funghi risultano particolarmente sensibili alle alterazioni chimico-fisiche dell'ambiente (Iovieno et al., 1996).

Le ife metabolicamente attive possono essere osservate al microscopio a fluorescenza dopo un trattamento con diacetato di fluoresceina (FDA), questo perché l'FDA è un substrato che mostra fluorescenza quando viene idrolizzato dagli enzimi cellulari.

La determinazione della biomassa fungina totale è stata effettuata secondo Olson (1950), con un metodo diretto che prevede la conta delle intersezioni delle ife fungine con un retino montato all'oculare di un microscopio. Questo tipo di misura non discrimina tra ife vive, metabolicamente attive e morte ma non decomposte. Un'aliquota nota di suolo fresco, 0,5 g e 50 ml di tampone fosfato (60 mM; pH=7,5) sono stati omogeneizzati in un mixer. Dalla miscela così ottenuta, sono stati prelevati 0.5 ml di sospensione per il suolo, a cui è stato aggiunta una soluzione di blu di anilina, capace di legare la chitina, una componente della parete cellulare del micelio fungino; il suddetto colorante non ha la capacità di discriminare tra le ife metabolicamente attive, inattive o morte e non ancora decomposte. Si lascia agire il colorante dopo circa 3 minuti, poi la miscela è filtrata sottovuoto con filtri in polipropilene (Millipore MF Back Filter) da 0.45 μm di porosità e 25 mm di diametro. I filtri colorati e asciugati vengono montati su vetrino con olio di cedro (Cargille, Type B) e osservati al microscopio ottico ad un ingrandimento di 40x. La conta delle ife sarà effettuata su una griglia del microscopio in venti campi di osservazione. Conoscendo le dimensioni della maglia del retino è possibile convertire il numero totale di intersezioni delle ife in lunghezza delle ife presenti su tutto il filtro, secondo Olson (1950). Dalle intersezioni tra le ife e le maglie del retino di dimensione nota si ricava la lunghezza del micelio fungino. La lunghezza delle ife è espressa in mm/g e viene moltiplicata per la sezione media dell'ifa ($9,3 \times 10^{-6}$) per ottenere il volume in mm^{-3}g e successivamente in peso secco, conoscendo la densità media delle ife ($1,1 \text{ g ml}^{-1}$) e sapendo che il peso secco di un'ifa rappresenta il 15% del peso fresco (Berg & Söderström, 1979).

La biomassa fungina totale è espressa come mg/g di peso secco ed eseguita in triplicato.

4.6 Campionamento di foglie

Negli ultimi anni si è affermato sempre di più il concetto che la gestione della fertilizzazione nelle colture arboree debba tener conto dello stato nutrizionale della pianta. Il raggiungimento e/o il mantenimento di un ottimale stato nutrizionale sono funzione non solo della fertilità fisica, chimica e biologica del terreno, ma anche dell'attività metabolica della pianta, della fisiologia della nutrizione e di tutte le tecniche colturali impiegate. Un indice dello stato nutrizionale delle piante è dato dall'analisi fogliare che rappresenta, senza dubbio, uno strumento di grande utilità, insieme con l'analisi del suolo. Purtroppo, l'utilizzo dell'analisi fogliare è spesso ostacolato dall'assenza di standard di riferimento attendibili per una corretta interpretazione dei dati analitici e ciò risulta particolarmente vero nel caso dell'olivo. Nonostante, infatti, i numerosi lavori scientifici riportati in bibliografia sulle problematiche connesse alla fertilizzazione dell'olivo, scarse sono le informazioni relative alla diagnosi dello stato nutrizionale di questa coltura (Tittarelli et al., 2002).

Nel 2012 e 2013 durante la stagione autunnale, simultaneamente al campionamento di suoli è stato realizzato quello delle foglie appartenenti alle differenti cultivar prese in esame per il presente progetto di dottorato. Allo scopo di prelevare dei campioni di foglie rappresentativi delle condizioni vegeto-produttive medie dell'oliveto, è stato ritenuto opportuno procedere all'individuazione di "aree o unità di campionamento" formate da parcelle omogenee per tessitura, fertilità, profondità del suolo, in cui le piante fossero uniformi. Sono state scartate le piante che presentavano anomalie vegetative, alterazioni genetiche, sintomatologie di virosi e attacchi parassitari. Da ciascuna "area di campionamento" si è ottenuto un prelievo standardizzato, scegliendo opportunamente nei diversi siti, campioni di foglie intorno all'intera chioma degli alberi, pienamente espanse e che non mostravano alterazioni, malformazioni o attacchi parassitari. Le piante da cui sono state prelevate le foglie sono state segnate in maniera tale da poter essere riconosciute l'anno seguente per il secondo campionamento. Si è cercato in tal modo di ridurre la variabilità dovuta al fattore pianta. Le foglie raccolte, sono state poste in sacchetti di polietilene, etichettati e subito collocati in un contenitore refrigerato. La refrigerazione è indispensabile

poiché riduce le perdite di sostanza secca, mentre la conservazione nei sacchetti di polietilene evita il disseccamento delle foglie.

Su un campione di 10 foglie, provenienti da differenti alberi per ciascuno sito, ad almeno 1,5 m dal suolo, sono state eseguite misure di: Area fogliare specifica (SLA); contenuto fogliare di materia organica secca (LDMC); tenore idrico delle foglie; contenuto idrico relativo delle foglie (RWC); contenuto in N e C per combustione attraverso gascromatografia (Elemental Analyser Flash 112 Series EA). I parametri (SLA; LDMC; RWC), sono stati determinati e calcolati secondo Cornelissen et al. (2003); l'area fogliare è stata calcolata mediante il software ImageJ 1.46 (Imaging processes and analyses in Java). Per il II anno di campionamento (2013), sono state effettuate anche misure di: fotochimica (Van Kooten et al., 1991; Schreiber et al., 1995).

4.7 Caratteristiche fogliari funzionali

Le caratteristiche rilevanti nel determinare la risposta dell'organismo all'ambiente e/o i suoi effetti sul funzionamento di un ecosistema, sono definiti come caratteri funzionali o "trait" (Lavorel et al., 1997). Negli ultimi trent'anni, l'interesse nell'approfondire i concetti di comunità (Grime, 1974; Petchey e Gaston, 2002; McGill et al., 2006) ed ecosistema (Chapin, 1993; Grime, 1998; Lavorel e Garnier, 2002; Eviner e Chapin, 2003), ha forzato il significato di "trait" oltre i suoi confini originari, spaziando dal livello di organismo a quello di ecosistema. Un'ulteriore complicazione è stata data dall'introduzione del concetto di carattere funzionale, "functional trait", un'espressione coniata *ex novo* con l'affermarsi dell'ecologia funzionale come disciplina (Calow, 1987; Keddy, 1992).

Violle et al. (2007), propongono allora una nuova definizione: "traits" sono tutti quei caratteri morfologici, fisiologici o fenologici misurabili a livello di singolo individuo, a partire dalla cellula fino all'intero organismo, senza riferimenti all'ambiente (fattori ambientali) o a qualsiasi altro livello di organizzazione (popolazione, comunità, ecosistema). Nell'ambito delle popolazioni di una specie, il "trait" può manifestare valori o modalità differenti lungo un gradiente ambientale o attraverso il tempo, caratterizzando così una determinata popolazione ad un dato tempo e spazio. Ad esempio, nelle specie vegetali come *Olea europaea* L., l'utilizzo di *soft traits* come la Superficie Fogliare Specifica (SLA) e l'altezza della pianta, si rivelano molto utili per conoscerne l'efficienza fotosintetica e l'abilità di competere per la luce (Weiher et al., 1999; Grime, 2001; Westoby et al., 2002). Negli ultimi anni, gli schemi

per descrivere le strategie delle specie, e le numerose liste di “functional traits” proposte, hanno enfatizzato l’utilità di una correlazione tra “traits”, sia per riuscire a dedurre i processi utilizzando strumenti facilmente misurabili, sia per cogliere le molteplici risposte ed effetti delle comunità sull’ecosistema, avendo a disposizione pochi caratteri (Hodgson et al., 1999).

4.7.1 Area Fogliare Specifica (SLA)

Caratteristica strutturale importante per definire la funzionalità fogliare è l’Area Specifica Fogliare (SLA). Tale parametro si esprime in cm² di superficie fogliare per grammo di peso secco (cm²/g) ed è stato calcolato secondo Cornelissen et al. (2003). Una volta raccolte le foglie in campo, esse vengono quanto prima possibile pesate per la determinazione del peso fresco. Le misure sono state effettuate su 10 foglie prelevate da ciascuno dei 3 alberi di ogni sito di campionamento. Una volta determinato il peso fresco, le foglie sono collocate e tenute in una stufa a 75°C per la determinazione del peso secco che solitamente viene raggiunto nell’arco delle 48 h. Una volta ottenuto il peso secco l’area fogliare specifica (SLA) viene calcolata come:

$$SLA \text{ (cm}^2\text{g}^{-1}\text{)} = (\text{area della foglia})/(\text{peso secco della foglia}).$$

4.7.2 Contenuto fogliare di materia organica secca (LDMC)

Insieme all’Area Specifica Fogliare (SLA), l’indice di densità tissutale (LDMC), rappresentano requisiti strettamente associati all’attività fotosintetica, ossia alla capacità di utilizzare le risorse e, quindi, alla velocità di crescita delle piante con relativa produzione potenziale di biomassa (Hunt e Cornelissen, 1997; Gulias et al., 2003; Poorter e Bongers, 2006). Il Tenore di Sostanza Secca nelle foglie (LDMC), è dato dal rapporto tra peso secco e relativo peso fresco del lembo fogliare, ed è considerato un indice di densità tissutale, in quanto indica la densità del tessuto della foglia stessa (Garnier & Laurent, 1994; Niinemets, 1999; Wright e Cannon, 2001; Shipley, 2002; Vile et al., 2005). Il *Leaf Dry Matter Content* (LDMC) in genere, è inversamente proporzionale all’Area Fogliare Specifica, infatti, foglie con elevato SLA presentano basso LDMC. Per la determinazione dell’indice di densità tissutale si segue la metodica di Cornelissen et al. (2003), quindi il peso a turgore per ciascuna foglia è ottenuto immergendo il picciolo in acqua e posizionando i campioni in camera fredda a 5°C. Dopo generalmente 48 ore di imbibizione, è stato constatato che il peso della foglia raggiunge il massimo turgore poiché il peso resta costante. In seguito alla misura del peso a

turgore la foglia viene collocata in una stufa a 75°C dove, dopo circa ulteriori 48h, raggiungerà il peso secco costante. Ottenuti tali valori di peso si procede alla determinazione del contenuto fogliare di materia organica secca:

$$\text{LDMC} = (\text{peso secco})/(\text{peso turgore})$$

Tale parametro è stato espresso come massa secca (g) su massa fresca di foglia portata a saturazione e calcolato su un campione di 10 foglie prelevate da ciascuno dei 3 alberi di ogni varietà genetica presa in esame.

4.7.3 Tenore idrico fogliare

Il tenore idrico fogliare è la quantità di acqua presente nella foglia al momento del campionamento. Per il calcolo del tenore idrico, è stato preso in considerazione un campione di 10 foglie come per le analisi precedenti. Le foglie appena raccolte sono state immediatamente pesate per evitare una sottostima del peso dovuta alla perdita di acqua dal tessuto fogliare; e successivamente messe ad essiccare in stufa a 75°C, fino al raggiungimento del peso costante. Dopo 48h sono state nuovamente pesate per la determinazione del peso secco. Il tenore idrico fogliare viene espresso in percentuale:

$$\text{T.I.}_{(\text{fogliare})} = [(\text{peso fresco} - \text{peso secco})/(\text{peso secco})]*100$$

4.7.4 Contenuto idrico relativo delle foglie (RWC)

Il contenuto idrico relativo (RWC) della foglia, fornisce una stima del grado di idratazione di un tessuto vegetale. In particolare, esprime il contenuto idrico di un tessuto rispetto alla sua massima capacità di trattenere acqua. Per il calcolo del Relative Water Content (RWC), le foglie prelevate e pesate, come descritto poc'anzi, sono state immerse, mediante i piccioli, in acqua contenuta in capsule di vetro. Prima dell'immersione in acqua, è stato eseguito un taglio trasversale alla base dei piccioli per evitare embolia all'interno della foglia. Dopo circa 48h i campioni sono stati nuovamente pesati al fine di determinarne il peso a turgore. Per essere sicuri del raggiungimento del massimo turgore, le foglie sono state pesate più volte ad intervalli di tempo crescenti finché il peso della foglia imbibita non è risultato costante. Infine, i campioni sono stati essiccati in stufa a circa 75°C, fino a peso secco costante. Tale parametro è stato espresso in % ed è stato determinato attraverso la seguente equazione:

$$\text{RWC} = [(\text{peso fresco-peso secco})/(\text{peso alla saturazione-peso secco})]*100$$

4.7.5 Contenuto di azoto e carbonio fogliare

La concentrazione di Azoto Fogliare, (LNC, Leaf Nitrogen Content), è pari alla quantità di azoto totale per unità di massa fogliare secca, espressa in g kg^{-1} . L'LNC è strettamente correlato con la velocità di assimilazione di CO_2 (Field & Mooney, 1986; Evans et al., 1989) e con la concentrazione dei composti azotati coinvolti nella fotosintesi, in particolare RuBP carbossilasi e clorofilla, (Niinemets, 1999; Reich et al., 1999; Paula & Pausas, 2006). Per questa ragione l'LNC, unitamente a SLA, può essere utilizzato nel calcolo dell'efficienza dei processi fotosintetici (Reich et al., 1997; Garnier et al., 1998). Inoltre, la concentrazione di azoto nelle foglie di una data specie sembra essere strettamente legata al variare della disponibilità di azoto presente nell'ambiente (Sabatè et al., 1995). Il contenuto delle foglie in C (LCC, Leaf Carbon Content) e N è stato determinato su 5 mg circa di campione secco e polverizzato, adoperando il C, N, S Analyzer (Flash EA1112 Series - EA). Per ogni campione di foglia sono state eseguite tre prove parallele. Le aliquote necessarie per le analisi sono state pesate in capsule di stagno ed inserite nell'analizzatore, come descritto precedentemente per il suolo per la determinazione di questi elementi. Un apposito software, gestito da un computer, collegato allo strumento, ha consentito di determinare, dagli spettri cromatografici ottenuti, i valori di C e N espressi come percentuale di campione secco.

4.7.6 Fotochimica

La fluorescenza si origina in vivo dalla clorofilla *a* del Fotosistema II (PSII). I pigmenti fotosintetici sono caratterizzati dalla presenza di doppi legami coniugati capaci di assorbire la PAR (Photosynthetically Active Radiation) e che possono eccitarsi e de-eccitarsi reversibilmente. Tali legami sono costituiti da elettroni π de-localizzati. Quando gli elettroni π sono allo stato fondamentale, non colpiti dalla luce, occupano i livelli a bassa energia; quando essi vengono colpiti da determinate lunghezza d'onda passano ad un livello eccitato. Lo stato eccitato dura molto poco poiché gli elettroni tendono facilmente a de-eccitarsi e a tornare allo stato fondamentale più stabile. Pertanto, lo stato e il grado di eccitazione del sistema fotosintetico possono essere monitorati *in vivo* e *in vitro* attraverso la fluorescenza.

La fluorescenza viene prima misurata in luce saturante (F_m) e minima (F_0), poi nelle condizioni prescelte, per determinare la fluorescenza variabile (F_v): quella quota di

fluorescenza che viene indotta da un eccesso di luce, o da uno stato ridotto dei chinoni. In base alla massima resa quantica del PSII (F_v/F_m) è possibile calcolare la porzione di centri di reazione realmente impegnati nella fotosintesi ed ottenere una valutazione quantitativa dello stress, in quanto c'è una relazione inversa fra l'entità di F_v e la quantità di centri di reazione attivi nella fotosintesi. Queste tecniche "non invasive" si prestano allo studio di un'ampia gamma di organismi permettendo nel tempo un'analisi diagnostica dello stato fisiologico della pianta (Alpi et al., 2000). La tecnica della fluorescenza si basa, quindi, sul fatto che la luce assorbita dalle molecole di clorofilla può subire tre diversi destini: essere utilizzata nella via fotochimica (dissipazione fotochimica); essere dissipata come calore (dissipazione termica); riemessa come fluorescenza. Questi tre processi avvengono in contemporanea nella cellula vegetale e dato che la loro somma rappresenta la percentuale totale del destino dell'energia assorbita, l'incremento di uno corrisponde al decremento degli altri due. Pertanto, determinare uno dei tre parametri, significa ricavare informazioni anche sugli altri due.

Nell'ambito di questa tesi di dottorato per poter analizzare tutti i campioni di foglie in uguali condizioni di luce, temperatura ed umidità, le misure di fluorimetria non sono state fatte in campo ma in laboratorio. Al momento del campionamento, sono stati tagliati alcuni rami in acqua per evitare fenomeni di embolia e trasportati in laboratorio. Quindi sono state condotte misure di fluorescenza su un campione di 5 foglie per ciascun albero con un fluorimetro a luce modulata (MiniPAM, Walz, Germany) ad un'intensità luminosa di $1000 \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Le foglie sono state previamente adattate ad una condizione di buio, per 30 minuti per misurare l'emissione di fluorescenza è minima (F_0). In questa condizione tutti i centri di reazione sono ipoteticamente capaci di convertire l'energia di eccitazione in lavoro fotochimico. Successivamente è stato applicato un flash di luce saturante (SAT-Pulse) di intensità tale da ridurre la catena di trasporto degli elettroni tra i due fotosistemi e privare il PSII dei suoi accettori. Dopo il pulse, l'energia assorbita non viene più utilizzata per il lavoro fotochimico ma viene dissipata tramite l'emissione di fluorescenza che raggiunge così il suo valore massimo (F_m). La differenza tra F_m e F_0 rappresenta la fluorescenza variabile al buio (F_v) ed il rapporto F_v/F_m indica la massima efficienza fotochimica del PSII in una foglia adattata al buio (Maxwell e Johnson 2000). Il rapporto F_v/F_m è un indice molto usato in ecofisiologia per valutare la potenziale efficienza fotochimica dei fotosistemi (Krause e Weis, 1991). In condizioni ottimali di crescita, la maggior parte delle specie vegetali presenta un

valore di F_v/F_m intorno a 0,83 (Johnson et al., 1993) che diminuisce significativamente in condizioni di stress.

In questo studio sono stati presi in considerazione, nella specie *Olea europaea* L., gli indici fotochimici: massima resa quantica del PSII (F_v/F_m); resa quantica del trasporto elettronico lineare del PSII (Φ PSII) e attività di trasporto elettronico (ETR). F_v/F_m è stato calcolato secondo Van Kooten et al. (1991), come:

$$F_v/F_m = (F_m - F_v)/F_m$$

Φ PSII è stato calcolato attraverso la seguente equazione (Schreiber et al., 1995):

$$\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_t)/F_m'$$

dove:

F_m' = fluorescenza massima alla luce, misurata in seguito a flash di luce saturante;

F_t = stato costante di fluorescenza alla luce.

L'attività di trasporto elettronico è stata calcolata come:

$$\text{ETR} = \Phi\text{PSII} \times \text{PFD} \times 0.5 \times 0.84$$

Dove PFD è la densità di flusso fotonico, il valore "0,84" rappresenta la percentuale media di luce incidente realmente assorbita dalla foglia e "0,5" il fattore che tiene conto dell'uguale ripartizione dell'energia tra i due fotosistemi (Maxwell & Johnson, 2000).

4.8 Campionamento di frutti

La raccolta dell'oliva deve avvenire quando essa è pienamente sviluppata, al punto giusto di inolizione e contenuto di antiossidanti, proprietà organolettiche migliori, prima della caduta dei frutti maturi, per permettere di raccogliere il maggior numero di olive per pianta, per avere la massima resa di olio e di migliore qualità: tale momento varia a seconda delle zone, della varietà di oliva e del clima. Alla luce di tali considerazioni, il campionamento di olive svolto per la determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche di questa matrice, è stato standardizzato per ciascun sito scelto, in modo da far risultare il campione casuale, rappresentativo e omogeneo. La raccolta dei campioni di olive nei diversi siti è stata effettuata intorno alla chioma di differenti alberi, gli stessi considerati per le foglie, scegliendo opportunamente, in ciascun punto di campionamento che è stato stabilito in maniera random, campioni di olive privi di evidenti segni di danni strutturali e che avevano raggiunto una completa maturazione (inolizione) e pigmentazione. In ogni oliveto e per ciascuna varietà sono state scelte piante omogenee per conformazione della chioma e carica dei frutti. Su ogni

campione di almeno 10 olive, provenienti da differenti alberi presenti in ciascuno dei siti presi in esame, sono state eseguite le seguenti misure: determinazione del rapporto polpa/nocciolo come descritto da Nergiz et al. (2000); determinazione del contenuto di umidità secondo Desouky et al. (2009); determinazione del contenuto di proteine totali nel nocciolo utilizzando il metodo Kjeldahl (Ajana et al., 1999); estrazione dei polifenoli totali dalla polpa modificato da Savarese et al. (2007) e conseguente dosaggio dei polifenoli totali secondo Hajimahmoodi et al. (2008); determinazione dell'attività antiossidante degli estratti metanolici della polpa di olive utilizzando il Frap *assay* secondo Fu et al. (2011).

4.8.1 Rapporto polpa/nocciolo

La determinazione delle caratteristiche carpologiche, quali: peso dell'oliva intera, peso del nocciolo, peso della polpa e rapporto polpa/nocciolo è fondamentale perché correlata non solo alla varietà ma anche all'ambiente di coltivazione ed allo stadio di maturazione (Sacchi, 2004). La determinazione del rapporto polpa/nocciolo è stata effettuata come descritto da Nergiz et al. (2000). Dopo essere stati raccolti, i frutti sono stati lavati, asciugati e pesati singolarmente. Per la separazione dal fresco, i frutti sono stati tagliati a metà orizzontalmente con un bisturi da laboratorio, in acciaio inox, e i noccioli sono stati posti in piastre Petri e pesati. Il contenuto di peso fresco è stato calcolato sottraendo il peso del nocciolo a tutto il peso dell'oliva. Il rapporto polpa/nocciolo è stato calcolato nel seguente modo:

$$\text{Polpa/nocciolo} = (\text{peso fresco polpa})/(\text{peso nocciolo})$$

Le analisi sono state eseguite su un campione random di 10 frutti per ciascuna cultivar.

4.8.2 Contenuto umidità

Il tenore idrico della polpa rappresenta il contenuto di acqua presente al momento del campionamento dei frutti. La determinazione del contenuto di sostanza secca nella polpa del frutto appartenente ad *Olea europaea* L. è stata eseguita secondo Desouky et al. (2009). In seguito alla raccolta, i frutti sono stati lavati, asciugati, tagliati a metà orizzontalmente con un bisturi da laboratorio e denocciolati. La polpa è stata posta in piastra Petri e messa in stufa a 75°C per circa 48 ore fino a raggiungimento del peso costante. Per ciascun campione sono state realizzate 10 repliche di laboratorio. La % di acqua nei frutti di *Olea europaea* L. è stata

determinata per differenza con la sostanza secca precedentemente calcolata nel modo seguente:

$$\text{Sostanza secca}_{(\%)} = [(100 * \text{peso netto secco}) / (\text{peso netto fresco})]$$

4.8.3 Proteine Totali

La determinazione del contenuto di proteine nella polpa e nel nocciolo di olive di *Olea europaea* L. è stata eseguita con il metodo di Kjeldahl, grazie al quale è stato calcolato il contenuto proteico dopo la determinazione dell'azoto totale (Ajana et al., 1999). Per più di 100 anni il metodo di Kjeldahl è stato utilizzato per la determinazione dell'azoto in una grande varietà di composti. Questa metodica viene utilizzata in molti campi, dal calcolo del contenuto di proteine in alimenti, bevande, carne, foraggi e cereali; alla determinazione dell'azoto in acque di scarico, terreni o altri campioni. È un metodo ufficiale e viene riportato in diverse normative come: AOAC, US-EPA, ISO, Farmacopee e varie Direttive Europee. Tale metodo viene utilizzato per determinare il contenuto di azoto sia in campioni organici che inorganici, miscelando il campione con acido solforico concentrato, portato a temperature elevate, insieme all'aggiunta di un catalizzatore. Si procede fino alla completa dissoluzione e alla ossidazione di tutto il materiale organico. Tutto l'azoto contenuto nel campione diventa Solfato d'Ammonio. Aggiungendo un eccesso di una soluzione di idrossido di sodio, lo ione ammonio passa ad ammoniaca libera che mediante distillazione si separa per evaporazione e la si raccoglie condensata in una soluzione di acido borico. L'ammoniaca viene così determinata una titolazione acido-base o per retro-titolazione con una soluzione a concentrazione nota.

Nello specifico, i campioni di polpa e noccioli, essiccati in stufa a 75°C per 48 ore, sono stati polverizzati mediante un polverizzatore (Fritsch, analysette 3 SpartanPulverisette, Voltage 200-240, Frequency 50-60 Hz) con biglia e pareti in agata. L'analisi, in particolare, si articola in tre fasi: mineralizzazione o digestione; distillazione; titolazione. Il tempo necessario alla determinazione del contenuto di proteine in un campione può variare in funzione del catalizzatore utilizzato (un catalizzatore è una sostanza chimica che pur non partecipando alla reazione abbassa l'energia di attivazione della stessa), del tipo di matrice sottoposta ad analisi e dalle quantità della stessa. In primo luogo, è stato pesato 1 grammo di ogni campione e dopo averlo introdotto in un provettone da laboratorio, è stato miscelato con 15 ml di acido solforico (H₂SO₄) concentrato al 98%, per i noccioli e 20 ml per le polpe dei campioni presi in

esame. A tale soluzione è stata aggiunta una pastiglia di catalizzatore (costituito da K_2SO_4 e Selenio). Successivamente, è stato disposto il provettone in un apparecchio di mineralizzazione, in cui il campione è stato riscaldato, portato ad ebollizione e tenuto ad alte temperature ($420^\circ C$) per circa 45 minuti. Al termine della digestione, la soluzione ottenuta è stata lasciata raffreddare e poi sono stati aggiunti 5 ml di perossido di idrogeno (H_2O_2) al 30%. Successivamente, tale soluzione è stata fatta riscaldare nuovamente, fino a quando ha assunto un colore verde brillante. Questo processo trasforma tutto il materiale organico in anidride carbonica ed acqua, tutti i sali in solfati, tutto l'azoto proteico contenuto nel campione di analisi viene quindi mineralizzato in solfato d'ammonio.

Nella fase successiva è stata predisposta l'apparecchiatura necessaria alla distillazione in corrente di vapore. Al prodotto ottenuto con la digestione viene aggiunto un eccesso di alcali per convertire il solfato di ammonio in ammoniaca. In questa seconda fase, in un pallone è stata versata acqua distillata e portata ad ebollizione. In un secondo pallone è stato introdotto il campione e sono stati aggiunti 50 ml di acqua distillata e 50 ml di idrossido di sodio (30%). Infine, è stata introdotta una beuta di raccolta con 25 ml di acido borico 1% (H_3BO_3 1%; m:v) e qualche goccia di una miscela di due indicatori, rosso metile/verde di bromo cresolo. I palloni sono stati poi collegati in modo da permettere l'introduzione di un getto di vapore acqueo nel pallone contenente il campione. In questo modo l'ammoniaca liberata dal campione è stata distillata in corrente di vapore. I vapori di ammoniaca sono stati raccolti nell'apposita beuta e hanno reagito quantitativamente con l'acido borico. La distillazione viene protratta fino a raccoglierne circa 100 ml. Nella terza ed ultima fase è stata calcolata la quantità di azoto presente nel campione a partire dalla quantità di ammoniaca della soluzione ricevente. In quest'ultima fase si titola l'eccesso di acido borico con una soluzione di acido cloridrico 0,1N, fino al viraggio del campione. Il contenuto di proteine nei campioni di noccioli e polpa di olive è stato misurato in triplicato, espresso in percentuale ed è stato calcolato applicando la seguente formula:

$$\text{Proteine } (\%) = (V * 0,14 * 6,25) / g$$

dove:

- V è riferito alla quantità di acido cloridrico 0,1N usata per la titolazione finale;
- 0,14 rappresentano i grammi di N titolati da 1 ml di HCl;
- 6,25 è il fattore di conversione per le proteine;
- g sono i grammi di campione sottoposto ad analisi (circa 1 g).

4.8.4 Lipidi Totali

L'estrazione di lipidi totali dai campioni di olive di *Olea europaea* L., presi in esame, è stata effettuata utilizzando il metodo di Folch del 1957. Questo metodo di estrazione è particolarmente indicato per qualsiasi tipo di indagine sulla componente lipidica in quanto permette l'estrazione dei lipidi totali finalizzata all'analisi qualitativa degli stessi e, nel contempo, può essere utilizzata per la determinazione quantitativa del grasso. Subito dopo la raccolta, le olive sono state lavate, asciugate e, dopo essere state denocciolate, la polpa è stata sminuzzata e omogeneizzata con Ultraturrax al fine di ottenere una pasta. In una beuta da 300 ml sono stati pesati 5 g dell'omogeneizzato e ad essi sono stati aggiunti 100 ml di miscela cloroformio/metanolo in rapporto 2:1. Per migliorare l'efficienza di estrazione, si tende a scegliere sempre un solvente organico a basso punto di ebollizione, in questo caso il punto di ebollizione della miscela cloroformio/metanolo in rapporto 2:1 è di poco superiore ai 60°C. La beuta contenente il campione e il solvente di estrazione è stata posta su piastra agitante a temperatura ambiente per 40-45 minuti. È stato poi realizzato un passaggio in centrifuga a 4500 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato recuperato con una pipetta Pasteur di vetro e versato in un imbuto separatore da 250 ml al quale sono stati aggiunti 100 ml di soluzione NaCl 0,9% . L'imbuto è stato agitato manualmente per qualche minuto, dopodiché sono state lasciate separare le due fasi, sopra la parte polare e sotto quella apolare, per circa un'ora. Successivamente la fase cloroformica (fase inferiore) è stata filtrata e raccolta in un pallone a fondo tondo da 250 ml. Nell'imbuto è stato posto un filtro di carta (filtro Whatman 40) e un cucchiaino di solfato di sodio anidro (Na₂SO₄). In seguito, sono state lavate le pareti dell'imbuto con il solvente di estrazione (cloroformio/metanolo 2:1), e utilizzando un rotavapor (Heildolph), un evaporatore rotante con bagno d'acqua calda e sotto vuoto della pompa ad acqua, settato a 100 rpm e 50-60°C, è stato recuperato il campione riposto in un pallone da 50 ml, di tara nota. Il campione, è stato, poi, posto in un essiccatore per favorire così l'evaporazione dell'acqua e l'eliminazione di eventuali tracce di solvente di estrazione trattenute dal campione. Il peso del campione è stato annotato dopo 24 h. Sono state realizzate tre repliche per ciascun campione ed il contenuto in lipidi totali è stato riportato come percentuale tramite la seguente formula:

$$\text{Lipidi totali } (\%) = [(\text{peso secco})/(\text{peso fresco})]*100$$

4.8.5 Estrazione e dosaggio di polifenoli totali dei frutti

Le olive sono una potenziale fonte di antiossidanti naturali; una caratterizzazione completa del profilo fenolico dell'oliva è ancora da definire (Savarese et al., 2007), in quanto è caratterizzato da una grande complessità e variabilità. La frazione fenolica della polpa di oliva ha dimostrato di essere costituita da glucosidi fenolici, flavonoidi, numerosi derivati dell'oleuropeina. L'importanza dei composti fenolici del frutto e dell'olio derivato da *Olea europaea* L. non è legata solo a proprietà nutrizionali ma anche a qualità sensoriali. L'estrazione dei polifenoli totali dalle olive è stata svolta utilizzando il protocollo modificato da Savarese et al. (2007). Sono stati pesati circa 2 g di polpa di oliva in Falcon da 50 ml, effettuando tre repliche per ciascuna cultivar. Alla polpa sono stati aggiunti 20 ml di una miscela metanolo/acqua (80:20 v/v). Il tutto è stato lasciato riposare per 30 minuti per poi essere omogeneizzato con Ultraturrax per almeno 2 minuti e poi agitato per circa 5 minuti con il Vortex in modo da risospendere più volte il preparato.

Il campione poi è stato centrifugato per 20 minuti a 4000 rpm per ottenere la separazione del miscuglio eterogeneo ottenuto fino a quel momento. Recuperato poi il surnatante, è stato disposto in un matraccio da 25 ml e lasciato poi in congelatore per circa 15 minuti. Per eliminare eventuali residui, l'estratto è stato filtrato con carta (filtro Whatman 40), dopodiché portato a volume con metanolo 80% nel matraccio da 25 ml ed infine conservato a -20°C per essere, poi, prelevato per effettuare il dosaggio dei polifenoli e il saggio per determinare l'attività antiossidante.

L'insieme dei composti fenolici viene ossidato dal reattivo di Folin-Ciocalteu. Questo è costituito da una miscela di acido fosfotungstico e acido fosfomolibdico che si riduce in una miscela di ossidi blu di tungsteno e molibdeno, grazie all'ossidazione dei fenoli. La colorazione blu prodotta ha un massimo di assorbimento intorno a 750 nm.

Il dosaggio dei polifenoli totali nei campioni di oliva è stato eseguito secondo il metodo proposto da Hajimahmoodi et al. (2008), sugli estratti preparati in precedenza. In un matraccio da 5 ml, sono stati introdotti: 20 µl di campione ottenuto dall'estrazione; 1,5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu, reattivo utilizzato in chimica analitica per la determinazione dei fenoli e dei polifenoli, diluito 1:10 in H₂O; 1,5ml di Na₂CO₃ al 6% (m/v) in acqua; il tutto viene portato a volume con H₂O distillata. La miscela di reazione, così preparata, è stata incubata al riparo dalla luce per 90 minuti, a temperatura ambiente ed è stata, successivamente, effettuata una lettura a 725 nm allo spettrofotometro UV/Vis (mod. DU 730,

Beckman Coulter). Le letture sono eseguite in duplicato. Il contenuto di polifenoli totali è espresso in riferimento ad una retta di calibrazione costruita con una molecola standard, ovvero acido gallico che è tra le sostanze fenoliche più abbondanti in natura. Sono preparate soluzioni del suddetto standard alle concentrazioni comprese da 25 a 150 mg/L. I valori delle assorbanze lette per ogni campione vengono interpolate sulla retta di taratura per l'acido gallico che presenta sei punti. I risultati finali sono espressi, per ciascun campione, come mg acido gallico equivalenti / 100 g peso fresco.

4.8.6 Saggio FRAP

Il saggio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) misura direttamente l'abilità dell'antiossidante di ridurre il complesso ferrico della tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) a complesso ferroso colorato (Fe^{2+} -TPTZ) a bassi valori di pH (Benzie & Strain, 1996). La reazione viene monitorata misurando spettrofotometricamente il cambiamento di assorbanza della soluzione blu a 593 nm (Muggia et al., 2006). Il FRAP test è usato frequentemente per valutare l'attività antiossidante di vari frutti, vegetali e alcuni campioni biologici (Hajimahmoodi et al., 2008).

Il saggio FRAP è stato effettuato secondo il procedimento descritto in letteratura da Fu et al. (2011). Il reagente FRAP è stato preparato con un soluzione di buffer acetato di sodio (300 mM, pH=3,6); una soluzione 10 mM di TPTZ (2,4,6 tripiridil-s-triazina) in HCl 40 mM (come solvente) e una soluzione di cloruro di ferro (III) 20 mM. Il reagente FRAP è, quindi ottenuto dalle tre soluzioni miscelate rispettivamente nel rapporto 10:1:1. Il reagente FRAP è stato preparato fresco quotidianamente e riscaldato a 37 °C in un bagno di acqua prima dell'uso. Dopodiché, 100 µl del campione diluito 1:10, in acqua distillata, sono stati aggiunti a 3 ml di reagente FRAP. L'assorbanza della miscela è stata misurata a 593 nm usando uno spettrofotometro UV-Vis dopo 4 minuti e le letture sono state effettuate in duplicato. La curva standard è stata costruita usando una soluzione di FeSO_4 ; i risultati sono stati espressi come $\mu\text{mol Fe}_{(\text{II})} / \text{g}$ di peso fresco del frutto.

4.9 Olio

Il campionamento delle drupe di *Olea europaea* L. è stato realizzato in modo che una parte di esse potessero essere destinate all'estrazione dei relativi oli vergini di oliva.

Da ciascun campione di olive, provenienti dai differenti alberi in ciascuno dei siti presi in esame, è stata riprodotta, a livello sperimentale, l'estrazione meccanica dell'olio grazie ad un frantoio "Abencor" da laboratorio come riportato da Paz Aguilera et al. (2005) e da Hachicha Hbaieb et al. (2015). L'estrattore Abencor (Comercial Abengoa, SA, Siviglia, Spagna) simula il processo industriale della produzione di olio vergine di oliva (VOO) su scala di laboratorio (Martínez et al., 1975). La fresatura delle olive è stata effettuata utilizzando un mulino a martelli in acciaio inox, operativo a 3000 rpm provvisto di un setaccio 5 mm. La gramolazione è stata effettuata per 30 minuti con un termo battitore Abencor funzionante a 30°C. La centrifugazione della pasta gramolata è stata eseguita in una centrifuga a 3500 rpm per 1 min. Dopo centrifugazione, gli oli sono stati decantati e filtrati con carta. Poi, gli oli sono stati trasferiti in bottiglie di vetro scuro, e conservati al buio a -20°C fino al momento delle analisi.

Una volta ottenuti gli oli provenienti da ciascuna cultivar sono stati determinati gli indici di qualità (acidità libera, numero perossidi e indici spettrofotometrici), per l'attribuzione della categoria merceologica ad un olio di oliva, dettati dal Reg. CEE 2568/91 e successive modifiche (Reg. CE 1989/03). È stata inoltre, effettuata l'estrazione secondo Montedoro et al. (1992) e il dosaggio di polifenoli totali secondo la procedura descritta da Del Caro et al. (2006). Infine, per il campionamento dell'anno 2013 è stata effettuata la determinazione del contenuto in carotenoidi e clorofille per spettrofotometria secondo il metodo proposto da Mincione et al. (1996).

4.9.1 Determinazione degli indici di qualità

Con il termine "qualità" si intende "l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite del consumatore" (Peri, 1995; Magli & Rotondi, 1998).

I parametri di qualità per l'attribuzione della categoria merceologica ad un olio di oliva vergine sono dettati dal Reg. CEE 2568/91 e successive modifiche (Reg. CE 796/02; Reg. CE 1989/03) (Tab. 4.1).

Tabella 4.1: Parametri di qualità per la classificazione degli oli vergini d'oliva (Reg. CE 1989/03).

Categoria	Acidità	Perossidi	Indici Spettrofotometrici		
			K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK
Vergine Extra	≤ 0.8	≤ 20	≤ 2.5	≤ 0.22	≤ 0.01
Vergine	≤ 2.0	≤ 20	≤ 2.6	≤ 0.25	≤ 0.01
Lampante	≤ 2	-	-	-	-

Acidità libera

La misura dell'acidità è la più antica determinazione utilizzata per la valutazione della qualità dell'olio e per la sua classificazione merceologica. Questo parametro fornisce elementi utili per valutare lo stato di degrado dell'oliva prima dell'estrazione e della struttura dell'olio (trigliceride); i trigliceridi dell'olio, infatti, si degradano a seguito dell'azione di un enzima, la lipasi, che si trova nell'oliva ed esercita la sua attività all'interno del frutto, dopo la raccolta, se questo ha subito lesioni cellulari. La lipasi, in presenza di acqua, idrolizza il legame esistente tra l'acido grasso ed il glicerolo, producendo acidi grassi liberi che costituiscono l'acidità libera dell'olio. La determinazione degli acidi grassi liberi nell'olio viene effettuata attraverso titolazione acido-base.

La misura dell'acidità è stata effettuata secondo il protocollo stilato dalla Comunità Europea (Reg. CE 796/02; Reg. CE 1989/03).

Per la misura dell'acidità libera sono stati pesati circa 5g di olio a cui sono stati aggiunti 50 ml della miscela etere/etanolo in rapporto 1:1, e 2 gocce di fenolftaleina 1%. Mantenendo la miscela in agitazione si effettua la titolazione, fino al viraggio dell'indicatore, con KOH 0.1M. L'acidità totale è stata effettuata in duplicato ed espressa come % acido oleico, calcolata secondo la seguente formula:

$$\text{Acido Oleico} = (V \cdot C \cdot M) / (10 \cdot m)$$

dove :

V = volume in ml di soluzione Titolante utilizzata;

C = concentrazione M di soluzione Titolante utilizzata;

M = peso molecolare dell'acido oleico (282);

m = peso in grammi del campione analizzato.

Il valore di riferimento secondo il Reg. CE n° 1989/03 per l'olio extravergine di oliva è:
Acidità $\leq 0.8\%$ acido oleico.

Numero Perossidi

I perossidi sono i prodotti primari dell'autossidazione dei lipidi, quando la loro concentrazione è elevata essi reagiscono tra di loro dando origine a una serie di composti spesso volatili che forniscono lo sgradevole aroma di rancido. Il numero di perossidi misura, sostanzialmente, lo stato di ossidazione primaria degli acidi grassi. Questo parametro, determinato sull'olio appena prodotto, fornisce un'indicazione dello stato sanitario e di degrado dell'oliva. Il doppio legame tra gli atomi di carbonio è responsabile dell'ossidazione dell'olio da parte dell'ossigeno con formazione di perossidi o idroperossidi, molecole decisamente instabili che si decompongono in prodotti di ossidazione secondari, quali aldeidi e chetoni, responsabili del difetto di rancido.

Quest'indice merceologico è stato determinato in duplicato, secondo il Reg. CE 1989/03. Per la determinazione del numero dei perossidi, a 1g di olio vengono aggiunti 25 ml della miscela acido acetico e cloroformio nel rapporto 3:2, e 1,0 ml di soluzione satura di ioduro di potassio (KI). La miscela è lasciata per 5 minuti al riparo dalla luce e a temperatura ambiente. Poi si diluisce con 75 ml di acqua distillata e si procede subito alla titolazione con tiosolfato di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01N, usando come indicatore la salda d'amido (500 μl), che in presenza di I_2 si colora di azzurro. Infine, si annota il volume di soluzione di tiosolfato utilizzato.

Il numero di perossidi è espresso come milliequivalenti di ossigeno su chilogrammo di olio (meqO_2/Kg olio) ed è dato da:

$$\text{Numero Perossidi} = (V \cdot C \cdot 1000) / m$$

dove:

V = volume (ml) di soluzione titolante di tiosolfato di sodio usato;

C = concentrazione della soluzione titolante;

m = massa del campione espressa in grammi.

Indici spettrofotometrici

L'olio d'oliva contiene circa il 70-80% di acido oleico, che è un acido grasso monoinsaturo con un solo doppio legame in corrispondenza del carbonio 9 e il 4-12% di acido linoleico, biinsaturo, con due doppi legami in corrispondenza del carbonio 9 e del carbonio 12. La presenza di questi acidi grassi insaturi, normali costituenti di un olio di qualità, determina fenomeni di assorbimento di radiazioni con lunghezza d'onda inferiore a 200 nanometri (nm).

Se l'olio d'oliva viene sottoposto a trattamenti di rettificazione chimici e/o fisici si ha la formazione di apprezzabili quantità di acidi grassi poliinsaturi contenenti doppi legami coniugati, cioè doppi legami alternati a legami semplici.

La presenza di questi acidi grassi poliinsaturi determina un assorbimento di radiazioni aventi lunghezza d'onda variabile da 200 a 350 nm: in particolare a 232 nm i dieni (due doppi legami coniugati, cioè alternati a due legami semplici) presentano un maggiore assorbimento, mentre i trieni (tre doppi legami coniugati) assorbono a 270 nm e tetraeni (quattro legami coniugati) a 300 nanometri.

L'analisi dei fenomeni di assorbimento delle radiazioni, effettuata con uno spettrofotometro, permette di accertare rapidamente se l'olio è vergine o è miscelato con oli raffinati: la sensibilità del metodo è tale che anche la sola addizione del 5% di rettificati viene accertata immediatamente. La determinazione degli indici spettrofotometrici nell'ultravioletto è stata effettuata secondo il Reg. CE 1989/03. Si prepara una soluzione di olio all'1% (p/v), usando come solvente l'iso-ottano puro. In laboratorio sono stati pesati 0,25g di campione in un matraccio tarato da 25 ml e portati a volume con iso-ottano. I campioni sono stati analizzati in cuvette di quarzo (percorso ottico 1 cm) usando uno spettrofotometro UV/Vis (mod. DU 730 Beckman Coulter), misurando le assorbanze alle seguenti lunghezze d'onda di: 232nm, 262nm, 268nm, 270nm, 274nm. Le letture sono state effettuate in duplicato ed è stato utilizzato iso-ottano come bianco. Eseguite le letture si determina il cosiddetto valore di K_λ detto «estinzione specifica», che rappresenta l'assorbimento di una soluzione all'1% della sostanza in esame, quando la radiazione l'attraversa per uno spessore di 1cm. Esso si determina con la seguente espressione:

$$K = A/(C * s)$$

dove:

A = l'assorbanza alla determinata lunghezza d'onda;

C = la concentrazione della soluzione in g/100 ml (p/v);

s = lo spessore in cm della cuvette di quarzo.

È importante determinare anche il ΔK che esclude l'assorbimento "estraneo di fondo" dando così l'assorbimento reale. Esso è ricavato con la seguente formula:

$$\Delta K = [K_{268} - (K_{262} + K_{274})]/2$$

4.9.2 Estrazione e dosaggio dei polifenoli totali

Accanto agli indici di qualità ufficiali, che consentono di attribuire ad un olio la categoria merceologica, è possibile ricorrere a parametri analitici non ufficiali allo scopo di caratterizzare in maniera più completa questo prodotto dal punto di vista qualitativo. Informazioni utili sulla qualità di un olio possono essere fornite, infatti, dal contenuto e dalla composizione dei composti fenolici, che ne influenzano il profilo organolettico, la stabilità dell'ossidazione e la qualità nutrizionale. Le sostanze fenoliche hanno un'importanza notevole nella determinazione della qualità di un olio in quanto, non solo determinano la qualità organolettica contribuendo al fruttato (nota amaro-piccante) ma, essendo molecole antiossidanti, contribuiscono alla stabilità e conservabilità dell'olio.

Il carattere amaro-piccante è dovuto ad alcune sostanze derivanti dalla parziale idrolisi dell'oleuropeina, molecola naturalmente presente nell'oliva; la loro ulteriore idrolisi nel corso della maturazione porta alla formazione di fenoli semplici che hanno un ridotto carattere amaro.

La componente fenolica è costituita da due diverse frazioni: una semplice ed una complessa, idrolizzabile. La prima frazione è rappresentata quasi interamente dal p-idrossifeniletanolo (tirosolo) e dal 3,4-diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo). La seconda frazione, che è molto più abbondante, è formata da strutture complesse come gli agliconi del ligstroside, che contengono il tirosolo, e gli agliconi dell'oleuropeina, che contengono l'idrossitirosolo oltre ai lignani, pinoresinolo e 1-acetossipinoresinolo, vi sono altri composti non identificati.

I polifenoli totali sono stati estratti facendo riferimento al protocollo sperimentale di Montedoro et al. (1992), che prevede le seguenti fasi: sono stati pesati 10 grammi di olio e posti in un tubo da centrifuga da 50 ml; a questi sono stati aggiunti 10 ml di solvente di estrazione composto da una soluzione di metanolo e acqua in rapporto 80:20 (v:v). Si agita al vortex per 5 minuti, dopodiché i campioni sono stati centrifugati a 5000 rpm per 10 minuti. Si formano due fasi, si recupera il surnatante e lo si pone in un matraccio tarato da 50 ml.

L'estrazione dell'olio è stata ripetuta con 10 ml di solvente per altre due volte. I surnatanti vengono riuniti nel matraccio tarato da 50 ml e al termine della terza estrazione i campioni vengono posti in congelatore per 15 minuti a -20°C. Dopodiché ciascuna soluzione è filtrata per eliminare le eventuali tracce di olio rimaste, e poi, portata a volume con la soluzione di estrazione. In seguito, l'estratto è posto in congelatore a -20 °C, al riparo dalla luce, per essere, poi, prelevato per effettuare il dosaggio dei polifenoli. Le estrazioni sono state eseguite in duplicato.

Il contenuto dei polifenoli totali nei campioni di olio extravergine d'oliva è stato eseguito, per la prima volta, secondo il metodo colorimetrico Folin-Ciocalteu proposto da Singleton & Rossi (1965).

Il presente progetto di dottorato, ha previsto che il dosaggio dei polifenoli totali fosse eseguito secondo il protocollo sperimentale riportato da Del Caro et al. (2006), sugli estratti preparati in precedenza. In un matraccio tarato da 5 ml sono posti: 200 µl di estratto metanolico, al quale vengono aggiunti 2 ml di reagente di Folin-Ciocalteu diluito in acqua 1:10 (v:v), e successivamente, dopo circa 3 minuti, 1,8 ml di carbonato di sodio (Na₂CO₃) 7,5 % in acqua (m/v) e infine si porta a volume con acqua distillata. I campioni vengono posti al buio e a temperatura ambiente per 90 minuti e in seguito si effettua la lettura spettrofotometrica a 760 nm, con spettrofotometro UV/Vis (mod. DU 730, Beckman Coulter). Le letture sono state eseguite in duplicato. Il contenuto di polifenoli totali è espresso in riferimento ad una retta di calibrazione costruita con una molecola standard, ovvero acido gallico. I risultati sono espressi come mg GAE (mg acido gallico equivalenti)/ kg olio.

4.9.3 Carotenoidi e Clorofille

Gli oli extravergini di oliva devono la loro colorazione ai pigmenti naturali che vengono estratti dal frutto durante il processo di trasformazione. I pigmenti naturali, carotenoidi e clorofille, contribuiscono al colore dell'olio (Minguez-Mosquera et al., 1991) che è uno dei fattori che influenza la selezione da parte dei consumatori ed è quindi considerato come un parametro di qualità dell'olio (Issaoui et al., 2009).

Nel presente studio è stata effettuata la determinazione del contenuto in carotenoidi e clorofille secondo il metodo proposto da Mincione et al. (1996).

La determinazione del contenuto in caroteni è stata effettuata per spettrofotometria. In particolare, il campione di olio pari a grammi 2,5 è stato sciolto in 25 ml di isoottano per

spettrofotometria, misurando l'assorbanza a 436 nm. Tale assorbanza specifica è stata comparata con una curva di taratura ottenuta misurando l'assorbanza specifica di soluzioni a concentrazione nota di β -carotene in isoottano.

La misura quantitativa della clorofilla è stata effettuata in modo analogo a quanto indicato per la determinazione dei caroteni, leggendo l'assorbanza a 670 nm e raffrontandola ad una curva di taratura ottenuta con clorofilla solubile in olio. Le letture sono state effettuate in duplicato.

4.10 Analisi statistica

Per le quattro matrici di studio (suolo, foglie, frutti e oli) i dati riportati sono medie delle 3 repliche di campo, per ciascuna delle quali sono state realizzate 3 repliche di laboratorio. La variabilità è riportata come errore standard. Per ciascun parametro determinato per il suolo è stata saggiata la significatività delle differenze tra i diversi siti e le diverse profondità del profilo, con l'Analisi della Varianza (Two Way ANOVA) seguita dal Tukey test mediante il software Sigma Plot 12.0 (Systat Software, Inc.). Per le foglie, i frutti e gli oli, la significatività delle differenze fra siti e cultivar è saggiata con l'Analisi della Varianza, in particolare One Way ANOVA. Invece per ciascun parametro determinato a Licosa è stata saggiata la significatività delle differenze tra i siti grufolati e quelli non sottoposti all'azione del cinghiale mediante Student-t test ($P < 0.05$) utilizzando il software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc.).

È stata, infine, realizzata un'analisi di ridondanza (RDA) per verificare le relazioni tra alcune proprietà chimico-fisiche e biologiche dei suoli indagati, utilizzate come variabile indipendente e alcune caratteristiche delle foglie, dei frutti e degli oli, utilizzate come variabili dipendenti. Un test di permutazione (199 permutazioni) e il Monte Carlo test sono stati effettuati al fine di valutare l'importanza delle relazioni tra le variabili dipendenti e vincolanti utilizzate nell'RDA. Le analisi RDA sono state eseguite utilizzando il pacchetto CANOCO 4.5.

Capitolo 5. Risultati e discussione

Suolo

Il suolo agrario non deve essere considerato un semplice supporto colturale ma, piuttosto, un'entità naturale in equilibrio con le piante. Tutte le informazioni che sono in grado di definire le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo e che concorrono a determinare il suo stato di fertilità, debbono essere inserite in un quadro analitico più ampio; la disponibilità e l'assunzione degli elementi nutritivi e dell'acqua sono largamente condizionate dalle dinamiche (chimica e biologica) del suolo e da fattori esterni, quali, ad esempio, le pratiche agronomiche (tipo di lavorazione del suolo, fertilizzazione, sistemi irrigui, ecc.) e le condizioni climatiche (piogge, umidità, radiazioni, venti, temperature). Di conseguenza, soprattutto quando si desidera valutare l'attitudine produttiva di un terreno agrario e, quando si vuole esaltarla attraverso le pratiche agronomiche, la conoscenza delle caratteristiche chimico-fisiche e biologiche del suolo riveste un'importanza particolare (Cimato et al., 2002). Il terreno agrario, può essere considerato e studiato come "entità naturale", più o meno modificata dall'azione antropica, che possiede una propria storia, un'organizzazione, una tendenza evolutiva e un insieme di proprietà (*Land Qualities*) in grado di garantire alle piante ospitalità e rifornimento di nutrienti per permetterne lo sviluppo e una costante attività produttiva (Cimato et al., 2002).

Allo scopo di migliorare la comprensione e la descrizione dei fattori che influenzano la perdita dell'agrobiodiversità e l'effetto che tale perdita può avere sulla qualità degli alimenti, sono state analizzate le principali caratteristiche di suoli, piante, frutti e oli di diverse cultivar italiane di *Olea europaea* L. Essendo noti, gli effetti benefici degli oli vergini di oliva sulla salute umana, l'attenzione è stata focalizzata verso l'identificazione di tecniche e protocolli per il miglioramento della qualità alimentare, incrementando le conoscenze inerenti le relazioni esistenti tra suolo, cultivar e qualità di un olio vergine di oliva.

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi chimico-fisiche e biologiche sui campioni di suolo di uliveti appartenenti alle varietà *Pisciottana*, *Ortice*, *Ravece*, *Frantoio* e *Moraiolo*.

5.1 Parametri chimico-fisici del suolo

Negli ultimi anni, con l'intensificazione dei sistemi agricoli si sta assistendo ad una diminuzione del livello di biodiversità soprattutto nel Mediterraneo; questo perché vengono utilizzate sempre le stesse varietà genetiche, ritenute anche le più produttive. Di conseguenza, per gli agroecologi risulta imprescindibile effettuare un riesame delle relazioni suolo-pianta soprattutto nell'ambito di specie autoctone e produttive come l'*Olea europaea* L., dalla quale si ottiene il prodotto che si può definire "il protagonista" della Dieta Mediterranea, ossia l'olio extravergine di oliva. L'influenza della qualità di un suolo e del suo stato di salute sulla vegetazione ad esso connessa è nota da tempo, così come le relazioni tra questo comparto e molti prodotti utilizzati nell'alimentazione umana. Ancora molto carenti risultano, invece, le informazioni che riguardano l'influenza del tipo di suolo sulla qualità di un olio extravergine di oliva (EVOO), sebbene alcune relazioni specifiche tra i parametri qualitativi di un olio e le caratteristiche del suolo sono state riportate da alcuni autori (Angerosa et al., 1996 a; Ranalli et al., 1997).

Per evidenziare la qualità e lo stato di salute dei suoli appartenenti a uliveti di diverse cultivar endemiche dell'Italia centro-meridionale (*Pisciottana*, *Ortice*, *Ravece*, *Frantoio* e *Moraiolo*) è stata effettuata prima di tutto una caratterizzazione chimico-fisica.

Nella caratterizzazione chimico-fisica dei suoli appartenenti a differenti cultivar di *Olea europaea* L., importante è la valutazione della Capacità Idrica Massimale che rappresenta la capacità del suolo di trattenere acqua contro la forza di gravità e mostra per la varietà *Ravece* (Tab. 5.1), i valori più elevati sia per l'anno 2012 (34,83%), che per il 2013 (39,16%). Questo dato statisticamente significativo ($P < 0,05$), può far supporre una maggiore capacità di questi suoli di trattenere acqua indipendentemente dalle condizioni ambientali ed è possibile correlarlo ad altre caratteristiche del suolo. In generale, è il suolo umbro ad avere i più bassi valori di CIM, anche se per nessuno dei suoli indagati i valori scendono al di sotto del 20%, divenendo limitanti. Nonostante questo parametro sia costitutivo, una certa variabilità è stata riscontrata nei campionamenti degli anni 2012 e 2013. Il secondo anno ha mostrato generalmente i valori più alti (Tab. 5.1) di CIM, con la sola eccezione del suolo sotto *Frantoio*, nell'uliveto di Perugia, che mostra andamento inverso. Inoltre, per l'autunno 2013, il sito di Pisciotta ha il valore di CIM significativamente più elevato rispetto a Licosa (Tab. 5.2), così come l'uliveto misto di Assisi rispetto a quello di Perugia; questo potrebbe suggerire l'influenza dell'ambiente e quindi del sito diverso ove è avvenuto il

campionamento, e non della varietà genetica che invece, è la stessa. Situazione invertita per tali siti è risultata quella registrata per l'anno di campionamento successivo.

Parametro correlato con la CIM è il tenore idrico (%), ossia il contenuto di acqua al momento del prelievo che dipende dalle condizioni climatiche che precedono il campionamento. Il contenuto di acqua (Tab. 5.1) è sempre abbastanza elevato probabilmente anche perché i prelievi sono fatti nel periodo autunnale. Analogamente a quanto registrato per la CIM, dai dati sperimentali ottenuti confrontando i suoli sotto le diverse cultivar prese in esame, è risultato che sia per l'autunno 2012 che per il 2013 (Tab. 5.1), i valori significativamente più alti ($P < 0,005$) sono stati osservati sotto la varietà *Ravece*. Tale varietà, ha registrato i valori più alti rispetto a tutte le altre cultivar sia per la profondità 0-15cm (28,15% per il 2012; 28,88% per il 2013) che per quella 15-40cm (24,92% per l'anno 2012; 27,25% per l'anno 2013). In particolare, per entrambe le profondità si osserva un valore più alto di contenuto idrico nell'autunno 2013, ciò in relazione alla maggiore quantità di precipitazioni registrate per questo anno di campionamento in tale sito.

La cultivar *Pisciottana*, cresciuta a Licosa (Tab. 5.2), ha registrato valori di contenuto idrico generalmente più alti anche se non sempre statisticamente differenti, rispetto al sito di Pisciotta. Non sono per questo sito evidenti grandi differenze sul contenuto di acqua misurato nei suoli per l'anno 2012 e per il 2013. Le cultivar umbre, invece, hanno contenuti idrici più elevati per il 2012, nell'uliveto misto di Assisi, mentre per il 2013 negli uliveti puri appartenenti alle cv. *Frantoio* e *Moraiolo* di Perugia. Ciò potrebbe suggerire l'influenza del regime termo-pluviometrico dei siti specifici, strettamente correlato alla misura di tale parametro. L'analisi ANOVA anche in questo caso non ha rilevato differenze statisticamente significative.

Tutti i processi che avvengono nel suolo sono sensibili al pH. Il pH è un fattore che condiziona la presenza di microorganismi e piante, selezionando spesso le specie presenti in un suolo. Il pH del suolo è importante dal punto di vista nutrizionale delle piante non solo perché ne influenza l'assorbimento dei nutrienti ma anche perché condiziona la loro disponibilità (Bullini et al., 1998). I risultati ottenuti nel corso di questo progetto di dottorato hanno rilevato un range di pH che, secondo quanto riportato dalla classificazione dell'USDA (USDA - United States Department of Agriculture, 1993), può essere considerato da neutro per i suoli cilentani, a subalcalino per i suoli sotto le cv. *Ravece* e *Ortice*, ad alcalino per quelli umbri (Tab. 5.1; Tab. 5.2). Il campionamento del 2013, inoltre, ha fatto registrare valori

di pH tendenzialmente più alcalini in tutti i suoli analizzati. Tali intervalli di pH, subalcalini e alcalini, sono caratteristici di suoli di uliveti e sono in accordo con quanto riportato da Aranda et al. (2011); Chatzistathis et al. (2010); Leone et al. (2013) e Zornoza et al. (2008). Lo studio di Chatzistathis et al. (2010), ha avuto come scopo quello di indagare come un tipo di suolo di uliveti può influenzare la variazione e concentrazione di nutrienti in piante di ulivo. Tuttavia, Chatzistathis et al. (2010), affermano che le differenze chimico-fisiche dei suoli di uliveti non sono necessariamente un fattore cruciale che provoca differenze significative durante la crescita della pianta, la quale è condizionata secondo gli autori, non solo dai fattori pedologici ma anche e in alcuni casi in misura maggiore da quelli ambientali, come la temperatura e il fotoperiodo.

I dati sperimentali acquisiti nel corso di questo progetto risultano confrontabili con il range di valori di pH osservati da Leone et al. (2013), sotto la varietà *Ortice*, che va da 6.8 a 8.5. Questo lavoro simile a quello di questo elaborato di ricerca ha evidenziato l'influenza delle caratteristiche pedo-ambientali del territorio Beneventano sulla qualità dell'olio di oliva di tale cultivar autoctona. Facendo anche per questo parametro un confronto tra siti diversi caratterizzati dalla stessa cultivar è evidente che differenze significative ($P < 0,05$; Tukey test) sono riscontrate tra i valori di pH dei suoli di Licosa e Pisciotta sotto la cv. *Pisciottana* (Tab. 5.2). Infatti il pH del suolo di Licosa risulta essere meno alcalino in entrambi gli anni considerati. Questo risultato può essere associato al diverso regime pluviometrico delle due località con Licosa più piovoso di Pisciotta ma anche alla diversa situazione sperimentale dei due siti. Licosa, infatti, è un sito continuamente interessato da sovrappascolo di cinghiale che determina forti variazioni nelle caratteristiche e nei processi del suolo. Non a caso il pH sotto il suolo di Licosa può essere associato alle deiezioni della fauna selvatica, tra cui appunto il cinghiale, presente in questa specifica area di campionamento.

La sostanza organica assume un ruolo estremamente importante nel definire la fertilità globale di un terreno. Il suo contenuto nel suolo, infatti, è un potenziale indicatore ambientale in quanto si correla con numerosi aspetti della produttività e sostenibilità degli agroecosistemi e della conservazione ambientale (Smith et al., 2000). In generale, alla presenza di elevate quantità di sostanza organica nel suolo vengono attribuiti molteplici benefici; tuttavia sono stati evidenziati anche alcuni impatti negativi a livello ambientale o di produttività, da valutarsi nell'ambito di contesti e processi specifici (Soicha et al., 1999).

Per il contenuto di sostanza organica si registrano valori significativamente differenti tra i suoli sotto le diverse cultivar (Tab. 5.1), prese in esame ($P < 0,05$), e si assiste ad un decremento lungo il profilo esaminato (0-40cm). La diminuzione della sostanza organica con la profondità è in accordo con diversi studi come quello di Rumpel et al. (2004), e di Kaiser et al. (2002). Al contrario, Marschner et al. (2008), hanno osservato un aumento della concentrazione di sostanza organica all'aumentare della profondità. Questa caratteristica può essere legata alla presenza nel suolo di elementi recalcitranti e ad efficienti meccanismi chimico-fisici di protezione della sostanza organica, come bassa porosità, occlusione degli aggregati, interazioni con superfici minerali o con altre molecole organiche (Rumpel et al., 2002; Rethermeyer et al., 2005). D'altra parte, è noto che la riduzione della componente organica con l'aumentare della profondità, può essere associata alla riduzione dei prodotti liberati dalle radici, ossia può coincidere con l'allontanamento dalla rizosfera e con la riduzione della biomassa microbica, che contribuisce alla frazione organica del suolo (Meints & Peterson, 1977). Dai dati sperimentali ottenuti emerge chiaramente che la varietà *Pisciottana*, campionata a Pisciotta (Tab. 5.1; Tab. 5.2), fra quelle monitorate, presenta il suolo con il maggior contenuto di sostanza organica per entrambi i campionamenti effettuati e sia alla profondità 0-15cm (8,29% per l'anno 2012; 6,67% per il 2013) che alla profondità 15-40cm (6,49% per il 2012; 5,41% per il 2013). Il suolo cilentano è seguito per contenuto di sostanza organica dal suolo sotto la cultivar *Ravece* (Tab. 5.1). In generale i suoli campani sono più ricchi di sostanza organica rispetto a quelli umbri. Il range di valori registrato negli uliveti indagati è variabile con differenze anche significative tra un campionamento e l'altro. Per i suoli campani il 2012 sembra presentare valori di sostanza organica più elevati rispetto al 2013; la situazione si inverte in Umbria (Tab. 5.1). L'andamento della sostanza organica nel suolo sotto la cultivar *Ravece* è inoltre correlato con il tenore idrico sia per l'anno 2012 che per il 2013 (Tab. 5.1), nei quali si osservano i valori più elevati per entrambi i parametri. I polisaccaridi e le sostanze umiche nel suolo sono capaci di trattenere acqua fino a quattro volte il proprio peso, attraverso numerosi gruppi funzionali idrofili (Nannipieri, 1993), aumentando, così, la capacità di ritenzione idrica del suolo. Gli uliveti studiati presentano un contenuto di sostanza organica più elevato rispetto allo studio di Gomez et al. (2004), inerente la gestione di suoli di uliveti della Spagna meridionale e la conseguente perdita di sostanza organica in seguito a tale coltivazione intensiva. I valori riportati da Leone et al. (2013) per uliveti campani sembrano essere maggiori mentre confrontabile è il contenuto di sostanza

organica di suoli di uliveti della Spagna meridionale riportati da Galvez et al. (2004). La media nazionale del contenuto di sostanza organica dei suoli agrari italiani si aggira intorno al 1,5%. Negli ultimi tempi, tuttavia, si sta assistendo ad una generalizzata e graduale riduzione del contenuto di sostanza organica nei terreni coltivati del nostro Paese, in particolare tutte le zone a clima mediterraneo sono tra le più esposte al rischio di perdita della fertilità dei suoli agrari a causa della velocità con la quale avvengono i processi di mineralizzazione della sostanza organica e per l'eccessivo sfruttamento dei suoli (Landi et al., 2000).

Parametro strettamente correlato alla sostanza organica è sicuramente la Capacità di Scambio Cationico (CSC). Analogamente a quanto registrato per il contenuto di sostanza organica, i suoli campani hanno tendenzialmente valori più elevati di CSC rispetto a quelli umbri e presentano valori di CSC più elevati nel 2013 rispetto al 2012, diversamente da quelli sotto *Frantoio* e *Moraiolo* che presentano andamento opposto. Inoltre, è evidente, come già riportato per la sostanza organica, anche per la CSC, i valori più alti sono registrati alla profondità 0-15cm rispetto a quella 15-40cm. Questo parametro ha registrato valori più alti in assoluto per il suolo sotto *Ravece* (Tab. 5.1), per entrambe le profondità prese in esame, sia per il campionamento dell'autunno 2012 che per il 2013 ($P < 0,05$); mentre quelli più bassi sotto le cv. *Frantoio* e *Moraiolo* sia per la profondità 0-15cm che quella 15-40cm (Tab. 5.1). Andando ad analizzare le differenze tra siti sotto la stessa cultivar si osserva che il suolo sotto *Pisciottana* (Tab. 5.2), campionato a Licosa, presenta il valore più basso di CSC rispetto alla stessa cultivar campionata a Pisciotta, sia per il 2012 che per il 2013 alle profondità 0-15cm e 15-40cm; l'andamento di tale parametro risulta ancora una volta correlato al contenuto di sostanza organica e al pH presente nel suolo. Per le cultivar *Frantoio* e *Moraiolo* il suolo di Perugia presenta generalmente valori più bassi di CSC rispetto all'uliveto misto di Assisi (Tab. 5.2). Inoltre, per questi suoli valori più bassi di CSC si registrano nel 2013 rispetto al 2012. I risultati ottenuti, nel corso di questo progetto, rientrano nel range riportato in letteratura da Galvez et al. (2004) e Zornoza et al. (2008), nel cui studio si è preso atto che la vigoria dell'ulivo è correlata alle proprietà del suolo, in particolare la CSC, ritenuta in questo caso, un indice di predizione perché in grado di misurare la capacità del suolo di trattenere i nutrienti cationici disponibili. Gli autori danno importanza anche alla capacità del suolo di trattenere acqua dato che l'aridità può essere un fattore limitante per le piante nei suoli del Mediterraneo. La CSC ottenuta presenta valori, invece, inferiori, rispetto a quelli di Aranda et al. (2011) e Leone et al. (2013), in particolare, in questo lavoro, il valore medio registrato per

tale parametro è pari a $24,9 \text{ cmol}_{(+)} \text{ kg}^{-1}$ ed è correlato positivamente al contenuto in acido palmitico, stearico, arachidoico ed eicosanoico ed in ultimo al valore di pH dell'olio di oliva.

La determinazione dell'N è essenziale per una razionalizzazione della concimazione azotata al fine di contenere l'impatto ambientale (Sequi et al., 2003). Il contenuto di N più elevato è quello registrato per i suoli degli uliveti appartenenti a *Ravece* ed *Ortice*. Per la cultivar avellinese, l'azoto è sicuramente in relazione all'elevato contenuto di sostanza organica del quale segue anche l'andamento annuale (Tab. 5.1). Bassi contenuti di N sono inoltre evidenti per i suoli umbri e in particolare, le misure mostrano una differenza significativa tra le due cultivar. Inoltre dai dati sperimentali ottenuti è emerso che i valori inerenti il contenuto di Azoto totale fanno generalmente registrare una diminuzione lungo il profilo e delle differenze tra gli anni (Tab. 5.1). Il contenuto di N nel suolo, così come il contenuto di C, è un parametro che segue generalmente l'andamento del contenuto della sostanza organica e tende a diminuire con la profondità a causa dell'attività microbica del suolo (Kaiser e Zech, 2000; van Hees et al., 2003). Diversi lavori, hanno evidenziato una diminuzione del contenuto di N lungo il profilo di suolo, come quello di Jones et al. (2008), e quello di Jacinthe et al. (2007).

Per i suoli sotto *Pisciottana* campionati a Pisciotta (Tab. 5.2), si sono registrate le più alte % di azoto rispetto a quelli di Licosa, che possono essere correlate al più alto contenuto in sostanza organica. Secondo un lavoro di Trinchera et al. (1998a), questa situazione costituisce un sistema poco "conservativo", dove l'attività dei microorganismi è volta principalmente ad un rapido recupero di energia per mineralizzazione della sostanza organica. La situazione registrata per l'anno 2013 sotto il suolo della cultivar *Ortice*, è tipica di un *terreno agrario*, che presenta valori di sostanza organica bassi ma contenuti di N elevati. Un terreno con suddette caratteristiche potrebbe semplicemente avere quale fattore limitante una scarsa quantità di apporti organici (Trinchera et al., 1999).

Il rapporto C/N è un parametro molto importante in quanto consente di verificare lo stato metabolico del suolo (Reicosky & Forcella, 1998) ed è un importante indice della degradabilità e della recalcitranza della sostanza organica (Melillo et al., 1982). Un rapporto C/N alto è indice di scarsa mineralizzazione ed intensa umificazione. Al contrario, valori bassi di C/N sono indice di rapida mineralizzazione dei materiali organici (Brookshire et al., 2007).

I risultati ottenuti evidenziano valori del rapporto C/N più alti nei suoli umbri rispetto a quelli campani che quindi presentano una ridotta sostanza organica particolarmente

recalcitrante. Questo potrebbe essere considerato un tipico esempio di suolo agrario, dove a seguito delle pratiche agricole si è avuto un depauperamento delle risorse organiche con piccoli accumuli di sostanze più difficili da degradare e il cui consumo è più complesso (Sequi et al., 2003). Inoltre è evidente una diminuzione del rapporto C/N (Tab. 5.1), lungo i profili esaminati (0-15cm) e (15-40cm) per l'autunno 2012, andamento che sembra invertire la sua tendenza nel 2013. Facendo anche per questo parametro un confronto tra siti con la stessa cultivar è evidente che il suolo sotto *Pisciottana*, campionato a Pisciotta (Tab. 5.2) presenta i valori più bassi in assoluto ($P < 0,05$), di rapporto C/N, nel 2012 e 2013; questo dato correlato all'elevato quantitativo di sostanza organica e N (%), potrebbe suggerire la presenza di un terreno sottoposto a stress metabolico, caratterizzato da un moderato turnover del carbonio e da una bassa attività umificante (Sequi et al., 2003). Per i suoli umbri (Tab. 5.2) si assiste ad un incremento del rapporto C/N dal 2012 al 2013, ad eccezione di *Moraiolo* che non presenta sostanziali differenze tra il I e il II campionamento. Inoltre, il suolo sotto l'uliveto misto evidenzia valori simili al suolo sotto *Moraiolo* di Perugia.

Inoltre, anche la situazione dei suoli umbri, con elevati rapporti C/N e bassi contenuti di sostanza organica, può essere considerata tipica di un terreno agrario, nel quale la scarsa quantità di apporti organici, dovuta alla scarsa copertura vegetale presente sul terreno considerato, limiterebbe a lungo termine il processo di formazione delle sostanze umiche a causa della impossibilità, da parte dei microorganismi del suolo, di reperire materiale organico (Sequi et al., 2003).

Nell'ambito di un suolo agrario, come quelli presi in esame, il rapporto C/N è un indice della disponibilità di azoto per le colture in funzione della quantità di carbonio presente nella sostanza organica (Sequi et al., 2003). Quanto più il rapporto C/N è basso tanto più l'azoto è reso disponibile per le colture. Il rapporto considerato "ideale" secondo Sequi et al. (2003), per la migliore disponibilità di azoto è circa 12, e i suoli cilentani in particolare quello sotto *Pisciottana* presenta valori simili.

Tabella 5.1: Caratteristiche chimico-fisiche dei suoli di uliveti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. prese in esame nell'anno 2012 e 2013.

Suolo (0-40cm)								
Caratteristiche chimico-fisiche								
Cultivar	Prelievo	CIM	Tenore idrico (%)	Sostanza organica (%)	CSC (cmol ₍₊₎ kg ⁻¹)	pH	N (%)	C/N
<i>Pisciottana</i>	0-15cm 15-40cm	23,72±1,25	16,65±1,28	8,29±0,70	17,04±0,80	7,87±0,03	0,33±0,02	8,09±0,82
	2012		15,79±1,54	6,49±0,57	14,21±0,59	7,89±0,02	0,33±0,01	7,55±0,70
<i>Pisciottana</i>	0-15cm 15-40cm	34,25±2,58	20,82±1,42	6,67±0,10	18,40±1,61	8,43±0,02	0,24±0,01	16,51±3,22
	2013		16,02±2,00	5,41±0,21	14,94±1,01	8,57±0,02	0,18±0,03	17,27±2,88
<i>Ravece</i>	0-15cm 15-40cm	34,83±1,90	28,15±0,64	7,91±0,37	22,41±0,90	7,54±0,03	0,41±0,03	8,10±0,99
	2012		24,92±0,52	6,37±0,33	15,40±0,90	7,50±0,04	0,35±0,01	6,13±0,35
<i>Ravece</i>	0-15cm 15-40cm	39,16±0,45	28,88±1,41	5,39±0,05	22,38±1,54	8,25±0,03	0,24±0,01	15,85±0,86
	2013		27,25±0,44	4,71±0,14	22,29±1,46	8,31±0,03	0,28±0,01	9,88±0,53
<i>Ortice</i>	0-15cm 15-40cm	27,13±1,03	20,07±0,35	3,29±0,50	10,52±0,63	7,72±0,02	0,31±0,02	9,15±0,51
	2012		18,87±0,37	2,95±0,41	10,29±0,31	7,76±0,03	0,25±0,02	8,89±0,70
<i>Ortice</i>	0-15cm 15-40cm	29,89±0,84	6,21±0,35	3,64±0,05	19,75±1,04	8,46±0,03	0,41±0,24	18,62±3,02
	2013		6,72±0,27	3,03±0,12	21,48±2,96	8,48±0,03	0,13±0,01	19,62±1,67
<i>Frantoio</i>	0-15cm 15-40cm	25,93±2,08	20,91±0,13	4,11±1,19	14,57±1,56	8,35±0,01	0,21±0,01	10,47±0,13
	2012		16,22±0,67	1,88±0,62	10,66±0,01	8,45±0,01	0,17±0,01	6,58±0,39
<i>Frantoio</i>	0-15cm 15-40cm	20,69±2,59	13,67±0,16	4,77±0,19	6,32±0,97	8,76±0,01	0,12±0,00	19,94±0,64
	2013		11,54±0,24	3,17±0,06	3,83±0,01	8,90±0,02	0,07±0,00	25,01±0,33
<i>Moraiolo</i>	0-15cm 15-40cm	21,78±2,08	21,70±0,16	2,68±0,82	11,46±0,03	8,33±0,01	0,13±0,01	16,47±0,75
	2012		20,59±0,31	3,86±0,57	10,67±0,05	8,30±0,05	0,22±0,00	4,86±0,10
<i>Moraiolo</i>	0-15cm 15-40cm	25,88±2,59	21,14±0,73	4,40±0,10	6,94±0,80	8,57±0,02	0,19±0,01	16,66±0,44
	2013		20,89±0,18	4,36±0,38	6,52±1,17	8,64±0,02	0,10±0,00	21,48±0,66

Tabella 5.2: Caratteristiche chimico-fisiche di suoli campionati sotto la cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e sotto *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono a due diversi anni di campionamento: il 2012 e il 2013.

Suolo (0-40cm)										
Caratteristiche chimico-fisiche										
Sito	Cultivar	Prelievo (Anno)		CIM	Tenore idrico (%)	Sostanza organica (%)	CSC (cmol ₍₊₎ kg ⁻¹)	pH	N (%)	C/N
Licosa	<i>Pisciottana</i>	0-15cm	2012	29,30±3,96	17,13±0,54	5,62±0,30	10,34±0,67	6,66±0,03	0,23±0,01	12,59±0,82
		15-40cm			17,04±0,76	5,78±0,41	8,96±1,40	6,56±0,03	0,26±0,01	11,39±0,47
0-15cm		2013	25,80±2,07	17,20±0,75	5,02±0,17	15,56±1,48	7,20±0,05	0,11±0,01	14,21±0,67	
15-40cm				17,18±0,54	5,11±0,34	15,86±1,15	7,09±0,06	0,08±0,00	10,22±0,14	
Pisciotta	<i>Pisciottana</i>	0-15cm	2012	23,72±1,25	16,65±1,28	8,29±0,70	17,04±0,80	7,87±0,03	0,33±0,02	8,09±0,82
		15-40cm			15,79±1,54	6,49±0,57	14,21±0,59	7,89±0,02	0,33±0,01	7,55±0,70
0-15cm		2013	34,25±2,58	20,82±1,42	6,67±0,10	18,40±1,61	8,43±0,02	0,24±0,01	16,51±3,22	
15-40cm				16,02±2,00	5,41±0,21	14,94±1,01	8,57±0,02	0,28±0,01	17,27±2,88	
Assisi	<i>Frantoio-Moraiolo</i> (Uliveto misto)	0-15cm	2012	21,85±1,11	19,40±0,97	2,53±0,49	9,67±1,23	8,49±0,03	0,18±0,01	10,99±1,12
		15-40cm			17,13±1,10	4,02±0,99	7,38±1,08	8,61±0,05	0,17±0,01	8,70±0,91
0-15cm		2013	27,64±1,31	25,04±1,19	2,49±0,13	7,34±0,57	8,50±0,06	0,16±0,02	16,94±1,91	
15-40cm				21,50±0,29	3,90±0,19	5,80±0,98	8,51±0,03	0,15±0,04	16,79±2,37	
Perugia	<i>Frantoio</i>	0-15cm	2012	25,93±2,08	20,91±0,13	4,11±1,19	14,57±1,56	8,35±0,01	0,21±0,01	10,47±0,13
		15-40cm			16,22±0,67	1,88±0,62	10,66±0,01	8,45±0,01	0,17±0,01	6,58±0,39
	0-15cm	2013	20,69±2,59	13,67±0,16	4,77±0,19	6,32±0,97	8,76±0,01	0,12±0,00	19,94±0,64	
	15-40cm			11,54±0,24	3,17±0,06	3,83±0,01	8,90±0,02	0,07±0,00	25,01±0,33	
<i>Moraiolo</i>	<i>Moraiolo</i>	0-15cm	2012	21,78±2,08	21,70±0,16	2,68±0,82	11,46±0,03	8,33±0,01	0,13±0,01	16,47±0,75
		15-40cm			20,59±0,31	3,86±0,57	10,67±0,05	8,30±0,05	0,22±0,00	4,86±0,10
		0-15cm	2013	25,88±2,59	21,14±0,73	4,40±0,10	6,94±0,80	8,57±0,02	0,19±0,01	16,66±0,44
		15-40cm			20,89±0,18	4,36±0,38	6,52±1,17	8,64±0,02	0,10±0,00	21,48±0,66

5.2 Caratteristiche biologiche dei suoli

La biomassa è l'intera popolazione microbica del suolo trattata come un'unica entità (Powlson, 1994), e può essere definita come la frazione vivente della sostanza organica, escludendo le radici delle piante e la pedofauna (Jeckinson et al., 1981). I microrganismi del suolo si adattano prontamente alle variazioni ambientali e sono tra gli organismi più versatili presenti in natura, svolgendo funzioni di grande rilievo nei cicli biogeochimici e nel riciclo della materia. Studiare la comunità microbica significa approfondire le conoscenze sulle molteplici e complesse relazioni ed attività che essa svolge nel suolo e nell'ecosistema. La struttura e la funzionalità della comunità edafica è strettamente interconnessa alla copertura vegetale, ne viene influenzata e ne influenza produttività e qualità dei prodotti (Niklaus et al., 2003; Fac et al., 2003).

I valori significativamente più elevati ($P < 0,05$) di biomassa microbica sono registrati per i suoli campani rispetto a quelli umbri, seguendo come spesso riportato in letteratura l'andamento del contenuto di sostanza organica dei suoli (Fig. 5.1). In particolare sono i suoli sotto *Ravece* a presentare la maggiore abbondanza di biomassa microbica. Seguono in ordine di abbondanza i valori di biomassa microbica registrati nei suoli sotto *Ortice* e *Pisciottana* con estrema variabilità tra i due anni di campionamento; per i suoli sotto *Ravece* ed *Ortice* la biomassa microbica misurata è maggiore nel 2013 rispetto al 2012 per il suolo sotto la *Pisciottana* l'andamento è opposto (Fig. 5.1).

Secondo Florenzano, (1983), elevati valori di biomassa microbica per gli uliveti indagati nei suoli agrari indicano l'esistenza di situazioni attuali o pregresse, favorevoli allo sviluppo dei microrganismi. D'altra parte, la biomassa microbica come tutti i parametri biologici è estremamente sensibile alla variazione delle condizioni climatiche. Anche l'andamento di questo parametro con la profondità non è univoco (Fig. 5.1). In particolare riduzioni più o meno significative si evidenziano lungo il profilo dei suoli sotto *Pisciottana*, *Frantoio* e *Moraiolo*; al contrario un incremento anche se non sempre marcato si osserva per i suoli sotto *Ortice* e *Ravece* (Fig. 5.1). Confrontando siti diversi sotto la stessa cultivar, la *Pisciottana* campionata a Pisciotta e *Frantoio* prelevato a Perugia (Fig. 5.2) presentano suoli con valori di biomassa microbica più elevati rispetto alle varietà campionate a Licosa ed Assisi, per entrambi gli anni di campionamento e alle due profondità prese in esame. Le differenze risultano statisticamente significative ($P < 0,001$) solo per i suoli cilentani. In questo

ulteriore confronto tra siti si osserva per tutti i suoli una riduzione della biomassa microbica con la profondità (Fig. 5.2).

Nei suoli degli uliveti *Pisciottana*, *Frantoio* e *Moraiolo*, si osserva una biomassa microbica di gran lunga inferiore rispetto a quella riportata, nei sistemi agricoli, da Stahl et al. (1999), il quale mette a confronto sistemi coltivati e non, al fine di stimare la biomassa microbica e valutarne le differenze in entrambi. Nei profili esaminati, in questo studio, è evidente una chiara tendenza alla diminuzione della biomassa microbica con un incremento della profondità, cosicché gli strati di suolo minerale più superficiale hanno tendenzialmente valori più alti rispetto a quelli più profondi. Questo andamento è confermato da ricerche effettuate da Ekelund et al. (2001) e Fritze (2000), dato che lo strato superficiale del suolo è continuamente alimentato dalla lettiera e dagli essudati dell'apparato radicale.

A livello delle radici la comunità edafica e la sua attività viene direttamente influenzata dalla decomposizione delle radici morte e dal rilascio degli essudati radicali (Swinnen, 1994). Anche, Faialho e collaboratori (1991) affermano che questa diminuzione della biomassa microbica dallo strato superficiale a quello più profondo è dovuta agli effetti della copertura vegetale sul suolo e all'accumulo della materia organica. In prossimità delle radici le popolazioni microbiche possono essere da 5 a 100 volte più numerose che nel resto del suolo, con l'aumentare della distanza dalla superficie radicale si osserva un decremento della popolazione microbica (Yeats & Darrah, 1991). D'altra parte è noto che i valori di biomassa microbica sono fortemente influenzati dalla quantità e dalla qualità della sostanza organica. Rice et al. (1996) hanno osservato che la biomassa microbica oltre ad avere un turnover più veloce rispetto alla sostanza organica del suolo, risponde rapidamente alle variazioni dei diversi parametri ambientali sulle caratteristiche della microflora edafica. Ciò è in accordo con i risultati ottenuti, infatti laddove le temperature medie annuali sono risultate più elevate, sono stati registrati valori più alti di biomassa microbica; questo è il caso dei suoli sotto le cultivar campane e sotto la cultivar *Pisciottana* campionata a Pisciotta, in particolare.

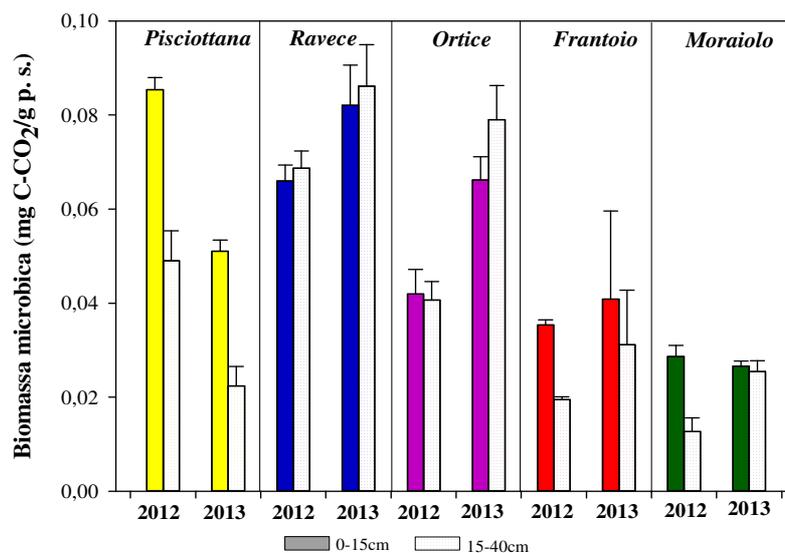


Figura 5.1: Biomassa microbica nei suoli di diversi siti con differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e 2013.

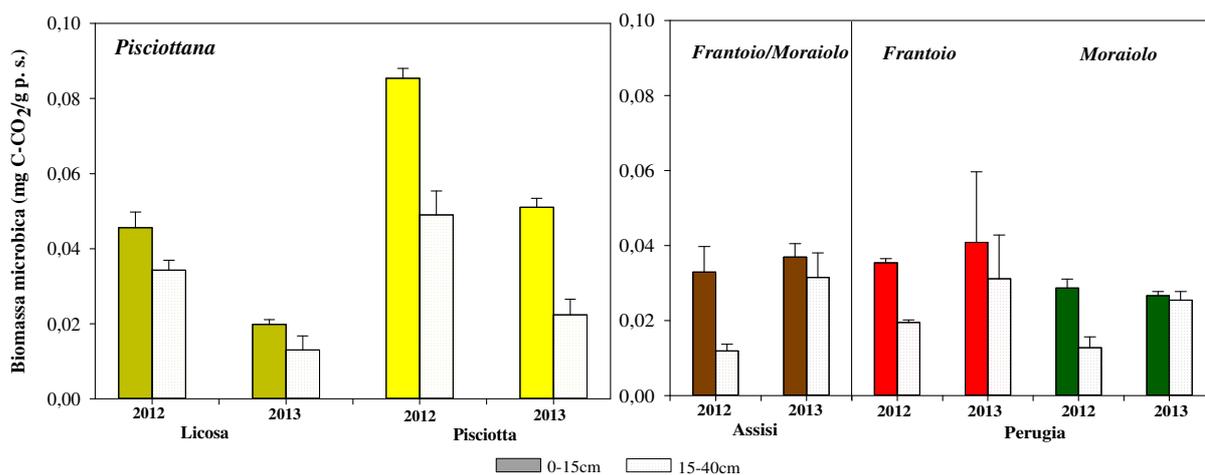


Figura 5.2: Biomassa microbica nei suoli appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I campionamenti sono stati realizzati nell'autunno del 2012 e 2013.

I funghi spesso rappresentano una componente della biomassa microbica nei terreni considerati coltivabili e contribuiscono alle proprietà e processi del suolo (Anderson & Domsch, 1975). Come gruppo, i funghi sono responsabili primariamente per la decomposizione e mineralizzazione dei residui organici nel suolo, anche per quelli più complessi, costituiscono un'importante sorgente alimentare per altri organismi del suolo e contribuiscono alla formazione di aggregati. Queste attività rendono i funghi molto importanti per la qualità del suolo e la sostenibilità degli agroecosistemi (Stahl et al., 1999).

Nella figura 5.3 è mostrato l'andamento della biomassa fungina totale per i campionamenti del 2012 e 2013 nei suoli sotto le diverse cultivar di *Olea europaea* L. Sostanzialmente, si è osservata una diminuzione del contenuto in funghi lungo il profilo del suolo esaminato (0-40cm), anche se le differenze tra le due profondità si assottigliano nel 2013. La presenza del micelio fungino ancora a circa 40 cm nei siti indagati comunque dimostra una eventuale traslocazione di nutrienti a tale profondità. Sia per le cultivar campane che per quelle umbre si assiste ad un aumento del contenuto in biomassa fungina dal 2012 al 2013. I suoli sotto *Pisciottana* e *Ravece* hanno registrato valori di biomassa fungina significativamente più elevati rispetto a quelli sotto le altre cultivar. Questi valori possono essere correlati con le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli (CIM, tenore idrico, CSC), particolarmente favorevoli allo sviluppo dei funghi, come ben documentato dalla letteratura scientifica. Effettuando, poi, un confronto tra siti diversi sotto la stessa cultivar è evidente che i suoli sotto *Pisciottana* (Fig. 5.4), presentano la stessa quantità di funghi sia a Licosa che a Pisciotta nel 2012 e 2013 con andamenti molto simili per i due anni; da ciò emerge chiaramente un *effetto cultivar* che prevale su quello ambientale. È l'uliveto misto di Assisi, inoltre, a presentare, un contenuto maggiore di funghi e ciò è sicuramente correlato al più alto tenore idrico registrato in questo suolo, rispetto a quello di Perugia.

Il range ottenuto dai dati sperimentali è in accordo con quanto riportato da Stahl et al. (1999). Bisogna ricordare, inoltre, che in letteratura è ben nota la sensibilità dei funghi a molteplici e svariati fattori climatici ed edafici, come a diversi tipi di disturbo, in particolare: al tipo di suolo e di vegetazione (Rutigliano et al. 2004), alla quantità e qualità della sostanza organica (Iovieno et al. 1996; Rutigliano et al. 2002), alla temperatura, alle precipitazioni, e alla diversa gestione agronomica o all'uso di fertilizzanti (Jasper et al. 1979; Kahiluoto et al. 2001; Venturino et al., 2011).

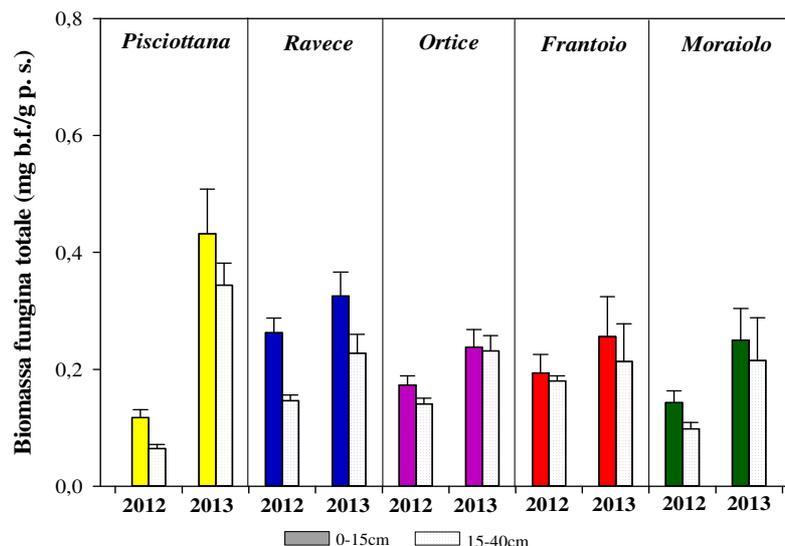


Figura 5.3: Biomassa fungina nei suoli di diversi siti con differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e 2013.

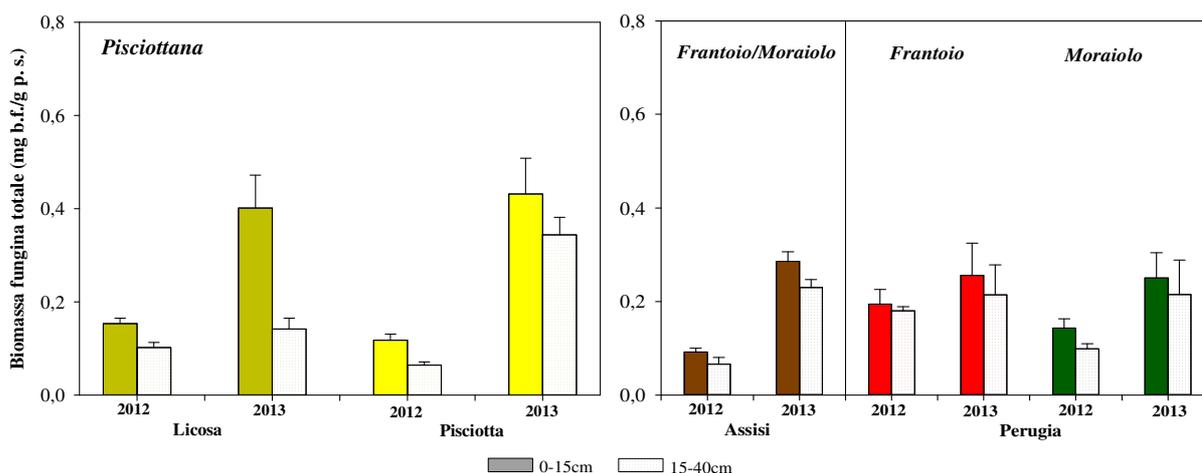


Figura 5.4: Biomassa fungina nei suoli appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I campionamenti sono stati realizzati nell'autunno del 2012 e 2013.

La respirazione del suolo è uno dei parametri utilizzati per quantificare le attività microbiche nei suoli. Il metodo è basato sul fatto che le cellule metabolicamente attive richiedono un apporto costante di nutrienti ed energia che, per la microflora eterotrofa, deriva dalla trasformazione della sostanza organica (Sequi et al., 2003). La respirazione è un processo universale e come tale non solo ristretto ai microrganismi ma viene effettuata anche da altri organismi che vivono nel terreno, dipende dallo stato fisiologico delle cellule ed è influenzato da diversi fattori (Sequi et al., 2003).

Per tutte le cultivar prese in esame è evidente un incremento dell'attività microbica dal primo al secondo campionamento fatta eccezione per il suolo campionato a Perugia sotto la cultivar *Frantoio* a 0-15cm di profondità (Fig. 5.5). Ciò potrebbe essersi verificato a causa del diverso regime termo pluviometrico (Paragrafo 4.1) che, per tutte le stazioni monitorate nel 2013, ha mostrato un ammontare annuale delle piogge notevolmente superiore al 2012. Secondo alcuni studi condotti da Bullini et al. (1998), la respirazione del suolo è risultata positivamente correlata la tenore idrico e al contenuto in sostanza organica nei suoli. Nei suoli delle cultivar campane è presente un'attività microbica inferiore rispetto a quelli umbri contrariamente a quanto osservato per i valori di biomassa microbica. Ad eccezione dei suoli sotto *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo* (Fig. 5.5), i cui valori non sono risultati significativi, tutte le cultivar prese in esame hanno una respirazione maggiore nei primi 0-15cm di suolo campionati, che diminuisce con la profondità. Secondo Sequi et al. (2003), la respirazione microbica diminuisce con la profondità del terreno, soprattutto per il decremento della sostanza organica. È per questo motivo che la velocità di rilascio della CO₂ è molto elevata vicino alla superficie del suolo con alta concentrazione di residui vegetali e diminuisce con la profondità (Bullini et al., 1998). Confrontando siti diversi con la stessa cultivar è stato osservato che il suolo sotto *Pisciottana* (Fig. 5.6) campionato a Licosa ha registrato un'attività microbica maggiore rispetto ai suoli di Pisciotta in particolare per il campionamento del 2012. Questo risultato potrebbe essere correlato all'attività di sovrappascolo da cinghiale presente in questo suolo, che comporta una situazione di stress metabolico, apporta continuamente substrati da utilizzare e rimescola il suolo ridistribuendo la sostanza organica. Nell'uliveto misto di Assisi (Fig. 5.6) si osserva una significativa riduzione dell'attività microbica con la profondità, situazione opposta è evidente nei suoli sotto *Frantoio* e *Moraiolo*, prelevati a Perugia nel 2013, dove si registra un significativo aumento del parametro lungo il profilo. Questi risultati sono strettamente correlati al rapporto C/N ottenuto e seguono lo stesso andamento della sostanza organica in essi presente. A tal proposito, Lagomarsino e collaboratori (2009), affermano che la respirazione eterotrofa del suolo è un processo fortemente condizionato dalla temperatura, dall'umidità e dalla quantità e qualità della sostanza organica.

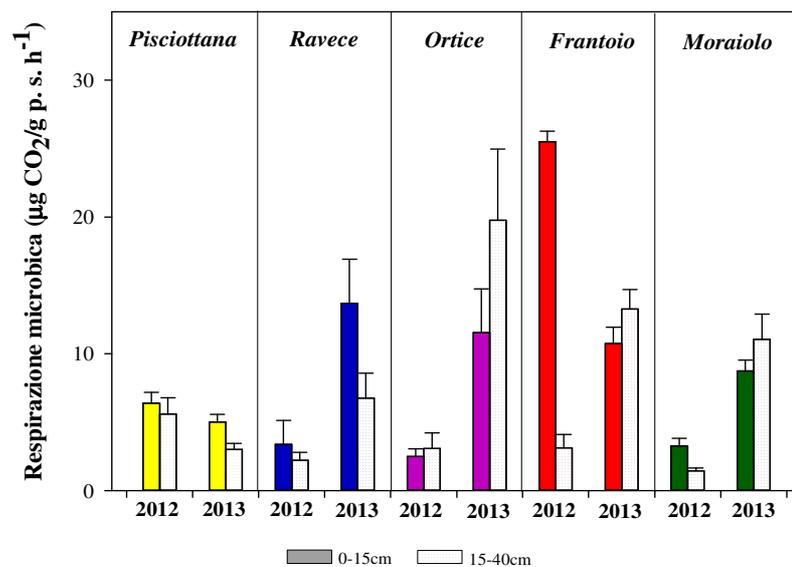


Figura 5.5: Attività microbica nei suoli di diversi siti con differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

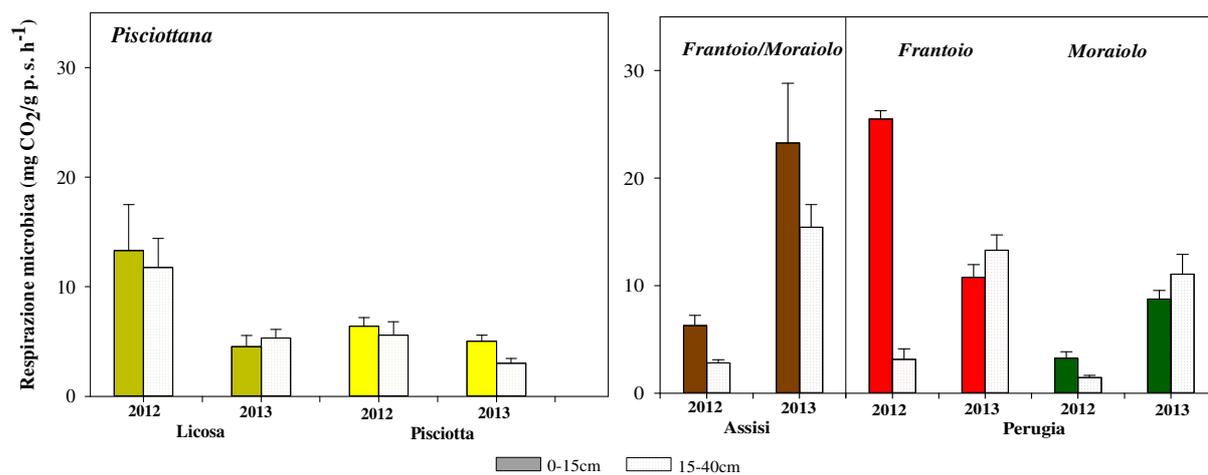


Figura 5.6: Attività microbica nei suoli appartenenti alla cv. *Pisciotiana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I campionamenti sono stati realizzati nell'autunno del 2012 e 2013.

Il quoziente metabolico (qCO_2) o tasso di respirazione specifica non è una misura di per sé, ma la respirazione basale in rapporto al C della biomassa e fornisce una stima dell'attività dei microrganismi. Tale parametro ecofisiologico può rappresentare una misura della risposta microbica a fenomeni di disturbo e si tratta, di un indice che permette di valutare l'efficienza della microflora nell'utilizzare il substrato (Sequi et al., 2003).

I risultati sperimentali evidenziano lo stesso andamento presente nella respirazione basale tra le diverse cultivar esaminate. È emerso che tale parametro è più alto nel campionamento 2013 e presenta valori più elevati nei suoli umbri rispetto a quelli campani, con differenze più marcate rispetto alla respirazione.

Tra tutte le varietà genetiche prese in esame, i valori registrati più elevati in assoluto e con differenze statisticamente significative ($P < 0,05$), sono quelli sotto *Frantoio* per il 2012 (Fig. 5.7) e per *Moraiolo* nel 2013 lungo il profilo esaminato (0-40cm). Inoltre, è evidente lo stesso andamento presente non solo nella respirazione basale ma anche nel tenore idrico, nel contenuto in sostanza organica ed, infine, nel rapporto C/N non solo tra le differenti cultivar ma anche per *Pisciottana*, *Frantoio* e *Moraiolo* campionate in siti diversi. Da uno studio condotto da Curiel Yuste et al. (2007), in accordo con i risultati sperimentali acquisiti, si riscontra che la fluttuazione del tasso di respirazione del suolo, è correlata alle variazioni del contenuto idrico o della temperatura e muta a seconda della stagione. Altri studi invece riportano che le precipitazioni, oltre ad avere un effetto umettante, determinano la rottura dei microaggregati. Entro i quali la sostanza organica è protetta dall'attacco dei microrganismi, determinando quindi un incremento dei tassi di respirazione del suolo non costantemente correlati al contenuto idrico (Casals et al., 2009).

Nel monitorare la stessa cultivar in siti diversi è emerso che per il suolo sotto *Pisciottana* (Fig. 5.8) il qCO_2 è sempre maggiore nel territorio di Licosa rispetto a quello di Pisciotta. Questo valore più alto di qCO_2 accoppiato con il pH più basso che è stato registrato nel suolo insieme ad una bassa biomassa suggerisce una situazione di stress, secondo Insam & Haseiwandter, (1989) e Anderson, (1984) che sul sito di Licosa, come già accennato in precedenza potrebbe essere rappresentato dal sovrappascolo da parte del cinghiale. Infatti, secondo Anderson & Domsch, (1993) l'aumento di qCO_2 indica l'instaurarsi di condizioni di stress che attivano meccanismi di riparazione, i quali tendono a riparare i sistemi cellulari danneggiati dissipando più energia per il loro mantenimento.

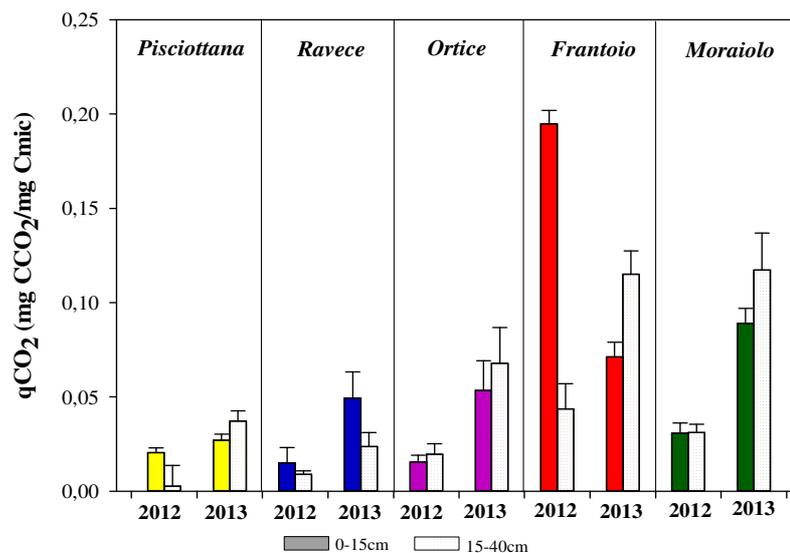


Figura 5.7: Quoziente metabolico (qCO₂) nei suoli di diversi siti con differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

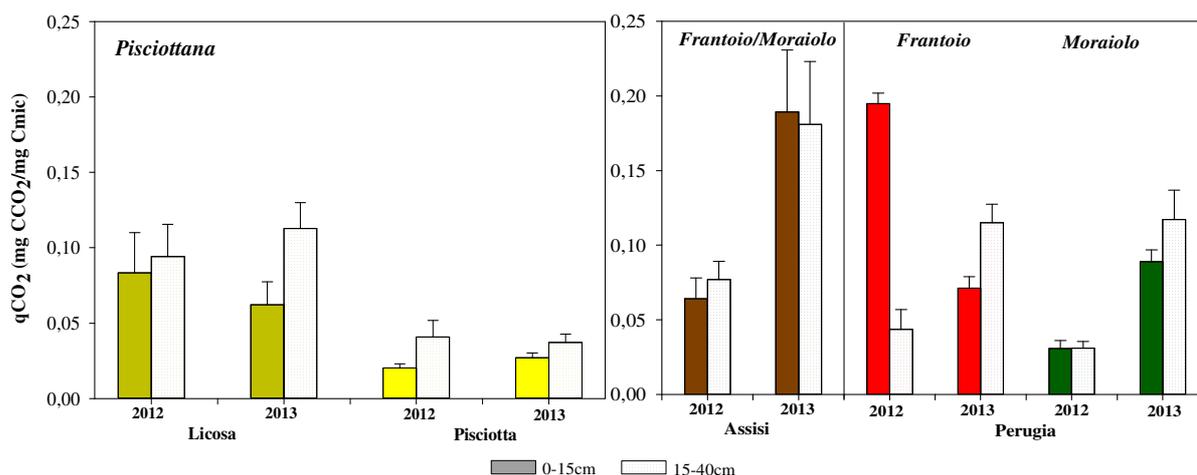


Figura 5.8: Quoziente metabolico (qCO₂) nei suoli appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I campionamenti sono stati realizzati nell'autunno del 2012 e 2013.

Un altro indice di attività microbica ed eventualmente di condizioni di stress è rappresentato dal coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) rappresenta la frazione di C organico che viene mineralizzata a CO₂ nell'unità di tempo. Questo indice può fornire interessanti informazioni sul tasso di mineralizzazione della sostanza organica e sulla capacità potenziale del suolo di accumulare o dissipare C. Il tasso di respirazione della comunità microbica dipende dalle condizioni fisiche e chimiche del suolo. Dai dati sperimentali ottenuti, il CEM segue per alcune cultivar lo stesso andamento del qCO₂ (Fig. 5.9 e 5.10). I

suoli umbri hanno tendenzialmente valori più elevati di CEM rispetto a quelli campani, fatta eccezione per il suolo sotto *Ortice*, che presenta per il 2013 i valori più elevati. Inoltre, come per la respirazione basale, si riscontra che, ad eccezione dei suoli sotto *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo*, tutte le cultivar prese in esame hanno valori di CEM maggiori nei primi 0-15cm di suolo campionati, che diminuiscono con la profondità. Il suolo sotto la *Pisciottana* (Fig. 5.10) campionata a Licosa presenta valori di CEM più alti rispetto al sito di Pisciotta soprattutto nel 2012. Ciò accadeva anche per la respirazione basale e il qCO_2 . Secondo Odum, (1985) valori più elevati di respirazione si traducono in valori più elevati di CEM; ciò è in accordo con i risultati ottenuti per questo suolo. Inoltre, questo fenomeno potrebbe essere correlato all'instaurarsi di condizioni sfavorevoli per la comunità microbica. Infatti, in condizioni di stress i microrganismi consumano una quantità maggiore di energia per il mantenimento e quindi dissipano una frazione maggiore di C organico (Odum, 1985). Anche in questo caso, emerge chiaramente l'influenza del sovrappascolo da parte di *Sus scrofa* nel sito di Licosa e una più scarsa qualità dei suoli umbri rispetto a quelli campani.

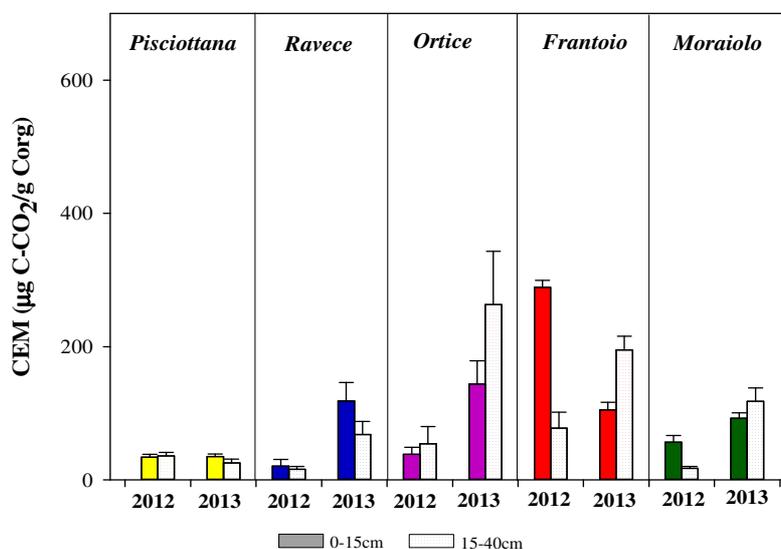


Figura 5.9: Coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) nei suoli di diversi siti con differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

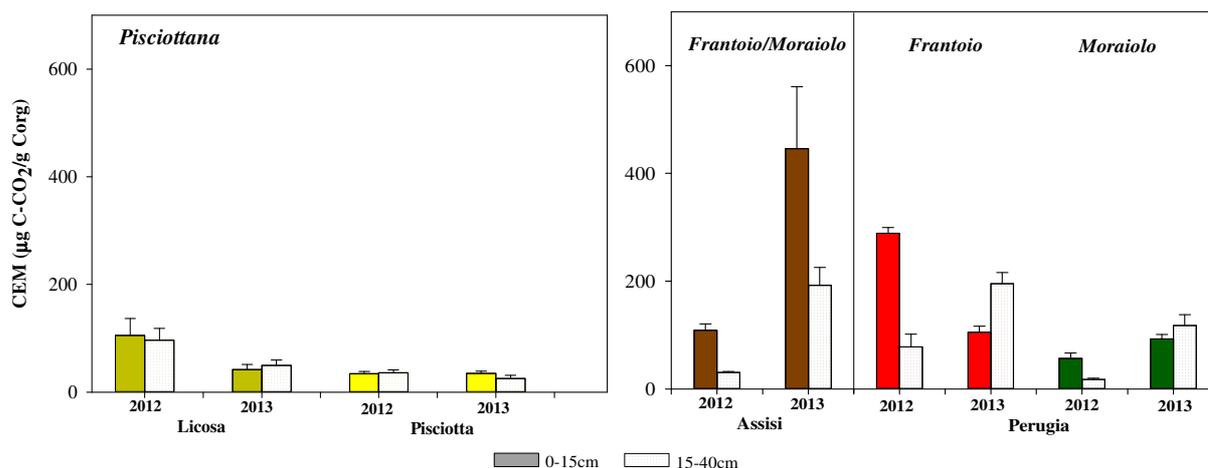


Figura 5.10: Coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) nei suoli appartenenti alla cv. *Pisciotтана* nei siti di Licosa e Pisciotтана e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell’uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I campionamenti sono stati realizzati nell’autunno del 2012 e 2013.

5.3 Caratteristiche fogliari funzionali

Le caratteristiche funzionali delle foglie, rappresentano utili indicatori della capacità della pianta di utilizzare le risorse e utili forniscono preziose informazioni sullo *status* nutrizionale dell’organismo vegetale (Ordoñez et al., 2009). Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi dei tratti funzionali di campioni di foglie appartenenti alle varietà di olivo *Pisciotтана*, *Ortice*, *Ravece*, *Frantoio* e *Moraiolo*.

L’area fogliare (LA), ha mostrato valori significativamente più alti per le foglie della cultivar *Pisciotтана*, in particolare per l’anno 2012 (Tab. 5.3). Anche la cultivar *Frantoio* presenta un’area fogliare relativamente alta. Inoltre per tutte le cultivar, fatta eccezione la *Pisciotтана*, nel 2013 si registrano valori di area fogliare più elevati rispetto al 2012 (Tab. 5.3). Questo potrebbe essere correlato al diverso regime termo-pluviometrico (Guerfel et al., 2009), infatti l’ammontare delle precipitazioni annuali del 2013 è risultato maggiore in ogni stand monitorato. Considerando che una maggiore superficie fogliare implica una migliore capacità da parte della foglia di intercettare la luce, l’incremento del parametro LA potrebbe essere indice di una migliore efficienza di fotosintesi che dunque comporta tassi di crescita più elevati da parte della pianta. Il confronto tra le foglie della stessa cultivar, campionate in siti diversi, mostra differenze per i valori di LA (Tab. 5.4). In particolare le foglie degli olivi di Licosa per la cv. *Pisciotтана* presentano valori più piccoli rispetto alle foglie di Pisciotтана, paragonabili a quelli rinvenuti per la cv. *Moraiolo* a Perugia rispetto all’uliveto misto di Assisi.

L'area fogliare specifica (SLA) di una specie può essere considerato un parametro correlato positivamente con il tasso relativo di crescita potenziale (Cornelissen et al., 2003).

Comparando i due anni di campionamento, 2012 e 2013, è stato osservato un incremento di SLA per l'autunno 2013 per tutte le cultivar esaminate (Tab. 5.3); in particolare si sono distinte per i valori più elevati le foglie appartenenti a *Pisciottana*, *Ravece* e *Frantoio*. I suoli analizzati mostravano per queste cultivar i valori più elevati di CIM e tenore idrico, parametri che potrebbero influenzare significativamente la superficie fogliare specifica dato che non sussistono condizioni di stress idrico. I valori di SLA più bassi in assoluto sono stati registrati nel 2012 per la varietà *Ortice*.

Confrontando lo SLA delle foglie della stessa cultivar campionata in siti diversi, per la *Pisciottana* i valori sono molto simili nelle foglie di Licosa e in quelle di Pisciotta (Tab. 5.4), Analogamente a quanto si osserva per le foglie di *Moraiolo* (Tab. 5.4), ad Assisi e a Perugia. Questi risultati mettono in evidenza come i valori di SLA registrati possano essere una caratteristica della cultivar presa in esame e condizionati meno dall'effetto del sito ossia dalle sue condizioni climatiche ed edafiche. I dati sperimentali acquisiti nel corso di questo dottorato sono inferiori rispetto a quelli di Gulias et al. (2003) e di Kazakou et al. (2009) per la stessa specie. Gulias et al. (2003), affermano che SLA e contenuto di N più elevati in specie endemiche del Mediterraneo potrebbero implicare una porzione cospicua della biomassa fogliare costituita da composti non associati al metabolismo fotosintetico e da strutture, inoltre queste caratteristiche potrebbero essere una conseguenza delle condizioni favorevoli all'insediamento di queste specie rispetto alle altre. Secondo Gulias et al. (2003), le specie con basso SLA e contenuto in N sono quelle ritenute meno competitive e meno invasive. I dati ottenuti sono superiori rispetto a Ordoñez et al. (2009) e in accordo con Guerfel et al. (2009), che affermano che la disponibilità idrica gioca un ruolo fondamentale nel modificare la struttura fogliare e il valore di SLA. Inoltre, variazioni di tale parametro possono essere dovute a variazioni nello spessore della foglia e/o nella densità fogliare. Questo studio ha anche rilevato che più alti valori di SLA sono associati ad una densità maggiore di tricomi, strutture caratteristiche degli ulivi che hanno il compito di limitare le perdite d'acqua, agire da filtro contro le radiazioni UV e ridurre gli effetti del vento.

Secondo Cornelissen et al. (2003), valori di SLA più bassi corrispondono ad un investimento da parte della pianta in "difese" fogliari, in particolare in quelle strutturali che "prolungano la vita" della foglia, nel corso di questo progetto di dottorato si sono distinte le

cv. *Ortice* e *Moraiolo*; mentre specie con valori più elevati sono tipiche di ambienti ricchi di risorse e non sottoposte a stress o limitazioni nutritive, come *Pisciottana*, *Ravece* e *Frantoio*.

LDMC esprime il contenuto in sostanza secca presente nel tessuto fogliare; essa può essere associata alla presenza di tessuti sclerenchimatici di sostegno che conferiscono alla foglia una maggiore resistenza ed indica la presenza nei tessuti fogliari di materiale più recalcitrante. Una presenza ridotta di tessuti di sostegno sembra essere presente nelle foglie della *Pisciottana* e di *Ravece* rispetto a quelle delle altre cultivar (Tab. 5.3). Inoltre valori più bassi di LDMC sono misurati per le foglie campionate nel 2013 rispetto al 2012, contrariamente a quanto registrato per lo SLA. Tali risultati sono in accordo con l'attuale letteratura scientifica, secondo la quale SLA e LDMC sono parametri inversamente proporzionali (Cornelissen et al., 2003). Infatti, i valori più elevati (Tab. 5.3) appartengono alle foglie di *Ortice* ($0,50 \text{ g/g}^{-1}$), *Frantoio* ($0,50 \text{ g/g}^{-1}$) e *Moraiolo* ($0,53 \text{ g/g}^{-1}$), contrariamente a quanto osservato per lo SLA. Abbastanza simili risultano inoltre i valori di LDMC nelle foglie delle stesse cultivar campionate in siti diversi (Tab. 5.4). L'esame di caratteristiche fogliari quali SLA e LDMC ha evidenziato stretta correlazione con alcune caratteristiche chimico-fisiche dei suoli, nello specifico, i suoli sotto le varietà *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo* sono anche quelli più poveri di materia organica. Un basso valore di SLA è generalmente associato ad alti valori di densità fogliare (LDMC) che sottintende una maggiore allocazione delle risorse nella biomassa e nelle strutture piuttosto che nelle componenti metaboliche (pigmenti fotosintetici, proteine). Questa strategia, dal punto di vista ecologico aumenta la resistenza e la permanenza delle foglie sui rami (Terashima & Hikosaka, 1995). Infatti, l'*Olea europaea* L., impiegata in questo lavoro, è una sclerofilla tipica dell'ambiente mediterraneo, caratterizzato da una limitata disponibilità di nutrienti nel suolo ed una marcata stagionalità nella disponibilità della risorsa acqua.

Il contenuto idrico relativo (RWC) indica la capacità di trattenere acqua nel tessuto fogliare. I valori di RWC sia per il 2012 che per il 2013 (Tab. 5.3) indicano differenze significative ($P < 0,05$) tra le varietà monitorate. In particolare le foglie appartenenti alle cultivar *Frantoio* e *Moraiolo* mostrano i valori più elevati per entrambi i campionamenti effettuati. Inoltre in queste cultivar così come per le foglie di *Ortice* si notano valori di RWC più bassi nel 2013 rispetto al 2012. Tale parametro risulta correlato al tenore idrico del suolo, che nel 2013 mostra per esempio il valore più basso proprio sotto la varietà *Ortice*.

Per quanto concerne la stessa varietà prelevata in stands diversi, dai dati ottenuti risulta che le foglie di *Moraiolo* nel 2013 (Tab. 5.4) hanno lo stesso RWC, sia ad Assisi che a Perugia, da qui si evince un effetto della cultivar e non del sito di campionamento. Invece, le foglie di *Pisciottana*, prelevate a Licosa, hanno registrato nel 2012 il contenuto idrico relativo più basso in assoluto (74,39%). Il suolo di tale cultivar nello stesso anno ha evidenziato il tenore idrico più basso rispetto agli altri e un pH neutro. Quindi è possibile dedurre che in condizioni di limitata disponibilità idrica il parametro RWC diminuisce e di conseguenza le foglie prelevate in siti come Licosa (Sa) sono sottoposte ad uno stress idrico maggiore rispetto alle altre. I risultati ottenuti sono in accordo con studi analoghi a questo elaborato di ricerca, condotti da Faraloni et al. (2011) e con quelli effettuati sugli ulivi della Tunisia da Guerfel et al. (2009); sono, invece, superiori agli studi effettuati da Bacelar et al. (2009).

Anche per le concentrazioni di N fogliare ed il rapporto C/N, mostrati in tabella 5.3 sono evidenti differenze significative tra le diverse cultivar e le misure dei due anni di campionamento. Innanzitutto per il 2013 (Tab. 5.3) è osservata sempre una % N maggiore rispetto al 2012, e di rapporto C/N inferiore. Per i suoli, invece è risultata una situazione completamente opposta nei due anni di campionamento e per i parametri suddetti. Tutto ciò suggerisce la presenza di possibili fenomeni di traslocazione nella pianta di *Olea europaea* L. più evidenti quando nel suolo il contenuto di N scende. I valori di N più bassi sono quelli delle foglie della *Pisciottana* mentre i più alti quelli registrati nelle foglie di *Frantoio*. I risultati sperimentali ottenuti confermano che il range di valori è in accordo con Gulias et al. (2003), secondo cui specie endemiche di *Olea europaea* L. presentano una correlazione tra valori più elevati di SLA e maggiore contenuto in N come espresso anche da Reich et al. (1997). Di conseguenza, le specie con una maggiore quantità di azoto fogliare e valori di SLA più elevati, sono caratterizzate da un alto metabolismo poiché investono più C ed N negli enzimi fotosintetici e nei pigmenti, aumentando così l'efficienza fotosintetica ma riducendo al contempo le difese fisiche verso gli agenti abiotici e biotici (Coley et al., 1985; Reich et al., 1992).

Le foglie appartenenti a *Pisciottana* presentano i valori più elevati di rapporto C/N mentre tendenzialmente i valori più bassi sono registrati per le foglie della cultivar *Frantoio*. I risultati registrati sia per il contenuto di N che per il rapporto C/N delle foglie di *Pisciottana* sono confermati nei due siti di campionamento (Tab. 5.4), Licosa e Pisciotta, il che fa supporre che sia una caratteristica intrinseca della cultivar, indipendente dal sito. Diversa è la

situazione per le cultivar *Frantoio* e *Moraiolo* dove invece differenze si evidenziano tra i due siti di campionamento, con le foglie campionate ad Assisi che mostrano le percentuali di N più alte ed il rapporto più basso.

Il rapporto C/N, fornisce informazioni sulla degradabilità delle foglie nel processo di decomposizione: valori significativamente più elevati sono stati riscontrati nelle foglie campionate nel sito di Pesciotta. Ciò potrebbe indicare la presenza di composti più recalcitranti in tale cultivar. Infatti, riprendendo il concetto di Coley et al. (1985) e Reich et al. (1992), un più alto rapporto C/N prevede un investimento della sclerofilla in carbonio strutturale.

Tabella 5.3: Caratteristiche funzionali fogliari di uliveti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. prese in esame nell'anno 2012 e 2013.

Caratteristiche funzionali delle Foglie							
Cultivar	Prelievo	LA (cm²)	SLA (cm²g⁻¹)	LDMC (g/g⁻¹)	RWC (%)	N (%)	C/N
<i>Pisciottana</i>	2012	10,41±0,46	53,64±2,03	0,44±0,01	81,26±1,80	0,66±0,06	53,52±3,82
	2013	8,53±0,19	59,27±1,88	0,39±0,01	83,27±2,78	1,52±0,05	32,26±1,04
<i>Ravece</i>	2012	5,94±0,16	55,58±1,28	0,42±0,02	83,36±1,83	1,01±0,04	40,81±1,57
	2013	7,30±0,24	58,31±1,72	0,40±0,01	83,92±1,26	2,30±0,05	21,68±0,41
<i>Ortice</i>	2012	5,93±0,31	45,35±0,89	0,50±0,01	83,94±1,56	1,16±0,11	38,81±3,69
	2013	6,54±0,24	57,61±0,92	0,43±0,02	79,67±1,41	2,03±0,08	25,60±0,83
<i>Frantoio</i>	2012	7,86±0,34	55,17±2,39	0,50±0,01	95,12±0,99	1,36±0,04	32,32±1,00
	2013	8,99±0,25	60,38±2,00	0,47±0,02	92,22±1,00	2,29±0,06	21,85±0,57
<i>Moraiolo</i>	2012	5,30±0,32	48,71±1,32	0,53±0,01	94,89±1,65	1,18±0,05	39,09±1,61
	2013	6,14±0,17	52,68±0,91	0,47±0,01	89,25±2,12	2,29±0,07	22,13±0,08

Tabella 5.4: Caratteristiche funzionali di foglie appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono a due diversi anni di campionamento: il 2012 e il 2013.

Caratteristiche funzionali delle Foglie								
Cultivar	Sito	Prelievo (Anno)	LA (cm ²)	SLA (cm ² g ⁻¹)	LDMC (g/g ⁻¹)	RWC (%)	N (%)	C/N
<i>Pisciottana</i>	Licosa	2012	6,36±0,23	53,93±1,41	0,42±0,00	74,39±1,59	0,95±0,05	41,74±1,65
		2013	7,54±0,24	57,19±0,94	0,41±0,01	91,48±0,95	1,71±0,03	29,87±0,65
	Pisciotta	2012	10,41±0,46	53,64±2,03	0,44±0,01	81,26±1,80	0,66±0,06	53,52±3,82
		2013	8,53±0,19	59,27±1,88	0,39±0,01	83,27±2,78	1,52±0,05	32,26±1,04
<i>Frantoio</i>	Assisi	2012	8,25±0,32	52,16±0,89	0,48±0,01	92,02±1,11	1,82±0,11	25,49±1,61
		2013	8,48±0,26	51,80±1,29	0,44±0,01	88,77±1,76	1,79±0,10	27,80±1,36
	Perugia	2012	7,86±0,34	55,17±2,39	0,50±0,01	95,12±0,99	1,36±0,04	32,32±1,00
		2013	8,99±0,25	60,38±2,00	0,47±0,02	92,22±1,00	2,29±0,06	21,85±0,57
<i>Moraiolo</i>	Assisi	2012	6,38±0,29	50,66±0,94	0,46±0,01	88,08±3,20	1,39±0,16	30,04±1,40
		2013	7,30±0,15	52,66±1,09	0,44±0,01	89,11±1,25	2,59±0,05	19,31±0,41
	Perugia	2012	5,30±0,32	48,71±1,32	0,53±0,01	94,89±1,65	1,18±0,05	39,09±1,61
		2013	6,14±0,17	52,68±0,91	0,47±0,01	89,25±2,12	2,29±0,07	22,13±0,08

5.4 Parametri fotochimici

Per quanto concerne la fotochimica, tutte le cultivar prese in esame hanno mostrato valori comparabili di massima efficienza fotochimica. Tale parametro esprime il rapporto tra fluorescenza massima e fluorescenza variabile (F_v/F_m) e viene largamente utilizzato in eco-fisiologia come indicatore potenziale dell'efficienza di conversione della luce ai centri di reazione nel processo fotosintetico.

Dal confronto tra cultivar è emerso che le foglie appartenenti alle varietà *Ortice* (0,78) e *Ravece* (0,76) (Fig. 5.11), sono quelle che presentano i valori più bassi e statisticamente differenti ($P < 0,05$), di F_v/F_m . Inoltre, le foglie di *Moraiolo* (Fig. 5.12), campionate ad Assisi presentano un valore di F_v/F_m pari a 0,82, mentre a Perugia 0,72. Il fatto che le foglie appartenenti alla stessa varietà presentano valori differenti fa supporre l'influenza del sito di campionamento per quanto riguarda tale parametro. Il valore di F_v/F_m , utilizzato come indice di pianta funzionalità dei fotosistemi, in condizioni fisiologiche normali per le foglie è circa 0,8 ma in condizioni di stress si può abbassare sensibilmente. Il fatto che F_v/F_m sia confrontabile per le foglie delle diverse cultivars e si mantenga prossimo al valore soglia per piante non sottoposte a stress, indica che tutte le piante misurate, indipendentemente dal luogo geografico di crescita, sono in grado di ottimizzare efficacemente i processi di cattura e conversione dell'energia luminosa.

La resa quantica del trasporto elettronico (Φ PSII), ha evidenziato lo stesso andamento del parametro F_v/F_m con le foglie appartenenti a *Ravece* e *Ortice* (Fig. 5.13), che hanno registrato i valori significativamente più bassi ($P < 0,05$) rispetto alle altre; diversamente per i parametri biologici i suoli di queste cultivar si sono distinti per biomassa e attività microbica. Secondo quanto emerge dalla letteratura, questo indica una minore efficienza di conversione della luce nel processo fotosintetico che potrebbe suggerire una più bassa attività fotosintetica e dunque una minore produttività. Le foglie di *Pisciottana* (Fig. 5.14), hanno evidenziato sia a Licosa che a Pisciotta gli stessi valori di resa quantica ossia senza differenze statisticamente significative, anche se valori leggermente più bassi sono evidenti per Licosa; comunque questo risultato potrebbe implicare che sia la varietà genetica a prevalere, rispetto alle caratteristiche ambientali del sito scelto.

I dati sperimentali raccolti, per F_v/F_m e Φ PSII, rientrano nei range ottenuti in letteratura dai lavori di Angelopoulos et al. (1996), Bacelar et al. (2009), Faraloni et al. (2011) e Loreto et al. (2003). In particolare secondo Faraloni et al. (2011), l'efficienza del PSII è

relativa allo stato idrico fogliare. Inoltre, esiste una correlazione tra la diminuzione dell'RWC e di Fv/Fm suggerendo che le variazioni in Fv/Fm possono essere considerate come un "indicatore" del valore soglia di tolleranza alla siccità per ogni cultivar di *Olea europaea* L. Infatti, i dati raccolti hanno evidenziato che le foglie appartenenti alle cv. *Ravece* e *Ortice* hanno registrato valori più bassi di RWC in concomitanza con i suddetti parametri fotochimici.

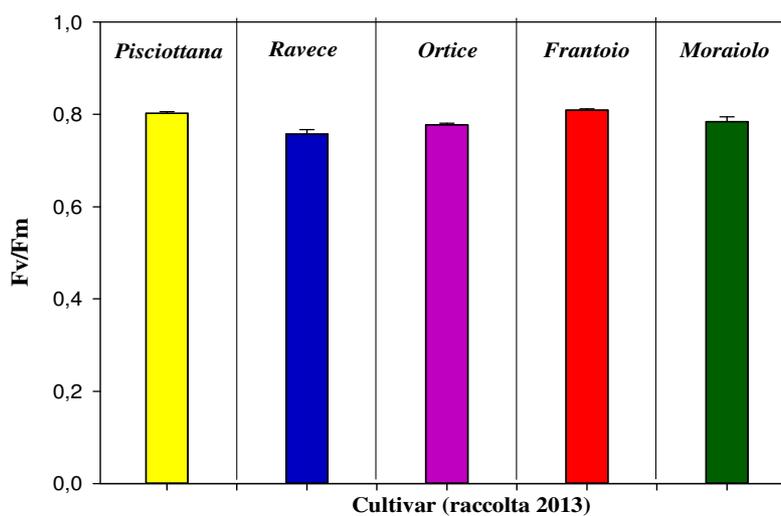


Figura 5.11: Massima efficienza fotochimica (Fv/Fm) di foglie di differenti cultivar di *Olea europaea* L. misurata nell'autunno del 2013.

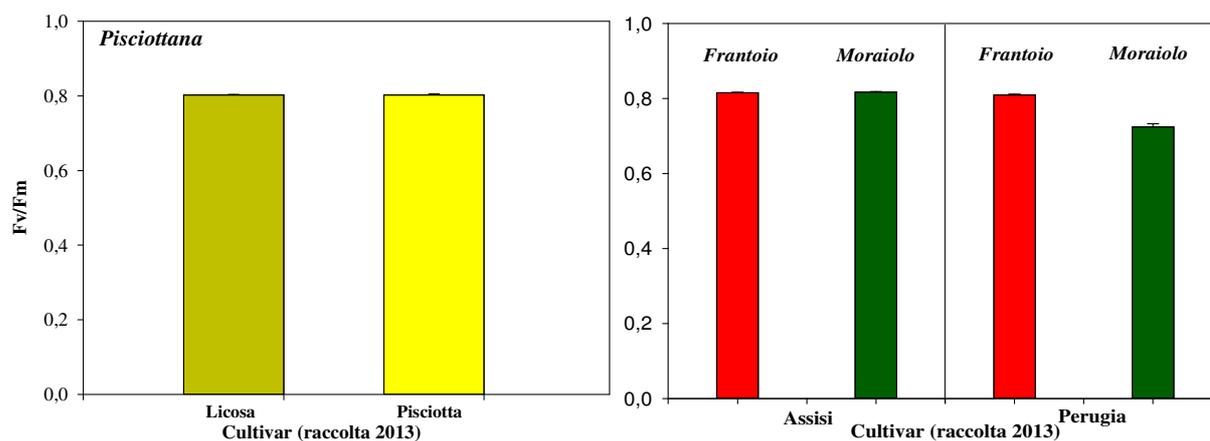


Figura 5.12: Massima efficienza fotochimica (Fv/Fm) di foglie appartenenti alla cv. *Pisciotiana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono all'anno 2013.

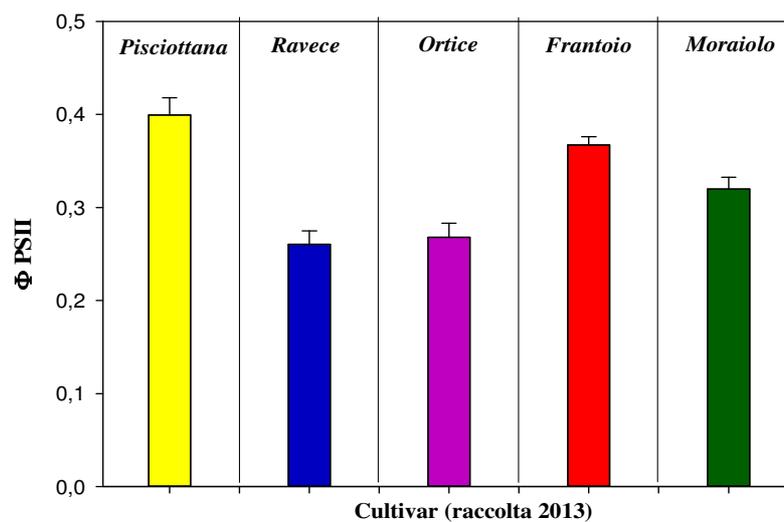


Figura 5.13: Resa quantica del trasporto elettronico (Φ_{PSII}) di foglie di differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionate nell'autunno del 2013.

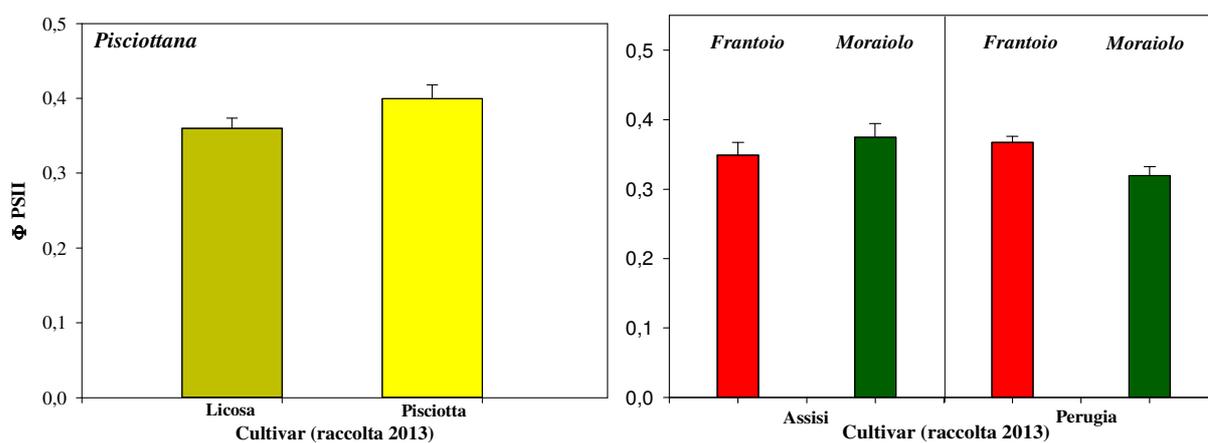


Figura 5.14: Resa quantica del trasporto elettronico (Φ_{PSII}) di foglie appartenenti alla cv. *Pisciotana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2013.

5.5 Caratteristiche chimiche dei frutti di *Olea europaea* L.

Le cultivar di olivo indagate differiscono innanzitutto nelle caratteristiche carpologiche e quella più studiata è sicuramente il rapporto polpa/nocciolo (Inglese et al., 2011; Sacchi, 2004). Tutte le cultivar esaminate (Tab. 5.5), ad eccezione dei frutti appartenenti a *Ravece*, presentano un rapporto polpa/nocciolo più elevato nel 2012 rispetto al 2013. I frutti della varietà *Ravece* presentano il valore significativamente più alto in assoluto, ciò sembra essere strettamente correlato con i parametri chimico-fisici (CIM, tenore idrico e sostanza organica) e biologici (biomassa fungina totale e microbica) del suolo e con i tratti fogliari (LA, SLA e LDMC) particolarmente favorevoli. Nei frutti delle cultivar umbre e di *Frantoio* in particolare è evidente il valore significativamente più basso, questo potrebbe suggerire una relazione con il suolo che risulta essere tra i più poveri in sostanza organica.

Comparando la stessa cultivar cresciuta in siti diversi per i frutti della *Pisciottana* (Tab. 5.6), si registrano nel 2012 e nel 2013 a Licosa differenze significative del rapporto polpa/nocciolo che presenta anche valori più alti rispetto al campione di Pisciotta. Per tutti i frutti tale rapporto risulta più basso nel 2013. Non si osservano differenze significative per questo parametro per le cultivar *Frantoio* e *Moraiolo* né tra i diversi siti di campionamento, anche se è generalmente la cultivar *Moraiolo* a mostrare i valori più alti. Questi risultati sperimentali ottenuti possono essere considerati una caratteristica intrinseca della cv. presa in esame e condizionati in misura minore dall'effetto del sito. I valori ottenuti sono inferiori a quelli di Rial et al. (2003), nel cui studio emerge che zone di coltivazione differenti appartenenti però alla stessa area geografica della Sierra Magina danno risultati diversi di tale parametro. Dato che i suoli hanno caratteristiche simili in tutte le zone campionate ed è coltivata la stessa varietà di olive, come accade per i siti cilentani e umbri, la diversità di questi risultati è attribuibile, secondo Rial et al. (2003), alle caratteristiche agro climatiche (irrigazione, piovosità, ecc.). I risultati ottenuti per il parametro polpa/nocciolo, sono inoltre confrontabili con quelli riportati da Nergiz et al. (2000) e superiori a quelli di Desouky et al. (2009). I risultati, come riportato dalla letteratura scientifica a disposizione, quindi, per questo parametro dipendono dal fatto di aver esaminato varietà genetiche diverse ma sono condizionate dalle aree produttive di provenienza (Campania e Umbria) sottoposte a diversi regimi termo pluviometrici (par. 4.1).

I frutti appartenenti sia alle cultivar campane che a quelle umbre (Tab. 5.5), hanno registrato un contenuto di acqua maggiore nel 2013 rispetto al 2012 attribuibile al diverso

regime termo pluviometrico (Paragrafo 4.1) che, per tutte le stazioni monitorate nel 2013, ha mostrato un ammontare annuale delle piogge notevolmente superiore rispetto al 2012 e di conseguenza ai valori di CIM nel suolo che aumentano dal I al II campionamento. In particolare, si distinguono i frutti appartenenti a *Ravece* (79,31%) e *Frantoio* (80,88%) per i valori statisticamente più elevati ($P < 0,005$). Queste due cultivar che crescono in condizioni edafiche completamente differenti, hanno valori simili per quanto riguarda SLA, contenuto di N e C/N.

Comparando i frutti della stessa varietà, cresciuta in siti diversi risulta che la *Pisciottana* (Tab. 5.6) sia a Licosa che a Pisciotta presenta valori simili del contenuto di umidità; la stessa situazione è emersa anche per i frutti di *Frantoio* e *Moraiolo* prelevati ad Assisi e Perugia. Questi risultati implicano una maggiore influenza da parte del fattore varietale rispetto a quello ambientale. Mousa et al. (1996), affermano, invece, che i frutti della stessa cultivar cresciuta a due diverse altitudini rilevano differenze significative nel contenuto d'acqua dei frutti. Come documentato in letteratura, (Nergiz et al., 2000; Rial et al., 2003), questo parametro è influenzato, anche, dall'ammontare delle precipitazioni e ciò è in accordo con i dati pluviometrici registrati, che riportano un incremento annuale delle precipitazioni dal 2012 al 2013.

I dati ottenuti risultano comunque sempre superiori rispetto ai lavori di Nergiz et al. (2000), Rial et al. (2003); e Unal et al. (2003) ed infine, allo studio di Farinelli et al. (2009), che riguarda proprio i frutti di *Frantoio* e *Moraiolo* raccolti nella medesima zona scelta per questo progetto. Farinelli et al. (2009), hanno evidenziato quanto è importante il monitoraggio dell'andamento pluviometrico, essendo il processo di maturazione condizionato da fattori climatici. I risultati ottenuti sono infatti superiori proprio per l'andamento climatico differente soprattutto per quanto riguarda la piovosità. Inoltre, come asseriscono Inglese et al. (2009), la corretta individuazione dell'epoca di raccolta delle olive è molto importante in quanto influenza la quantità e la qualità del prodotto, e la sua scelta deve essere fatta in funzione dell'obiettivo produttivo prefissato, in questo caso l'ottenimento di un olio di oliva di qualità.

Tabella 5.5: Caratteristiche funzionali fogliari di uliveti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. prese in esame nell'anno 2012 e 2013.

Caratteristiche chimico-fisiche dei Frutti			
Cultivar	Prelievo	Polpa/nocciolo	Umidità (% H ₂ O)
<i>Pisciottana</i>	2012	2,99±0,25	62,71±0,14
	2013	2,71±0,09	72,26±0,66
<i>Ravece</i>	2012	4,74±0,16	68,91±1,28
	2013	5,77±0,73	79,31±0,51
<i>Ortice</i>	2012	5,26±0,26	53,49±2,45
	2013	5,04±0,24	71,01±0,85
<i>Frantoio</i>	2012	3,31±0,13	56,21±0,84
	2013	2,34±0,08	80,88±0,93
<i>Moraiolo</i>	2012	4,38±0,26	54,72±1,07
	2013	3,68±0,18	75,93±0,28

Tabella 5.6: Caratteristiche funzionali di foglie appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono a due diversi anni di campionamento: il 2012 e il 2013.

Caratteristiche chimico-fisiche dei Frutti				
Cultivar	Sito	Prelievo (Anno)	Polpa/nocciolo	Umidità (% H ₂ O)
<i>Pisciottana</i>	Licosa	2012	4,21±0,15	65,68±0,72
		2013	2,93±0,22	67,48±1,83
	Pisciotta	2012	2,99±0,25	62,71±1,03
		2013	2,71±0,09	72,26±0,66
<i>Frantoio</i>	Assisi	2012	4,40±0,22	52,97±1,51
		2013	2,22±0,11	82,00±1,19
	Perugia	2012	3,31±0,13	56,21±0,84
		2013	2,34±0,08	80,88±0,93
<i>Moraiolo</i>	Assisi	2012	4,49±0,26	52,76±1,40
		2013	3,91±0,22	75,56±0,82
	Perugia	2012	4,38±0,26	54,72±1,07
		2013	3,68±0,18	75,93±0,28

Un altro parametro valutato nei frutti di *Olea europaea* L. è stato il contenuto in lipidi totali. Per entrambi gli anni di campionamento si registra una maggiore resa % in olio nei frutti appartenenti alle cultivar umbre rispetto a quelle campane (Fig. 5.15). I frutti appartenenti a *Ravece* (14,01%; P<0,05) hanno registrato i valori più bassi in assoluto mentre

quelli di *Ortice* (24,63%; $P < 0,05$) sono risultati i più alti. Differenze anche significative sono evidenti tra i due campionamenti (Fig. 5.15). Generalmente i valori registrati sono inferiori nel 2013 rispetto al 2012 con la sola eccezione della *Pisciottana*.

Per quanto riguarda la stessa cultivar cresciuta in siti diversi, emerge chiaramente che i frutti appartenenti alla *Pisciottana* (Fig. 5.16) mostrano valori più alti a Licosa ($P < 0,05$) a Licosa rispetto a Pisciotta, con differenze significative tra i due anni. Per le cultivar umbre, i frutti di *Frantoio* risultano avere un contenuto di lipidi più alto simile a *Moraiolo* in entrambi i siti di campionamento. Questi risultati potrebbero implicare che sia la varietà genetica a prevalere rispetto alle caratteristiche ambientali del sito scelto. Mousa et al. (1996), diversamente affermano che il contenuto in lipidi presenta differenze significative per le olive della stessa cultivar cresciuta in siti diversi. Nella figura 5.16 i lipidi hanno un andamento opposto negli anni tra *Pisciottana* e Umbria.

Comunque i dati sperimentali ottenuti sono risultati confrontabili con Unal et al. (2003) e Ajana et al. (1999) secondo cui la resa % in olio varia con la cultivar, il sito, il clima, le tecniche agricole e la metodica di estrazione. Inoltre, Ajana et al. (1999), comparano sia la metodo di estrazione secondo Folch che quella del Soxlet, in particolare con quest'ultima si ottengono rese inferiori, ragion per cui anche per questo progetto è stato scelto il metodo di Folch. Sakouhi et al. (2011) presentano risultati superiori a quelli ottenuti nella presente ricerca, e definiscono il contenuto lipidico strettamente dipendente dalle variazioni delle condizioni climatiche. Dal lavoro di Di Vaio et al. (2013) è risultato innanzitutto che i frutti, appartenenti alla varietà *Ortice* cresciuta in due siti a diversa altitudine, hanno una resa % in olio confrontabile con quella dei frutti campionati per questo progetto, inoltre essi ottengono contenuti lipidici diversi per i due siti. Per Di Vaio et al. (2013), il requisito chiave per ottenere il riconoscimento DOP da parte di un olio dipende dalla combinazione genetica e ambientale insieme.

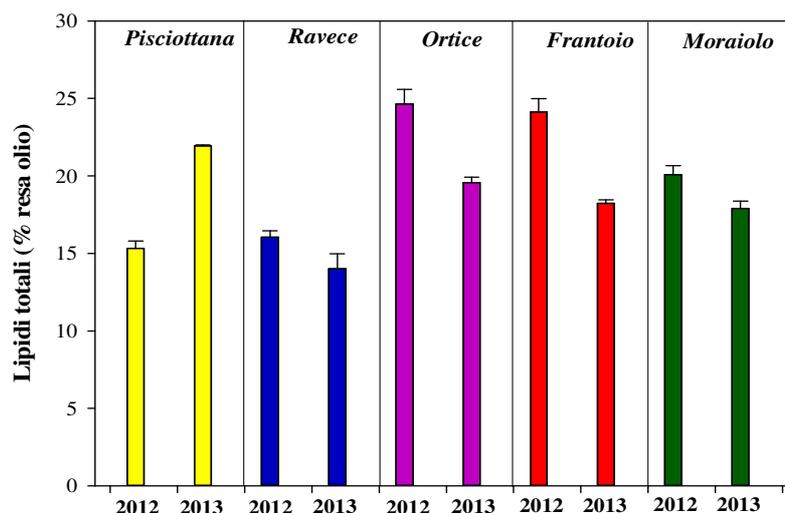


Figura 5.15: Contenuto lipidi totali nei frutti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

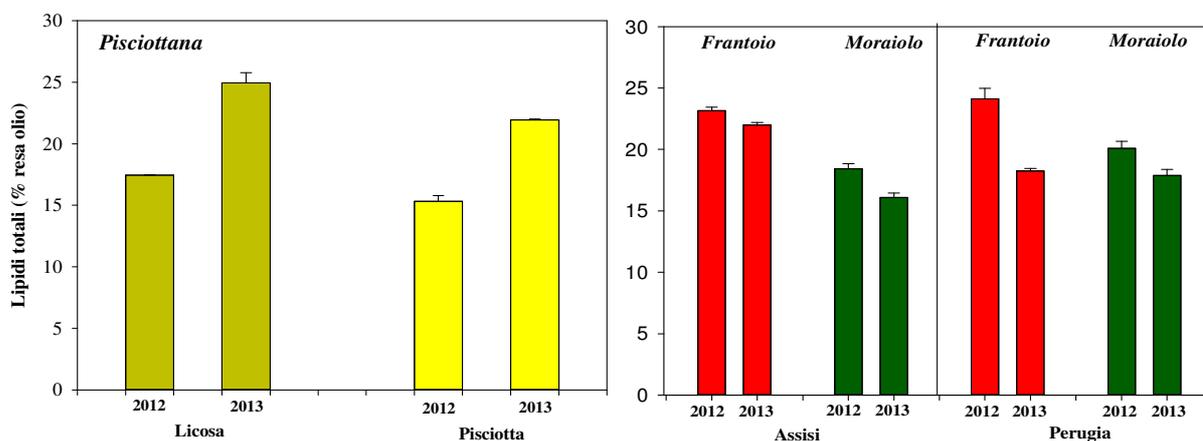


Figura 5.16: Contenuto lipidi totali nei frutti appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a Frantoio e Moraiolo nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2012 e del 2013.

Tra tutte le componenti del frutto dell'oliva, le proteine sono quelle meno conosciute, sebbene alcuni studi hanno iniziato a caratterizzare enzimi che sembrano passare nell'olio durante il processo di estrazione e possono giocare un ruolo importante nella stabilità degli stessi. In seguito al passaggio dal frutto all'olio, alcune proteine possono contribuire a migliorarli qualitativamente (Zamora et al., 2001).

Nel 2013 il contenuto di proteine totali (% N totale) dei frutti sia delle cv. campane che in quelle umbre (Fig. 5.17) è risultato più elevato rispetto al 2012, fatta eccezione per la *Pisciottana* i cui valori rimangono costanti. Le differenze più evidenti tra i due anni si ritrovano per le cultivar umbre che nel 2012 hanno un contenuto lipidico del frutto tra i più

bassi registrati e nel 2013 tra i più elevati (Fig. 5.17). I valori più elevati sono stati registrati nei frutti delle cv. *Ravece* in assoluto (Fig. 5.17). Il contenuto proteico registrato per la polpa appartenente ai frutti della *Pisciottana* è risultato essere maggiore per Pisciotta rispetto a Licosa; mentre per l'Umbria le differenze tra i siti non sono molto evidenti (Fig. 5.18). I risultati ottenuti per la *Pisciottana* potrebbero implicare che siano le condizioni ambientali del sito scelto a prevalere rispetto alla varietà genetica, mentre per le cultivar umbre sembrerebbe il contrario. L'importanza delle condizioni ambientali sono comunque evidenti nelle differenze registrate tra anni. Questo dato potrebbe risultare contrastante rispetto agli studi di Esteve et al. (2011), che affermano che le differenze nel contenuto proteico nella polpa delle varietà *Picual* e *Manzanilla de Sevilla* sono attribuibili esclusivamente alle differenze genetiche tra le cultivar. I risultati sperimentali ottenuti sono inferiori agli studi di Ajana et al. (1999) e superiori a quanto riportato da Nergiz et al. (2009).

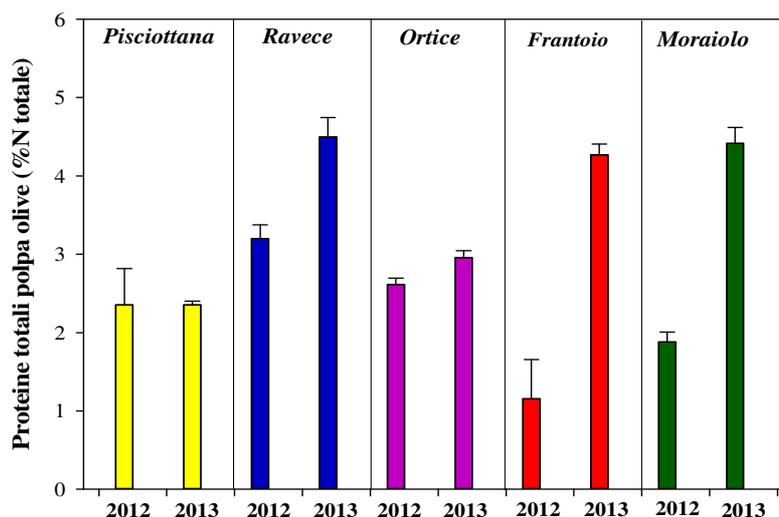


Figura 5.17: Contenuto proteine totali nella polpa dei frutti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

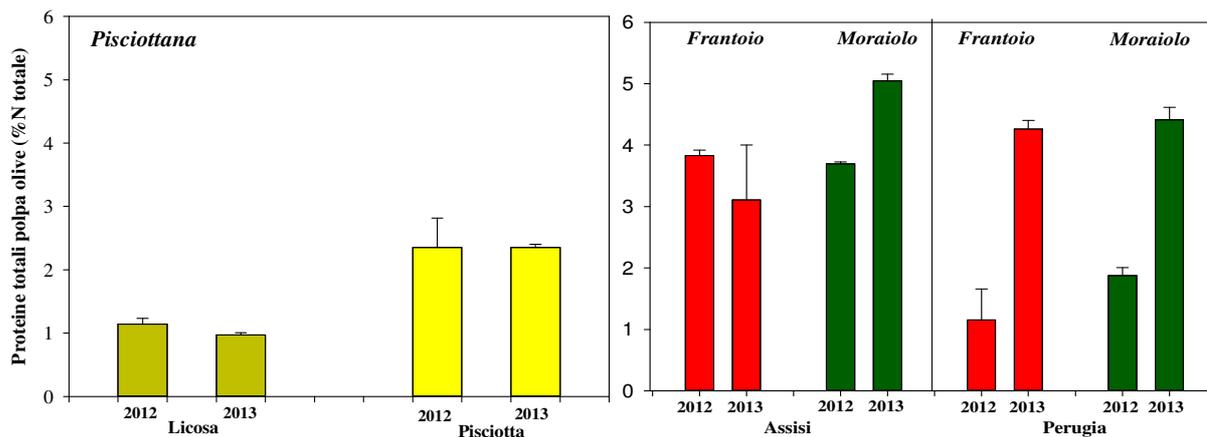


Figura 5.18: Contenuto proteine totali nella polpa dei frutti appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell’uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2012 e del 2013.

Il contenuto proteico è una parte importante del valore nutrizionale del nocciolo dell’oliva (Rodríguez et al., 2008). Dai dati sperimentali ottenuti emerge per il contenuto proteico nel nocciolo, una situazione completamente opposta rispetto a quella registrata per il contenuto proteico nella polpa dei frutti. Infatti, nel nocciolo è evidente un contenuto di N proteico maggiore per il 2012 rispetto al 2013 (Fig. 5.19). Questo andamento è correlato al contenuto di N nei suoli ma non a quello delle foglie. Il contenuto di N più elevato in assoluto è stato registrato nei frutti di *Ravece* e *Moraiolo*.

Confrontando la stessa cultivar cresciuta in siti diversi è emerso che i frutti appartenenti a *Pisciottana* (Fig. 5.20), nel 2013 hanno registrato un contenuto proteico nel nocciolo maggiore per Pisciotta rispetto a Licosa, mentre per l’Umbria le differenze tra i siti non sono molto evidenti, tranne che per i frutti appartenenti a *Moraiolo* di Assisi che nel 2012 presenta il contenuto proteico più basso. I dati acquisiti potrebbero implicare che siano le condizioni ambientali del sito scelto a prevalere su quelle varietali. I risultati ottenuti sono in accordo con Rodríguez et al. (2008), il cui studio asserisce che nel nocciolo il contenuto in proteine è più alto che nel resto del frutto dell’oliva. I dati sperimentali registrati confermano questa asserzione in particolare per il I campionamento del 2012. Zamora et al. (2001) affermano che esiste una relazione tra il contenuto di olio nel frutto e il contenuto proteico determinato. Ad un incremento del contenuto in olio corrisponde un aumento in proteine, ciò ha fatto ipotizzare ad una possibile funzione stabilizzatrice di queste proteine nei corpi oleosi del frutto. Questa “relazione” tra resa in olio e proteine totali è stata osservata, in particolare, per i frutti delle varietà umbre di *Frantoio* e *Moraiolo*.

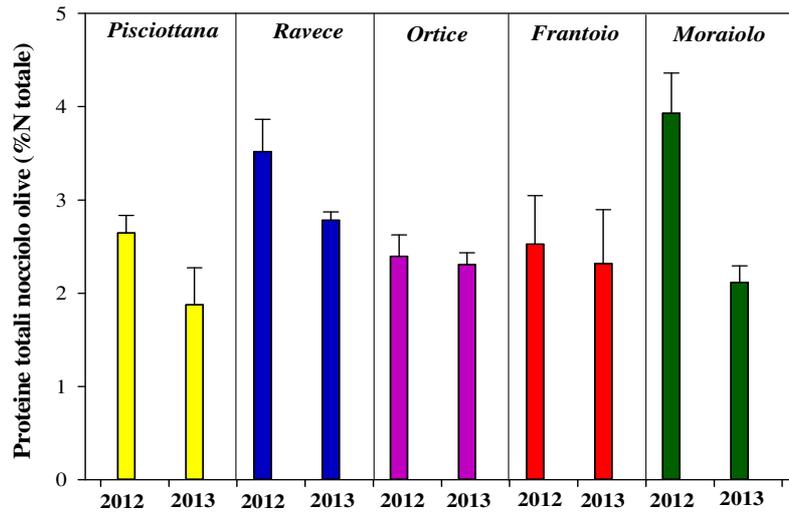


Figura 5.19: Contenuto proteine totali nel nocciolo dei frutti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

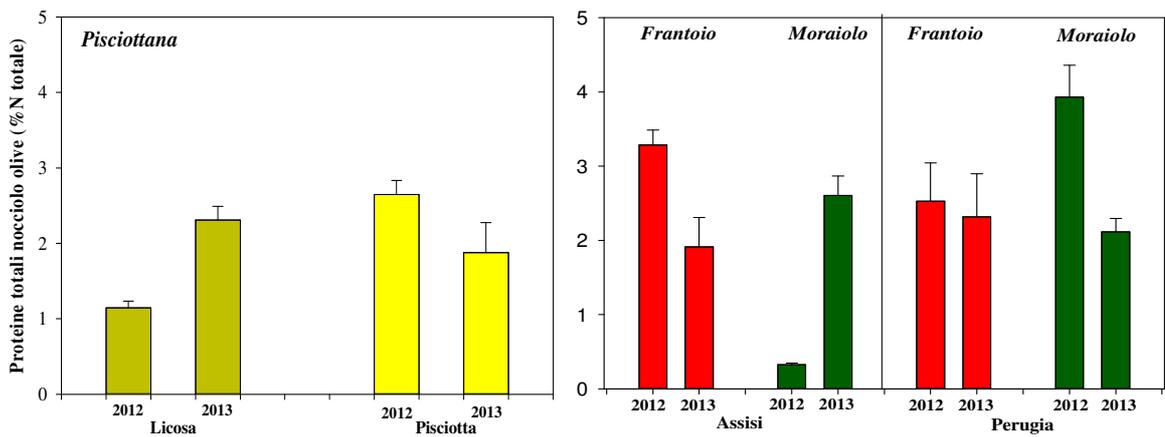


Figura 5.20: Contenuto proteine totali nel nocciolo dei frutti appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'oliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2012 e del 2013.

Altro parametro considerato in questa ricerca è stato il contenuto in polifenoli totali estratti dalla polpa dei frutti di *Olea europaea* L. I composti fenolici sono metaboliti secondari delle piante biosintetizzati attraverso il *pathway* dell'acido scichimico (Conde et al., 2008). Gli alti livelli di sostanze fenoliche presenti nelle olive aumentano le proprietà nutrizionali del risultante olio ed inoltre contribuiscono agli effetti salutistici ben conosciuti della Dieta Mediterranea (Conde et al., 2008).

Dal presente studio è emerso che il contenuto in polifenoli totali ha registrato valori maggiori nel 2012 rispetto al 2013 (Fig. 5.21). I frutti appartenenti a *Pisciottana* hanno evidenziato il valore statisticamente più elevato, mentre complessivamente sono i frutti di *Ravece* ad avere i valori più bassi ($P < 0,05$). Confrontando il dosaggio dei polifenoli totali della stessa cultivar cresciuta in siti diversi è risultato che i frutti di *Pisciottana* (Fig. 5.22) campionati a Licosa presentano un incremento di tale parametro dal 2012 al 2013, contrariamente a quanto registrato per gli altri frutti. Inoltre, i valori misurati nei frutti di Licosa sono tendenzialmente più bassi rispetto a quelli campionati a Pisciotta. per quanto riguarda i siti umbri (Fig. 5.22), i frutti della cv. *Frantoio* hanno valori molto simili ad Assisi e Perugia; i frutti della cv. *Moraiolo* presentano invece un andamento più variabile. Una certa dipendenza del contenuto in polifenoli totali dalle condizioni climatiche ed edafiche del sito è evidente. Infatti, il 2012 è stato meno piovoso del 2013, i suoli sono risultati più ricchi in sostanza organica e CSC, quindi presentano un livello nutrizionale più alto; per le foglie sono emersi valori di LDMC più elevati, che sottintendono un maggior investimento da parte della pianta nelle strutture e in una migliore allocazione delle risorse nella biomassa. Queste relazioni dal punto di vista agroecologico portano alla presenza di maggiori sostanze antiossidanti nel frutto. I risultati ottenuti sono superiori rispetto a quelli di Hajimohmoodi et al. (2008), uno dei pochi studi effettuati in letteratura che mette in relazione il contenuto in polifenoli totali con l'attività antiossidante. Boskou et al. (2006) effettuano uno studio simile ma ottengono dosaggi superiori di polifenoli totali rispetto a quelli del presente elaborato di ricerca. Entrambi i lavori scientifici insieme a Garcia-Salas et al. (2010) e Inglese et al. (2011) asseriscono che la componente fenolica varia a seconda della cultivar e delle condizioni pedo-ambientali e quindi, sostanzialmente i due fattori sono concomitanti.

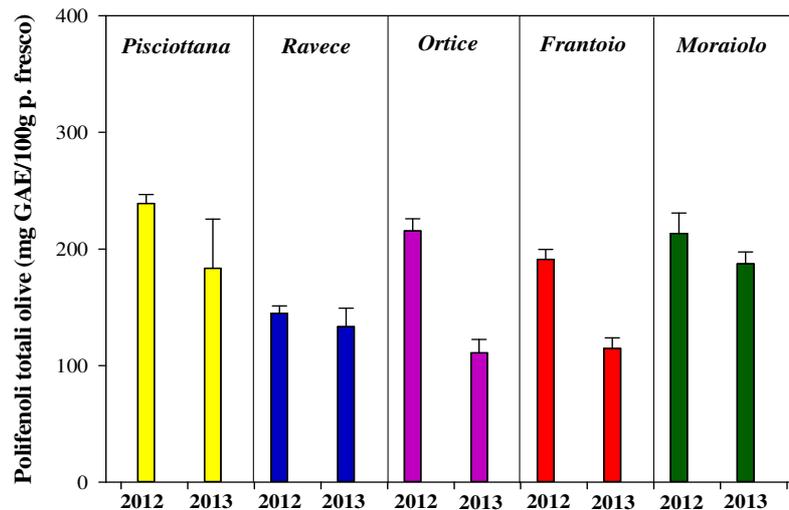


Figura 5.21: Contenuto polifenoli totali dei frutti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

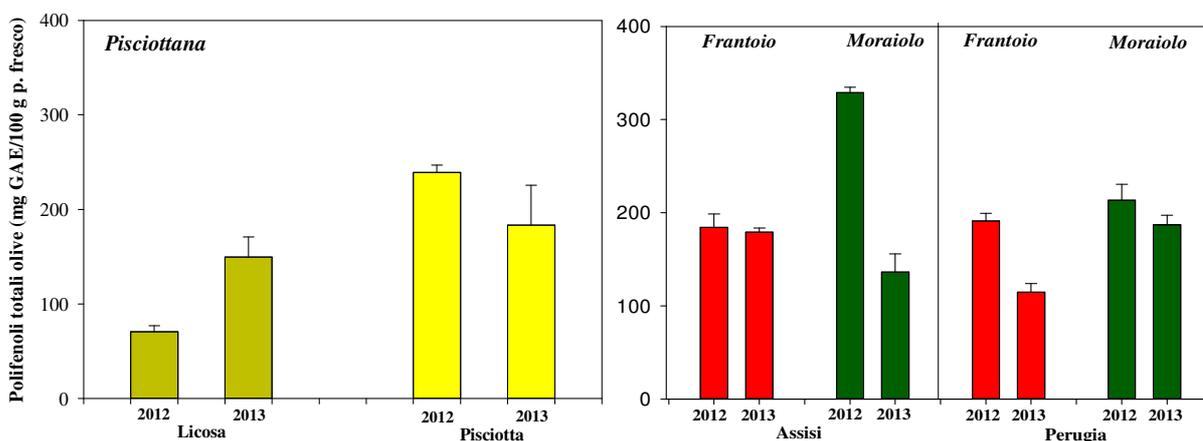


Figura 5.22: Contenuto polifenoli totali nei frutti appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2012 e del 2013.

L'attività antiossidante saggiata con il FRAP, evidenzia lo stesso andamento del profilo fenolico. L'attività maggiore è risultata nel 2012 in modo simile tra tutti i frutti delle varietà prese in esame (Fig. 5.23), fatta eccezione per *Ravece*. Il valore più alto è ottenuto nei frutti della varietà *Pisciottana* e il più basso in quelli appartenenti a *Frantoio*; entrambi le differenze non risultano comunque significative. Andamenti del profilo fenolico diversi nel tempo sono invece evidenti nel saggio FRAP realizzato per i frutti appartenenti alla stessa cultivar cresciuta in località differenti, sia per *Pisciottana* campionata a Licosa e a Pisciotta, che per *Frantoio* e *Moraiolo*, i cui frutti sono stati prelevati ad Assisi e Perugia (Fig. 5.24). significativamente più bassi risultano i valori registrati per i frutti di Licosa rispetto a quelli di

Pisciotta. Anche le differenze tra *Frantoio* e *Moraiolo* vengono nei due siti di campionamento umbri. I risultati sperimentali ottenuti evidenziano *in primis* una relazione tra composizione fenolica e attività antiossidante; in secondo luogo la stretta relazione tra questo parametro e le condizioni climatiche ed edafiche del sito che sembrano prevalere sul fattore varietale. Il range di valori ottenuti per la capacità antiossidante è superiore a quanto riportato da Fu et al. (2011) e da Hajimahmoodi et al. (2008). Studi simili a questo, come quello di Boskou et al. (2006), affermano che l'attività antiossidante delle olive varia moltissimo in conseguenza non solo del fattore varietale e pedo-ambientale, ma anche rispetto al saggio utilizzato per testarla.

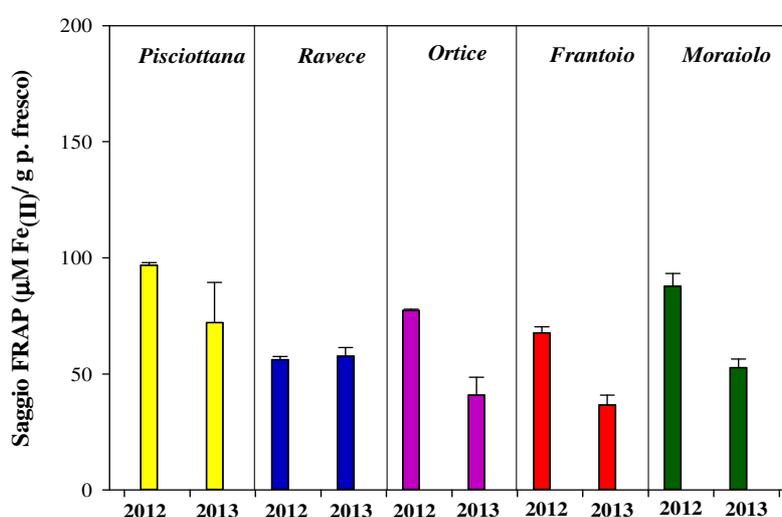


Figura 5.23: Attività antiossidante dei frutti di differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

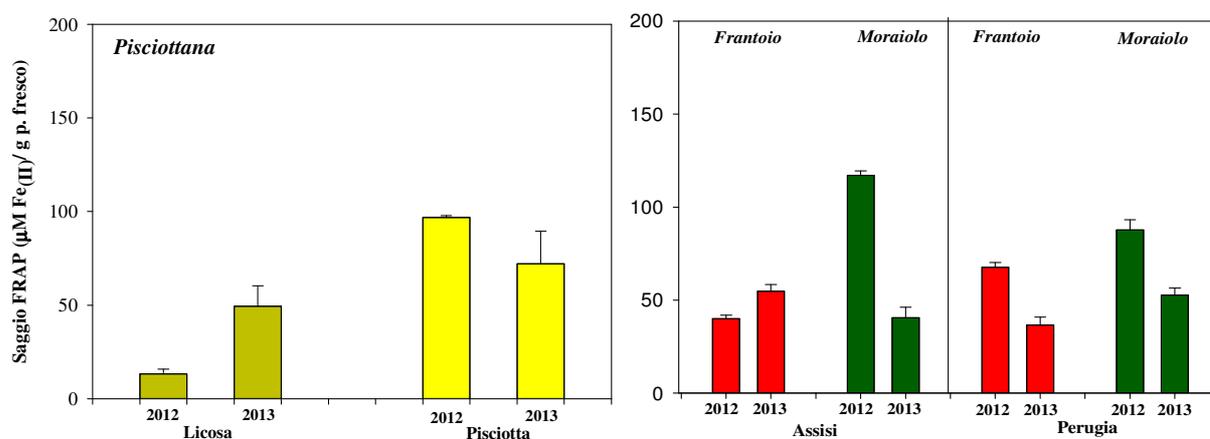


Figura 5.24: Attività antiossidante nei frutti appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2012 e del 2013.

5.6 Valutazione degli indici di qualità di oli estratti da *Olea europaea*

L.

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi chimico-compositive sui campioni di olio appartenenti alle varietà *Pisciottana*, *Ravece*, *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo*. Tali analisi sono state effettuate al fine di verificare il rispetto dei requisiti dei parametri chimici stabiliti dal regolamento CE 1989/03 (Tab. 4.1). Il parametro dell'acidità libera è alla base della classificazione merceologica degli oli vergini e per gli oli extravergini esso deve risultare inferiore a 0,8% (Tab. 4.1). In tabella 5.6 sono stati riportati i valori del primo indice di qualità considerato: l'acidità libera, espressa come % di acido oleico.

Dall'osservazione dei dati si osserva che gli oli estratti in laboratorio, dalle diverse varietà hanno registrato valori di acidità libera inferiore ai limiti massimi permessi dalla legge, rientrando per tale parametro, nella categoria degli oli extravergini, ossia gli oli caratterizzati dalle migliori qualità.

Il contenuto di acido oleico (%) segue un andamento variabile per tutte le varietà prese in esame (Tab. 5.7), sia per il 2012 che per il 2013. Il contenuto più basso è stato osservato negli oli ottenuti dalle varietà *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo*, nonostante i suoli sotto le suddette cultivar siano tra i più poveri in sostanza organica e CSC. La % di acido oleico sembra essere correlata con lo SLA, LDMC e il rapporto C/N fogliare e il contenuto di polifenoli totali dei frutti appartenenti a queste cultivar. Di conseguenza, si potrebbe dedurre che la pianta, investendo in una maggiore allocazione delle risorse nella biomassa, è in grado di produrre una quantità maggiore di metaboliti secondari (sostanze fenoliche) che insieme all'acido oleico contribuiscono a caratterizzare un olio di qualità.

Comparando gli oli appartenenti alla stessa cultivar cresciuta in siti diversi, si osserva che gli oli appartenenti alla cv. *Pisciottana* hanno registrato valori simili di acido oleico, sia per *Pisciotta* che per *Licosa* (Tab. 5.8); lo stesso emerge dagli oli della cv. *Frantoio*, campionati ad Assisi e Perugia, di conseguenza sembra che per questo parametro a prevalere è il fattore varietale su quello ambientale. Per gli oli appartenenti a *Ravece* e *Ortice*, i risultati ottenuti sono maggiori rispetto a quelli riportati da Barbarisi et al. (2014), nel cui studio non vi erano variazioni significative da un anno all'altro di campionamento; l'acidità misurata per questa cultivar è elevata anche rispetto ai valori registrati da Jiménez et al. (2013) e da Rial et al. (2003). Inoltre, risultano confrontabili con Fadda et al. (2012) e Di Vaio et al. (2013), i quali non rilevano sostanziali differenze nella % di acido oleico per la cv. *Ortice* cresciuta in siti

diversi, di conseguenza anche qui, come nel presente progetto, a prevalere è il fattore varietale su quello ambientale. Inoltre, secondo quanto riportato da Inglese et al. (2011), il contenuto di acido oleico è maggiore nelle aree più calde dell'Italia meridionale rispetto a quelle più fredde dell'Italia settentrionale. Ciò è quanto emerge dai dati ottenuti nel corso di questo Dottorato, dove il contenuto è maggiore nei siti cilentani rispetto a quelli umbri.

Il numero di perossidi è una misura dell'ossidazione primaria di un olio, seguita poi da una ossidazione secondaria che consiste nella decomposizione degli idroperossidi con formazione di aldeidi e chetoni responsabili del difetto di rancido. Il numero di perossidi come l'acidità si mantiene sempre al di sotto del valore soglia di 20 stabilito dal Regolamento Europeo per tutte le cultivar prese in esame.

Nel 2013 si ha un numero di perossidi con valori generalmente più alti rispetto al 2012 (Tab. 5.7), ad eccezione di *Moraiolo* ($P < 0,05$) e *Pisciottana* che presentano un valore invariato nel I e II campionamento. Questo parametro segue lo stesso andamento delle caratteristiche chimico-fisiche dei frutti (polpa/nocciolo e contenuto di umidità) e tali risultati possono essere attribuiti alla maggiore abbondanza di precipitazioni registrate nel 2013. Infatti, come riportato da Mousa et al. (1996), l'ammontare delle piogge è uno dei principali fattori ambientali che influisce su questo indice di qualità. Per quanto riguarda la stessa cultivar cresciuta in siti differenti si osserva che gli oli appartenenti a *Pisciottana* presentano un'ossidazione maggiore nel sito di Licosa (Tab. 5.8); questa diversità potrebbe essere attribuibile non solo a fattori abiotici, citati poc'anzi, ma anche a quelli biotici, in particolare la presenza di *Sus scrofa* L. che evidentemente si ripercuote non solo sulle caratteristiche chimiche e biologiche dei suoli (pH, biomassa e attività microbica, qCO_2 e CEM) ma anche su quelle funzionali delle foglie (RWC, % N, C/N) e su quelle chimiche degli oli, incrementandone così il grado di ossidazione primaria. Gli oli estratti dalla varietà *Frantoio*, presentano un numero di perossidi invertito tra il 2012 e 2013, nei territori di Assisi e Perugia. I dati ottenuti risultano confrontabili con Di Vaio et al. (2013); Farinelli et al. (2009) e Rial et al. (2003), i cui studi evidenziano un'influenza maggiore del fattore varietale rispetto a quello ambientale nel determinare il numero di perossidi. Inoltre, risultano inferiori a Desouky et al. (2009) e Mousa et al. (1996) per uliveti che appartengono alla stessa cultivar cresciuta a due diverse altitudini.

Gli indici spettrofotometrici (ΔK , K_{232} e K_{270}) rientrano ampiamente nei limiti stabiliti dalla normativa CE 1989/2003 per tutte le cultivar esaminate (Tab. 5.7). Come per gli altri

due indici di qualità, sono evidenti valori più alti nel 2013 rispetto al 2012 e per gli oli appartenenti alle cultivar campane rispetto a quelle umbre. Confrontando siti diversi in cui è stata campionata la stessa cultivar risulta che tutti i ΔK sono negativi ad eccezione di Licosa che presenta anche il K_{232} più alto. Questo sito, disturbato dall'attività di sovrappascolo del cinghiale va ad influenzare anche questo parametro, come quello precedente. Questi due indici spettrofotometrici, insieme al numero di perossidi, confermano un grado di ossidazione primaria più avanzato che è possibile osservare maggiormente negli oli di *Pisciottana* prelevati a Licosa (Tab. 5.8), rispetto a tutti gli altri. I restanti oli appartenenti alle cultivar *Frantoio* e *Moraiolo* presentano valori simili per entrambi i siti in cui sono stati campionati. Questo è in accordo con quanto affermato da Di Vaio et al. (2013), secondo i quali gli indici di qualità dipendono principalmente dalla varietà genetica esaminata. Altri valori confrontabili con quelli del presente progetto risultano essere quelli di Desouky et al. (2009); Jimenéz et al. (2013) e Fadda et al. (2012) confermano l'importanza della cultivar. È possibile infine, osservare, che tutti gli indici di qualità presi in esami finora (acidità libera, numero perossidi e indici spettrofotometrici) sono più alti negli oli estratti dalle varietà campane, rispetto a quelle umbre; questi risultati concordano con gli studi di Dabbou et al. (2010), secondo cui l'area di coltivazione ed in particolare le condizioni macroclimatiche che possono influenzare questi parametri qualitativi notevolmente.

Tabella 5.7: Indici di qualità degli oli estratti da differenti cultivar di *Olea europaea* L. prese in esame nell'anno 2012 e 2013.

Indici di qualità degli Oli						
Cultivar	Prelievo	Acidità libera (% Acido oleico)	Perossidi (meqO ₂ /kg olio)	ΔK	K_{232}	K_{270}
<i>Pisciottana</i>	2012	0,76±0,03	8,46±0,02	-0,015±0,04	1,58±0,04	0,15±0,02
	2013	0,56±0,01	8,89±0,15	-0,002±0,01	2,02±0,01	0,16±0,07
<i>Ravece</i>	2012	0,48±0,02	6,45±0,05	-0,003±0,01	1,83±0,01	0,21±0,02
	2013	0,76±0,03	8,54±0,71	-0,002±0,01	1,62±0,06	0,16±0,05
<i>Ortice</i>	2012	0,32±0,03	7,42±0,48	-0,004±0,02	2,03±0,04	0,22±0,02
	2013	0,51±0,04	13,56±0,22	-0,002±0,02	1,76±0,12	0,16±0,04
<i>Frantoio</i>	2012	0,28±0,02	8,27±0,30	-0,006±0,01	1,60±0,02	0,23±0,01
	2013	0,45±0,01	10,12±0,68	-0,005±0,01	1,20±0,02	0,07±0,01
<i>Moraiolo</i>	2012	0,48±0,03	7,50±0,19	-0,004±0,01	1,58±0,05	0,22±0,01
	2013	0,30±0,01	6,98±0,20	-0,039±0,03	1,57±0,03	0,12±0,03

Tabella 5.8: Indici di qualità di oli appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono a due diversi anni di campionamento: il 2012 e il 2013.

Indici di qualità degli Oli							
Cultivar	Sito	Prelievo (Anno)	Acidità libera (% Acido oleico)	Perossidi (meqO ₂ /kg olio)	ΔK	K ₂₃₂	K ₂₇₀
<i>Pisciottana</i>	Licosa	2012	0,78±0,04	10,09±0,17	-0,001±0,01	1,93±0,03	0,20±0,01
		2013	0,68±0,01	12,44±0,53	0,010±0,04	2,00±0,02	0,19±0,01
	Pisciotta	2012	0,76±0,03	8,46±0,02	-0,015±0,04	1,58±0,04	0,15±0,02
		2013	0,56±0,01	8,89±0,15	-0,002±0,01	2,02±0,01	0,16±0,07
<i>Frantoio</i>	Assisi	2012	0,33±0,07	10,21±0,26	-0,004±0,03	1,75±0,09	0,18±0,05
		2013	0,34±0,01	8,68±0,39	-0,004±0,01	1,28±0,04	0,08±0,02
	Perugia	2012	0,28±0,02	8,27±0,30	-0,006±0,01	1,60±0,02	0,23±0,01
		2013	0,45±0,01	10,12±0,68	-0,005±0,01	1,28±0,04	0,07±0,01
<i>Moraiolo</i>	Assisi	2012	0,23±0,04	6,36±0,09	-0,003±0,01	1,93±0,02	0,20±0,04
		2013	0,61±0,04	5,56±0,78	-0,008±0,01	1,41±0,03	0,10±0,01
	Perugia	2012	0,48±0,03	7,50±0,19	-0,004±0,01	1,58±0,05	0,22±0,04
		2013	0,30±0,01	6,98±0,20	-0,039±0,03	1,57±0,03	0,12±0,03

5.7 Caratteristiche biochimiche degli oli extravergini di oliva

Gli oli extravergini di oliva sono dotati di un patrimonio di componenti antiossidanti naturali particolarmente attivi (Saitta et al., 2009) e a differenza degli altri oli alimentari posseggono un gruppo di sostanze efficaci nella stabilizzazione antiossidante: i polifenoli (Mendez et al., 2007).

Il contenuto di polifenoli totali negli oli presenta un andamento completamente opposto a quello nei frutti risultando maggiore nel 2012 rispetto al 2013 (Fig. 5.26). Inoltre, gli oli estratti dalle cultivar umbre hanno una quantità più elevata di sostanze fenoliche rispetto a quelle campane. Il contenuto maggiore è stato rilevato negli oli appartenenti alla varietà *Frantoio* ($P < 0,05$), pari a 294,20 mg GAE/Kg olio, mentre quello significativamente più basso nell'olio della *Pisciottana* (61,38 mg GAE/Kg olio).

Effettuando una comparazione per quanto riguarda la stessa cultivar cresciuta in siti diversi, per la *Pisciottana* sono emersi oli con un contenuto di polifenoli totali più basso a Licosa rispetto all'olio di Pisciotta (Fig. 5.27). Dal confronto degli oli umbri invece, non emerge alcuna differenza nei due diversi siti di produzione. Anche per questo parametro le condizioni climatiche giocano un ruolo importante testimoniato dal fatto che il 2013 è un

anno maggiormente piovoso rispetto al 2012, il che risulta in relazione con la diminuzione nel contenuto di polifenoli totali registrata in tutte le cultivar esaminate. In letteratura, il ruolo dei diversi fattori sul contenuto di polifenoli totali è controverso; alcuni ritengono particolarmente determinanti le condizioni ambientali altri il genotipo; tuttavia in seguito a precipitazioni abbondanti, è stata spesso osservata una riduzione di tali sostanze negli oli extravergini di oliva (Inglese et al., 2011; Vinha et al., 2005). Questo decremento osservato anche nelle cultivar esaminate per questo progetto, sembra essere correlato al contenuto idrico e di sostanza organica sotto i suoli; allo SLA delle foglie di *Frantoio* che mostra il valore più elevato in assoluto, e che insieme a quelli di Fv/Fm e Φ PSII suggerisce una produttività maggiore. Il dosaggio di polifenoli totali sembra essere correlato anche ad altri parametri, fortemente influenzati anch'essi dalle condizioni climatiche, in particolare il rapporto polpa/nocciolo e il contenuto di umidità nei frutti degli ulivi esaminati. I risultati acquisiti in questa ricerca hanno registrato valori ritenuti inferiori a quelli ottenuti da Mousa et al. (1996), da Ocakoglu et al. (2009) e da Paz-Aguilera et al. (2005), che eseguono lo stesso dosaggio di polifenoli realizzato per questo progetto, su varietà non italiane, mentre sono risultati confrontabili con Cinquanta et al. (1996) e Del Caro et al. (2006), i quali hanno valutato non solo il contenuto di polifenoli totali, ma anche di quelli specifici tenendo in considerazione fattori quali la cultivar, il tempo di raccolta e l'area di origine.

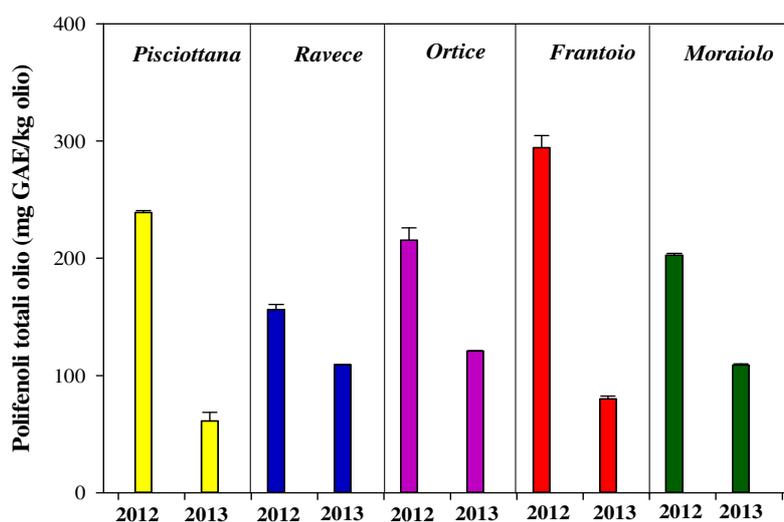


Figura 5.26: Contenuto polifenoli totali di oli estratti da differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2012 e del 2013.

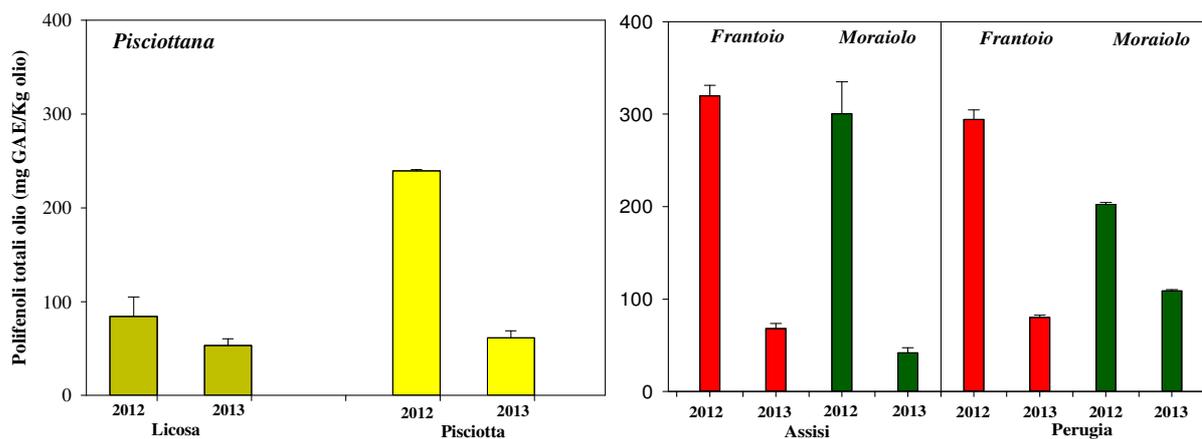


Figura 5.27: Contenuto polifenoli totali di oli appartenenti alla cv. *Pisciottana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2012 e del 2013.

Le clorofille e i carotenoidi sono pigmenti con attività antiossidante fondamentale per la stabilità dell'olio vergine di oliva e sono responsabili del colore dell'olio, che è uno dei fattori che influenza la selezione da parte dei consumatori ed è quindi considerato come un parametro di qualità dell'olio (Issaoui et al., 2009).

Dall'insieme dei dati sperimentali acquisiti è evidente che in tutte le cultivar prese in esame, come per i polifenoli totali degli oli, il contenuto in carotenoidi (Fig. 5.28) è sempre maggiore negli oli umbri rispetto a quelli campani. Gli oli appartenenti alla cultivar *Pisciottana* (Fig. 5.29), hanno registrato per il contenuto in carotenoidi valori diversi per Licosa e Pisciotta; in particolare gli oli di Licosa presentano un contenuto di carotenoidi più basso rispetto a quelli di Pisciotta. Differenze sono evidenti anche per gli oli estratti dalle varietà *Frantoio* e *Moraiolo*, campionate ad Assisi e Perugia (Fig. 5.29), anche se l'andamento di questo parametro varia nei siti con le due cultivar.

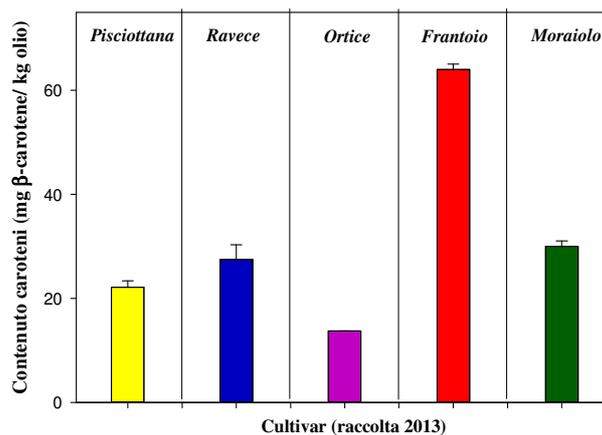


Figura 5.28: Contenuto carotenoidi in oli estratti da differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2013.

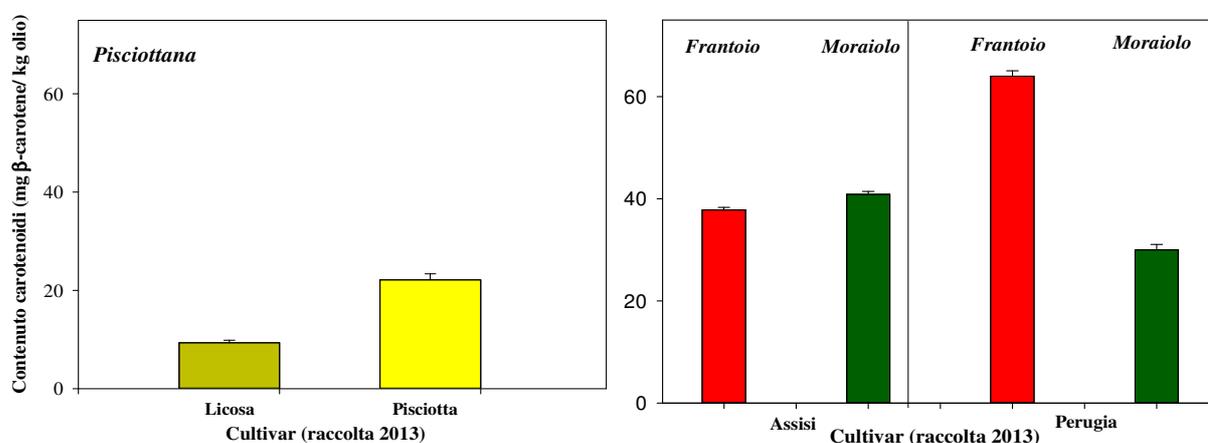


Figura 5.29: Contenuto carotenoidi in oli appartenenti alla cv. *Pisciotiana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2013.

Nel corso di questo progetto, è emerso che in tutte le varietà considerate, il contenuto in carotenoidi è sempre maggiore rispetto a quello delle clorofille (Fig. 5.30), ed inoltre, gli oli umbri presentano un contenuto maggiore di questo pigmento rispetto a quelli campani. Analogamente a quanto registrato per il contenuto in carotenoidi, anche per le clorofille nel Cilento, gli oli di *Pisciotiana* hanno registrato un contenuto nel sito di Licosa rispetto a quello di Pisciotta; situazione analoga ai carotenoidi anche per gli oli in Umbria di *Frantoio* e *Moraiolo* (Fig. 5.31). Questi risultati confermano il ruolo predominante del fattore ambientale del sito scelto per il campionamento, rispetto a quello varietale. In accordo con gli studi di Tura et al. (2007), è la componente ambientale ad influenzare maggiormente il contenuto di questi pigmenti, soprattutto nel momento in cui la tecnica di estrazione degli oli è la stessa per

tutte le varietà. I dati ottenuti risultano inferiori a Issaoui et al. (2009) e Mincione et al. (1996); sono invece, confrontabili con Bubola et al. (2012) e Gomez-Alonso et al. (2007).

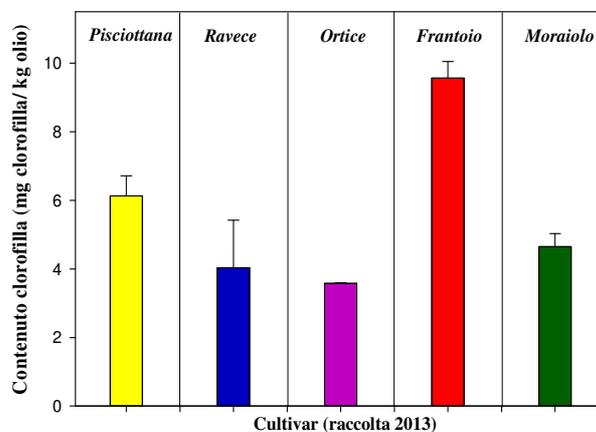


Figura 5.30: Contenuto clorofille in oli estratti da differenti cultivar di *Olea europaea* L. campionati nell'autunno del 2013.

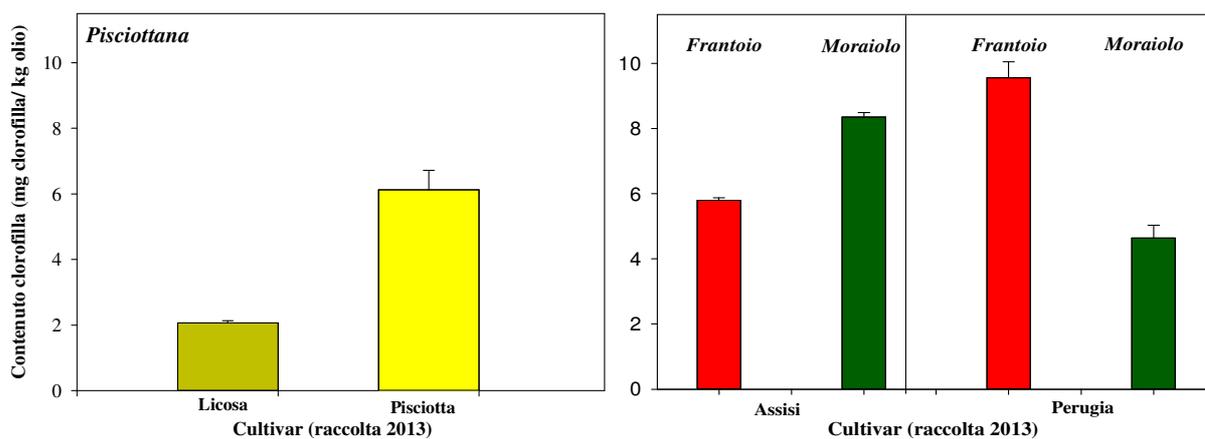


Figura 5.31: Contenuto clorofille in oli appartenenti alla cv. *Pisciotana* nei siti di Licosa e Pisciotta e a *Frantoio* e *Moraiolo* nell'uliveto misto di Assisi e negli uliveti puri di Perugia. I dati si riferiscono al campionamento del 2013.

5.8 Licosa: effetto dell'azione del cinghiale

Nei paragrafi precedenti spesso sono state evidenziate per il sito di Punta Licosa delle differenze rispetto agli altri siti ed in particolare rispetto a Pisciotta. L'area di Punta Licosa è interessata dalla presenza di diversi gruppi familiari di cinghiali, con una densità stimata intorno a 10 ind/km² (Piano di Azione per la Gestione del Cinghiale (*Sus scrofa*) nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano). Per evidenziare l'effetto eventuale della presenza e del disturbo del pascolo di *Sus scrofa*, i campionamenti in questa zona sono stati realizzati sia sotto gli ulivi interessati dalle grufolate dei cinghiali, denominati (Ulivi Grufolati - UG), sia sotto alberi in cui non erano evidenti segni marcati del passaggio di questi animali (Ulivi Non Grufolati - UNG). Il grufolare, tipico dei cinghiali, è l'abitudine di cercare cibo nel suolo usando il grugno per rivoltare il terreno, causando in questo modo grandi danni alle colture e ai terreni mediante lo scavo di buche e devastando i campi coltivati (Fratoni et al., 1984).

Caratteristiche chimico-fisiche di suoli sottoposti all'azione di *Sus scrofa*

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi chimico-fisiche sotto i suoli degli ulivi grufolati e non grufolati di Licosa appartenenti alla varietà *Pisciottana*.

La capacità idrica massimale ha registrato nel suolo grufolato (UG) sotto la cv. *Pisciottana* (Fig. 5.32), un valore più alto (28,93%) rispetto a quello non grufolato (26,69%) ma le differenze risultano non significative; analoghe sono le differenze per il tenore idrico (dati non mostrati). Le grufolate del cinghiale sembrano indurre solo un leggero incremento della capacità idrica dei suoli indagati. Da uno studio condotto da Yong-Zhong et al. (2005), in accordo con i risultati sperimentali acquisiti, si riscontra un valore più alto del contenuto d'acqua nel suolo soggetto al pascolo di erbivori a causa del prelievo della vegetazione e la rimozione della frazione fine del suolo. Questo risultato può essere anche legato al fatto che la grufolata del cinghiale smuove il terreno, ne incrementa l'assorbimento dell'acqua e riporta in superficie il terreno più profondo e umido.

Il pascolo del cinghiale comporta un incremento del contenuto di sostanza organica (Fig. 5.32) rispetto al suolo (UNG) non sottoposto a questo disturbo. Anche in questo caso le differenze non sono significative.

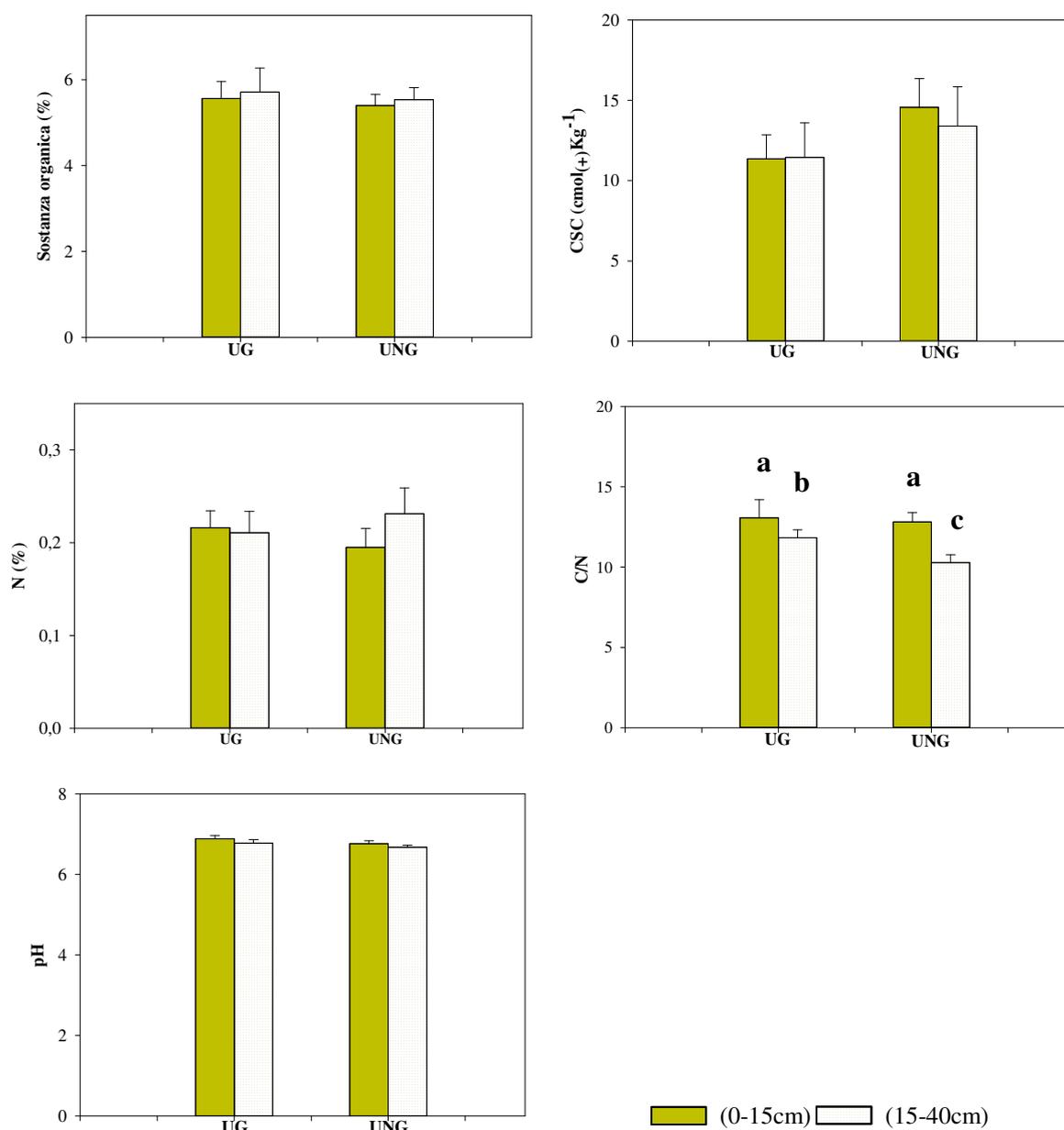


Figura 5.32: Caratteristiche chimico fisiche dei suoli di ulivi sotto della cv. *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG).

I dati riportati in grafico sono medie stagionali, che attenuano le differenze molto più evidenti tra i due suoli nel periodo primaverile/estivo quando il disturbo è più intenso (dati non mostrati). Inoltre si osserva un contenuto maggiore di sostanza organica a profondità più elevate probabilmente da associare sia all'attività radicale maggiore a questa profondità che al continuo rimescolamento del suolo causato dalle grufolate. In letteratura, gli effetti del pascolo sul contenuto di materia organica del suolo sono variabili (Milchunas et al., 1993).

Una delle motivazioni per cui, spesso come conseguenza del pascolo, si ha la diminuzione della materia organica nell'orizzonte superficiale (Xie et al., 2004) è la compattazione, processo dovuto al calpestio degli organismi pascolatori, nonché alla riduzione della necromassa vegetale che viene asportata dai pascolatori.

La capacità di scambio cationico (CSC) registrata sotto i suoli non grufolati è più alta rispetto a quella dei suoli sottoposti all'azione di *Sus scrofa* (Fig. 5.32). Questo risultato è in accordo con Briske et al. (1995), secondo cui il pascolo intensivo per un lungo periodo di tempo può comportare una diminuzione degli elementi nutritivi nel suolo. Le grufolate spongono maggiormente il suolo a fenomeni di lisciviazione e a perdite di nutrienti.

Il pH (Fig. 5.32) mostra valori simili e non significativamente diversi nel suolo grufolato e in quello non grufolato. Una eventuale variazione del pH d'altronde può non essere associata alle grufolate ma al rilascio di deiezioni, al passaggio e all'alterazione dei processi che avvengono nel suolo. Risultati confrontabili con quelli ottenuti sono riportati in un studio di Papaioannou et al. (2002); inoltre, in accordo con i risultati ottenuti, alcuni lavori riportano effetti modesti o irrilevanti sul pH del suolo causato dal pascolo (Milchunas et al., 1993; Derner et al., 1997). Talvolta, si rileva un aumento dei valori di pH a causa della formazione di condizioni alcaline con l'introduzione di urea nel terreno (Makedos, 1995; Papatheodorou, 1996).

La concentrazione di N non mostra differenze significative nei suoli grufolati e non grufolati anche se (Fig. 5.32) il suolo non grufolato alla profondità 15-40cm mostra valori più elevati. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Allsopp (1999), che riporta delle differenze non significative nei valori dell'N totale in aree sottoposte a pascolo e non. Inoltre, il valore più alto di azoto nel suolo non pascolato di Licosa potrebbe essere dovuto probabilmente a una maggiore copertura da erbacee del suolo in questione, vegetazione che è allontanata o mangiata dai cinghiali durante la loro attività di scavo.

Per quanto riguarda il rapporto C/N (Fig. 5.32) si evidenziano valori più alti nelle grufolate rispetto ai suoli sotto gli ulivi non grufolati. La sostanza organica probabilmente viene resa più recalcitrante dall'azione dei cinghiali, che portano in alto in superficie grufolando, la componente più decomposta. I dati sperimentali ottenuti sono confermati anche dallo studio di Holland et al. (1992), secondo cui il pascolo influenza l'aumento del rapporto C/N, anche se spesso, le differenze in tale rapporto possono indicare un incremento delle concentrazioni di carbonio organico provocato principalmente dall'incremento di materia

organica nei suoli pascolati. Hui et al. (2005), hanno dimostrato, inoltre, che il bestiame che pascola può aumentare l'assegnazione di carbonio e azoto alla biomassa del suolo, migliorando la modalità di ingresso di C al suolo, la conservazione di azoto e provocando l'accumulo di carbonio organico.

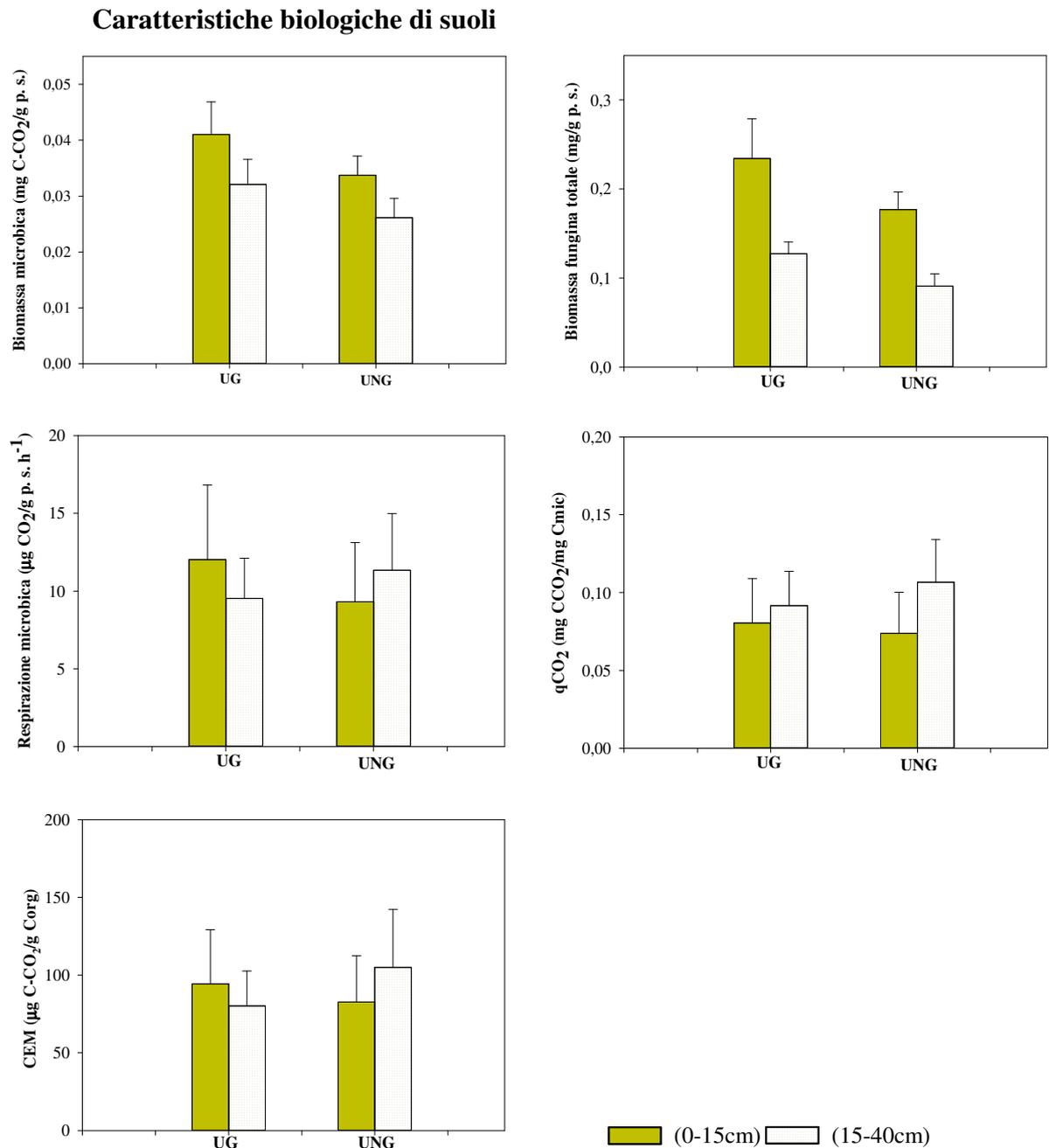


Figura 5.33: Caratteristiche biologiche dei suoli sotto la cv. *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG).

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi biologiche sotto i suoli degli ulivi grufolati (UG) e non grufolati (UNG) appartenenti alla varietà *Pisciottana*, campionati nel sito di Licosa.

Un incremento significativo della biomassa microbica (Fig. 5.33) è stato registrato nel grufolato soprattutto nello strato più superficiale (0-15cm). Le grufolate cambiano la distribuzione della materia organica e le deposizioni di deiezioni può contribuire all'incremento della componente microbica del suolo. Secondo Wang et al. (2008), l'attività di calpestio può distruggere la struttura del terreno. Di conseguenza, disturba la crescita e la metabolizzazione dei microrganismi, con conseguente riduzione di biomassa microbica. Precedenti studi di interazione dei sistemi pascolo - pianta - suolo hanno riportato effetti variabili causati dagli erbivori sulle popolazioni microbiche. Gli erbivori riducono, in alcuni casi, la biomassa microbica del suolo (Garcia et al., 1994; Holt, 1997; Stark et al., 2002); l'aumento in altri (Singh et al., 1991; Bardgett et al., 1997; Stark et al., 2002) e non provocano alcun effetto (Kieft, 1994; Tracy et al., 1998). Questi risultati contrastanti mettono in evidenza come la risposta della comunità edafica sia estremamente sensibile alla specifica situazione.

Analogamente a quanto visto per la biomassa microbica, il suolo grufolato presenta valori più alti per la biomassa fungina totale (Fig. 5.33) soprattutto lungo il profilo 0-15cm ($P=0,678$) rispetto al 15-40cm ($P=0,042$). In letteratura, è ben nota la diminuzione dei funghi lungo il profilo di un suolo e la loro sensibilità a fattori di disturbo, soprattutto di tipo biotico, oltre che abiotico (Rutigliano et al., 2002; Iovieno et al., 1996). Da uno studio condotto da Birkhofer et al. (2008), in accordo con i dati sperimentali acquisiti nel corso di questo progetto, si può ricondurre l'abbondanza della biomassa fungina alla maggiore concentrazione di azoto e di sostanza organica presente nel terreno pascolato nonché al valore di pH. Nei suoli grufolati di Licosa, più che la quantità di sostanza organica, importanti risultano la qualità e la ridistribuzione lungo il profilo.

I dati ottenuti non evidenziano differenze significative per l'attività microbica, anche in questo caso le differenze stagionali coprono l'effetto del disturbo. Comunque una maggiore attività microbica si registra nei suoli grufolati rispetto a quelli non grufolati (Fig. 5.33) soprattutto nei primi centimetri di suolo. Studi effettuati da Wirthner e collaboratori (2012) sono in accordo con i risultati ottenuti, e affermano che la respirazione del terreno in suoli

sottoposti al pascolo del cinghiale risulta essere significativamente più alta nei terreni grufolati.

Anche il quoziente metabolico (qCO_2), e il coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) mostrano una elevata variabilità (Fig. 5.33), valori più elevati si registrano nel suolo UNG rispetto a quello grufolato (UG). Anderson & Domsch, (1993) riferiscono che valori di qCO_2 aumentano in presenza di situazioni di stress; anche se è da tener presente che la riduzione del quoziente metabolico in suoli interessati da disturbi, come il pascolo, potrebbe indicare un miglioramento nell'utilizzo delle sostanze da degradare da parte della biomassa microbica (Insam et al., 1989). Spesso il qCO_2 declina anche con l'aumento del pH e la quantità di biomassa microbica (Wardle et al., 2005).

Valori più elevati di respirazione possono tradursi in valori elevati di CEM. L'andamento lungo il profilo di questi due indici segue quello della respirazione con decrementi nel suolo UG ed incrementi in UNG.

Caratteristiche fogliari funzionali

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi dei tratti funzionali fogliari degli ulivi grufolati (UG) e non grufolati (UNG) appartenenti alla varietà *Pisciottana*, campionati nel sito di Licosa.

Anche per le caratteristiche fogliari funzionali, così come per i parametri del suolo, nel sito di Licosa è stato effettuato un confronto tra gli alberi sottoposti all'azione di aratura da parte dei cinghiali (UG), e quelli che non vengono grufolati (UNG), per valutare se la presenza del cinghiale incide in qualche modo sulla produttività della pianta. Come è possibile vedere nella Figura 5.34 per i parametri, LA, SLA, LMDC e RWC il valore più elevato è sempre registrato nel sito interessato dal pascolo del cinghiale (UG) anche se le differenze non sempre sono significative; ciò comporta che queste caratteristiche possono essere correlate a quelle biologiche dei suoli (biomassa fungina, biomassa e attività microbica e gli indici metabolici qCO_2 e CEM; Fig. 5.33).

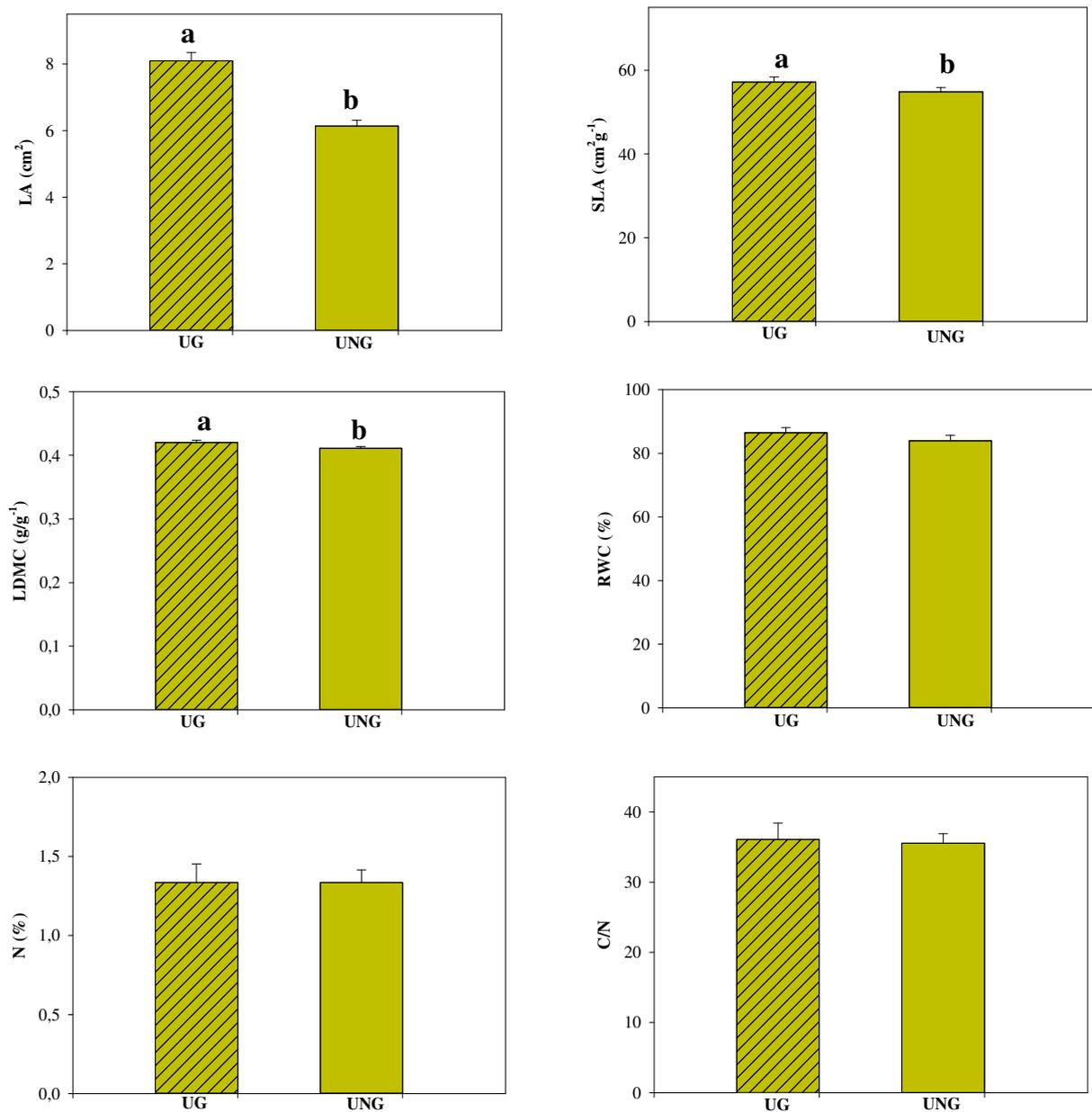


Figura 5.34: Caratteristiche fogliari funzionali di ulivi della cv. *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG). Lettere diverse (a; b) indicano le differenze statisticamente significative, ottenute attraverso lo Student test (t-test).

L'area fogliare (LA), è risultata essere significativamente più elevata (Fig. 5.34) nelle foglie degli uliveti grufolati rispetto a quella misurata per le foglie prelevate da piante non sottoposte al pascolo. Come documentato nella letteratura scientifica a riguardo (Faraloni et al., 2011), una maggiore superficie fogliare implica una migliore capacità da parte della foglia

di intercettare la luce e dunque potrebbe essere indice di una migliore efficienza fotosintetica comportando tassi di crescita più elevati da parte della pianta.

Le foglie appartenenti agli uliveti sottoposti al pascolo del cinghiale hanno evidenziato uno SLA (Fig. 5.34) maggiore rispetto a quelle non grufolate, anche se non significativo. Lo SLA di una specie è infatti positivamente correlato alla concentrazione di nutrienti e alla capacità fotosintetica della pianta stessa (Abrams et al., 1994; Burns, 2004; Field & Mooney, 1986; Garnier et al., 1997; Poorter & Evans, 1998; Reich et al., 1997; Shypley & Lechowicz, 2000; Wright & Westoby, 2002; Wright et al., 2002). Ne consegue che, foglie con elevati valori di SLA, producono un minor numero di apparati fotosintetici per unità di superficie, sono in grado di utilizzare in modo più efficace anche scarse quantità di radiazione diffusa (Niinemets, 2001; Sefton et al., 2002).

Il parametro LDMC (Fig. 5.34), si presenta significativamente più elevato nelle foglie degli uliveti appartenenti alla cv. *Pisciottana*, sottoposti all'azione di *Sus scrofa*. Questo dato è indice del fatto che le piante in questione hanno foglie con presenza massiva di tessuti induriti e di sostegno, adatti al superamento di particolari condizioni di stress, che in questo caso potrebbe essere causato dall'insoglio. È un'abitudine particolare del cinghiale che consiste in un bagno d'acqua e fango che gli animali hanno necessità di fare per liberarsi dai parassiti, soprattutto zecche e pulci, e dallo sporco o per rinfrescarsi durante i periodi caldi. Il fango, una volta essiccato ingloba gli ecto-parassiti che vengono allontanati dalla cute mediante strofinio su alberi; è, quindi, nelle immediate vicinanze degli insogli che si rinvengono infatti i cosiddetti grattatoi, riconoscibili in quanto sono formati da solchi, a seguito dello sfregamento delle zanne e da un'area scortecciata.

Per quanto riguarda l'RWC si registra una percentuale lievemente maggiore ma non significativa per gli alberi su suolo grufolato (86,48%) rispetto a quello non grufolato (83,90%; Fig. 5.34); questo parametro, conferma sia un migliore stato di idratazione della foglia, sia una minore tendenza a perdere acqua da parte dei tessuti. Ciò è in accordo con gli studi effettuati da Faraloni et al. (2011) secondo cui tali valori sono da ricondurre, probabilmente, proprio all'azione di aratura da parte di *Sus Scrofa*, che interrompendo lo stato coesivo del terreno ne facilita l'imbibizione di acqua rendendola maggiormente disponibile per l'assorbimento radicale.

Valori simili e non significativi per il contenuto di N (Fig. 5.34) sono stati registrati sia per le foglie dei suoli sottoposti all'azione di pascolo del cinghiale sia per le foglie dei suoli in

cui non è presente. Invece, maggiori differenze, anche se non significative, si riscontrano nel rapporto C/N, ciò sembrerebbe indicare che il passaggio del cinghiale, agevoli l'assorbimento di azoto e ne aumenti la disponibilità nell'ambiente che circonda la pianta.

In figura 5.35 sono invece riportati i parametri fotochimici. Nel complesso sia i valori di massima efficienza fotochimica (F_v/f_m) che di resa quantica del trasporto elettronico (Φ_{PSII}) delle foglie di suoli sottoposti all'attività del cinghiale (UG) sono entrambi non significativi e simili a quelli delle foglie non sottoposte a questo disturbo (UNG). In letteratura, è riportato che i due indici, in particolare F_v/F_m in condizioni di stress possono diminuire sensibilmente e scendere al di sotto del valore soglia stimato (0,8). Nonostante la presenza del cinghiale, nei risultati ottenuti, il fatto che F_v/F_m si mantenga prossimo al valore soglia indica che le piante misurate sono in grado di ottimizzare efficacemente i processi di cattura e conversione dell'energia luminosa.

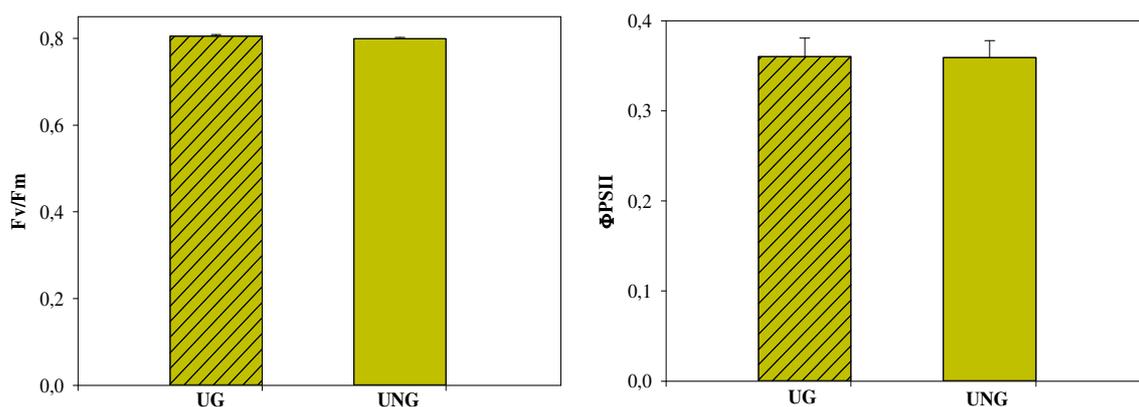


Figura 5.35: Massima efficienza fotochimica (F_v/F_m) e resa quantica del trasporto elettronico (Φ_{PSII}) delle foglie di ulivi della cv. *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG).

Caratteristiche chimico-fisiche dei frutti di *Olea europaea* L.

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi delle caratteristiche chimico-fisiche dei frutti degli ulivi grufolati (UG) e non grufolati (UNG) appartenenti alla varietà *Pisciottana*, campionati nel sito di Licosa.

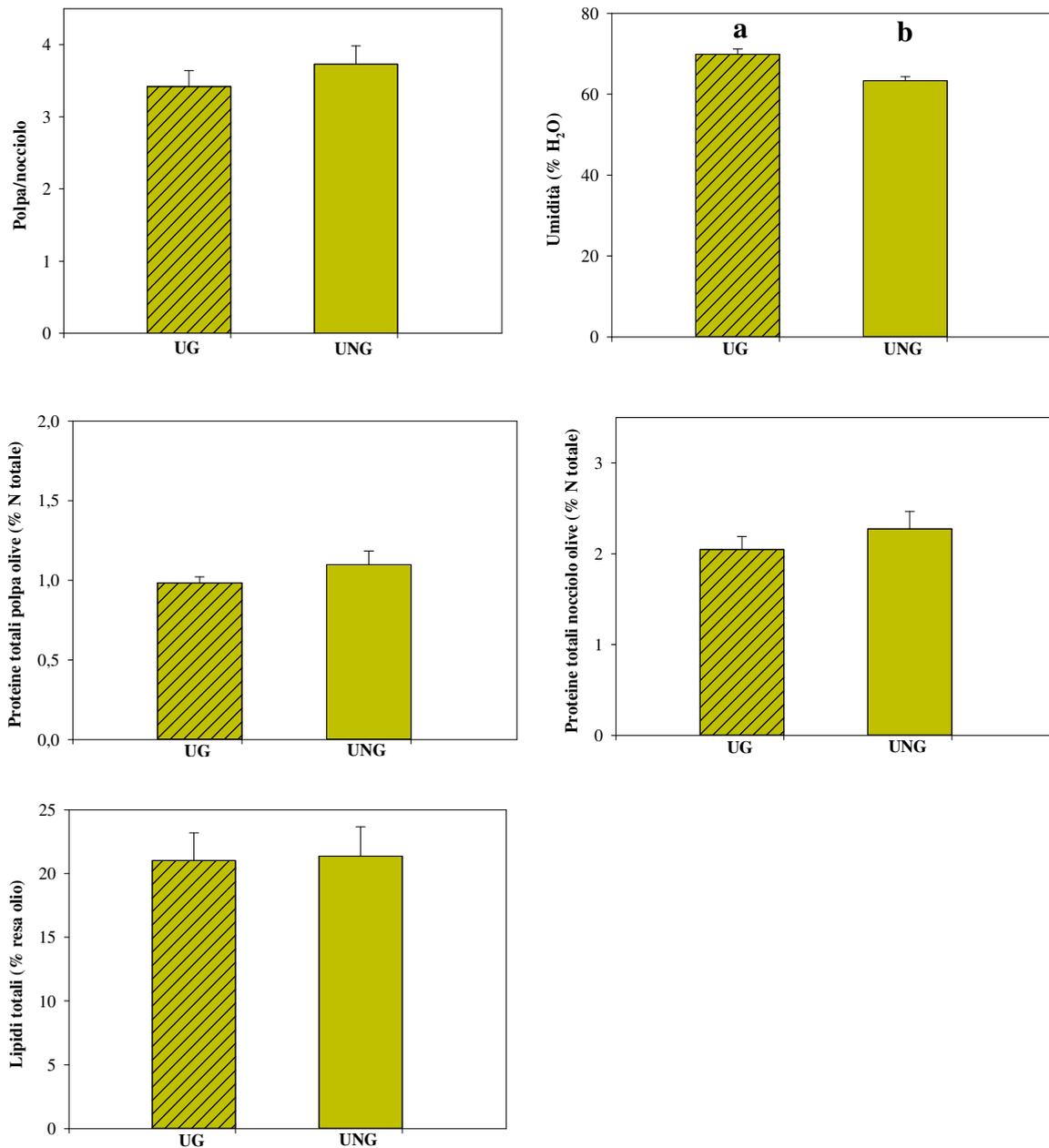


Figura 5.36: Caratteristiche chimico-fisiche di frutti di ulivi della cv. *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG). Lettere diverse (a; b) indicano le differenze statisticamente significative, ottenute attraverso lo Student test (t-test).

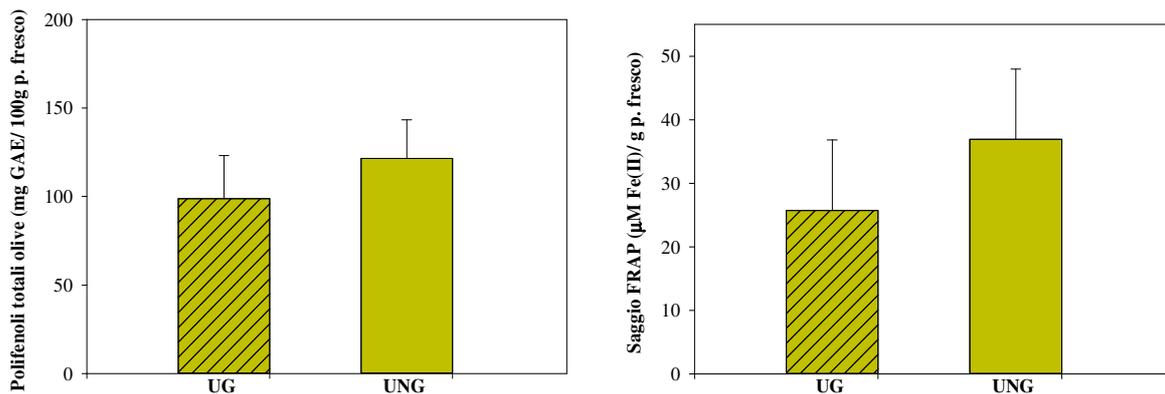


Figura 5.37: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante nei frutti di ulivi della cv. *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG).

Per i rapporti polpa/nocciolo dei campioni di olive della cultivar *Pisciottana* campionata nel sito di Licosa (Fig. 5.36), non si osservano particolari e significative differenze tra le aree grufolate dai cinghiali (UG) e quelle non grufolate da questi animali (UNG), anche se le olive prelevate da terreni UNG hanno un rapporto polpa/nocciolo leggermente più elevato; la minore dimensione del frutto potrebbe essere una conseguenza dell'effetto che *Sus scrofa* L., grufolando, esercita sotto i suoli degli uliveti.

Il contenuto di acqua registrato per il frutto intero della cv. *Pisciottana* (Fig. 5.36), ha registrato un valore significativamente più alto per i frutti degli alberi sottoposti al disturbo cinghiale (UG) rispetto al contenuto di acqua di olive appartenenti agli alberi non grufolati. Questo evidenzia gli eventuali effetti del disturbo associato al cinghiale, che abitualmente con l'azione istintiva di scavo (*rooting*) superficiale e profondo effettuato per reperire radici, tuberi e piccoli invertebrati presenti nel suolo (Ricci et al., 2008), cambia le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli che poi si ripercuotono sui frutti della pianta *Olea europaea* L. Inoltre, il terreno smosso dai cinghiali facilita l'assorbimento dell'acqua da parte delle piante che possono quindi distribuirlo anche ai frutti, d'altra parte l'azione dei cinghiali, può anche causare compattamento del terreno che, soprattutto nelle situazioni con elevata presenza di argilla, non consente più il recupero dell'originaria struttura del suolo (Ricci et al., 2008).

Il contenuto di proteine totali nella polpa e nel nocciolo (Fig. 5.36) dei campioni di olive prelevati in alberi non grufolati si è rilevato più alto rispetto a quelli di alberi grufolati, ma per entrambi i parametri le differenze non sono risultate significative. Le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli e delle foglie, in particolare i rapporti C/N, potrebbero essere

considerati il riflesso dell'attività di pascolo dei cinghiali che hanno colonizzato l'area. I suoi cibi preferiti sono frutti ricchi di energia quali ghiande, castagne, radici e tuberi per cui l'attività di aratura di questi animali per la ricerca del cibo può accelerare l'erosione del suolo (Bratton, 1975; Singer et al., 1984). Le diverse caratteristiche del suolo grufolato potrebbero, quindi, giustificare le differenze nelle proprietà delle olive degli alberi UG e UNG, e di conseguenza, anche le concentrazioni differenti di proteine nella polpa e nel nocciolo.

Il contenuto in lipidi (Fig. 5.36), ha registrato valori simili per entrambe le tipologie di frutto, provenienti da alberi grufolati (21,00%) e non (21,37%). Pertanto, risulta abbastanza evidente che l'attività di *Sus scrofa* L. sul territorio non influisca sulla determinazione di questo parametro.

Per il contenuto di polifenoli totali della polpa dei campioni di olive della cultivar *Pisciottana* prelevati nel sito di Licosa (Fig. 5.37), si osservano differenze non significative tra gli alberi grufolati (UG) e quelli non grufolati (UNG). In particolare, i contenuti di polifenoli totali risultano essere più alti per i campioni prelevati da alberi UNG rispetto a quelli UG, così come è stato riscontrato precedentemente anche per tutte le altre caratteristiche chimico-fisiche dei frutti.

L'effetto del disturbo operato dal cinghiale su questo parametro sembra essere confermato anche dall'attività antiossidante (Fig. 5.37), saggiata con il FRAP ($P=0,394$), che segue lo stesso trend del dosaggio dei polifenoli totali.

Caratteristiche qualitative degli oli

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi per la valutazione delle caratteristiche qualitative di oli estratti da ulivi grufolati (UG) e non grufolati (UNG) appartenenti alla varietà *Pisciottana*, campionati nel sito di Licosa.

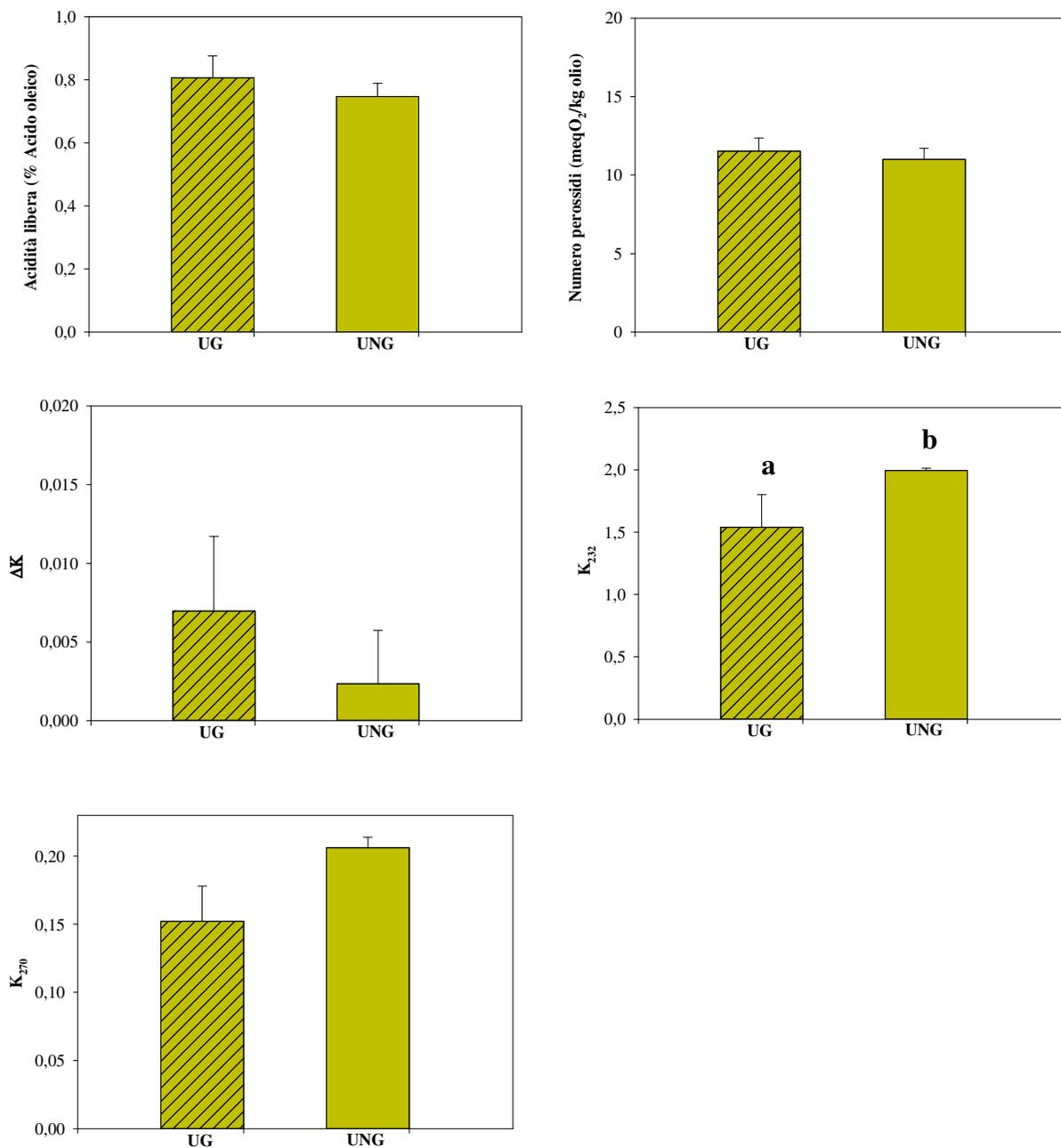


Figura 5.38: Caratteristiche qualitative di oli estratti da *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG). Lettere diverse (a; b) indicano le differenze statisticamente significative, ottenute attraverso lo Student test (t-test).

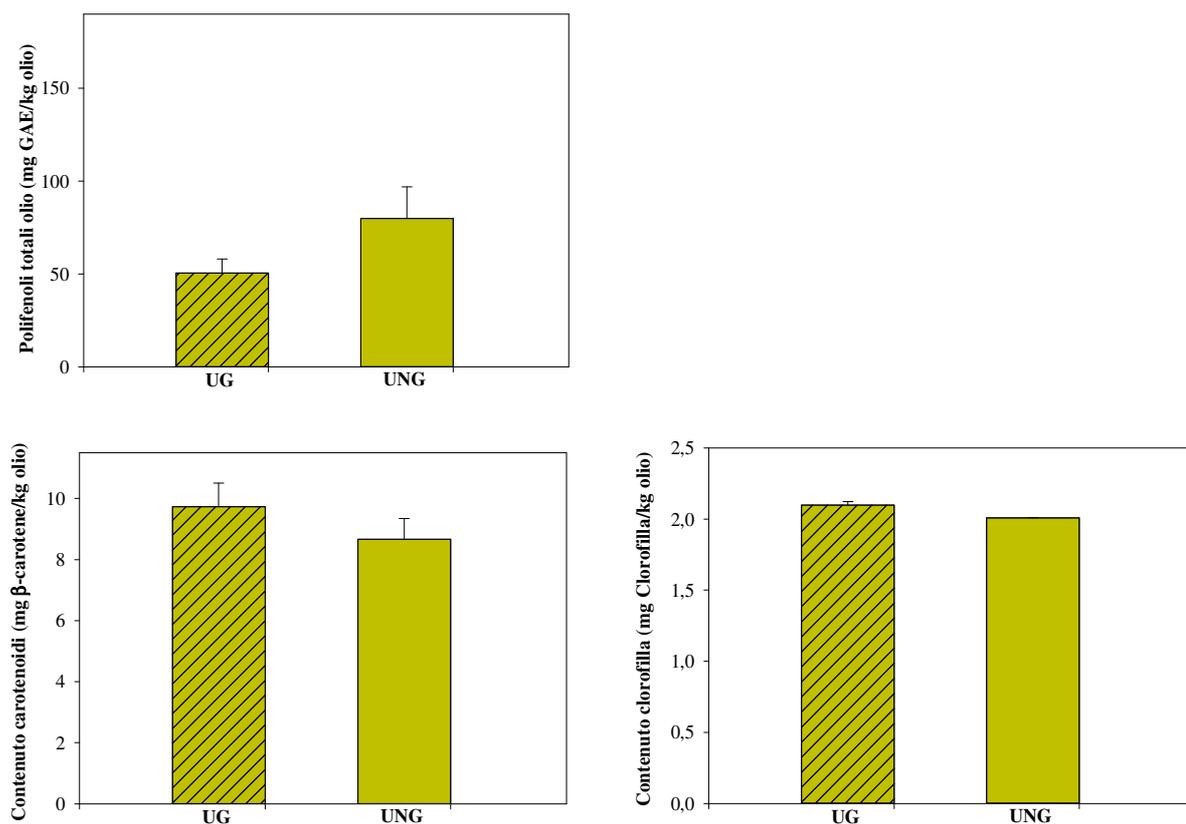


Figura 5.39: Cotenuto in polifenoli totali, carotenoidi e clorofille di oli estratti da *Pisciottana* nel sito di Licosa. Sono riportati i valori delle aree interessate dalle grufolate del cinghiale (UG) e di quelle non sottoposte a questo tipo di disturbo (UNG).

Gli oli ottenuti da alberi presenti in terreni UG, ossia dove i cinghiali grufolano liberamente, hanno registrato valori di acidità libera, numero perossidi e ΔK (Fig. 5.38) più alti ma non in modo significativo, al contrario dei valori registrati per gli oli ottenuti dai terreni UNG. È evidente che gli oli ottenuti da questi siti sottoposti al disturbo da *Sus scrofa*, nonostante rientrino nei limiti di legge stabiliti (Reg. CE 1989/03) e appartengano alla categoria merceologica di oli extravergini di oliva, presentano una qualità inferiore rispetto a quelli estratti da piante non sottoposte al pascolo da cinghiale.

Gli indici spettrofotometrici K_{232} ($P=0,029$) e K_{270} ($P=0,091$; Fig. 5.37), hanno registrato valori più elevati negli oli ottenuti da piante non sottoposte all'azione del cinghiale (UNG) rispetto a quelli ottenuti da piante che subiscono grufolaggio (UG). Questi valori *borderline* essendo molto vicini ai limiti stabiliti, evidenziano che i campioni di olio analizzati hanno subito ossidazione primaria e secondaria. In effetti, un aumento del K_{232} evidenzia un'ossidazione primaria, con formazione di perossidi; mentre un aumento del K_{270} evidenzia un'ossidazione secondaria, con formazione di aldeidi e chetoni.

Il contenuto di polifenoli totali (Fig. 5.39) presentano un valore più alto in oli ottenuti da alberi in cui non è evidente l'azione del cinghiale (UNG), così come quelli dei frutti. La quantità fenolica è influenzata sia nei frutti che negli oli dall'attività di *rooting* e insoglio del cinghiale, il quale ha trovato un habitat favorevole che gli ha permesso di crescere in modo esponenziale. L'eccessiva presenza del cinghiale provoca danni quindi, al terreno e alle coltivazioni agricole. Oltre alle modifiche chimico-fisiche dei terreni, i cinghiali influenzano anche la qualità del prodotto finale di piante fondamentali per la nutrizione umana, come *Olea europaea* L. e, in particolare, la quantità di polifenoli totali sia nelle olive che negli oli da esse estratti e a cui sono attribuite le principali proprietà salutistiche degli oli extravergini di oliva. Il contenuto in carotenoidi e clorofille (Fig. 5.39) ha evidenziato valori simili per gli oli appartenenti ad ulivi sottoposti a grufolaggio e non, emerge quindi, la mancata influenza del cinghiale sui pigmenti responsabili del colore dell'olio, che derivano, evidentemente da altri fattori (Cerretani et al., 2014) che possono essere sia di origine genetica che ambientale.

Capitolo 6. Esperienza all'estero

Negli ultimi anni il crescente interesse per i microrganismi del suolo, la loro quantità, attività e diversità ha convalidato il ruolo chiave che assumono nel mantenimento della fertilità.

La biodiversità dei microrganismi del suolo, in virtù della varietà dei processi chimico-metabolici coinvolti, ha un ruolo importante nel mantenere gli ecosistemi naturali in uno stato funzionalmente efficiente. L'equilibrio che si instaura nell'ecosistema microbico del suolo, dovuto alla stabilizzazione delle interrelazioni funzionali tra i vari microrganismi, si riflette positivamente sulle piante e, conseguentemente, sulla comunità animale presente. L'agricoltura intensiva, basata sulle monocolture e l'utilizzo di pesticidi ed erbicidi, può influire, infatti, sulla biodiversità del suolo ed in particolare sulla biodiversità dell'ecosistema rizosferico, alterando gli equilibri strutturali della comunità microbica presente e la composizione delle varie popolazioni che compongono tale comunità (Bolton et al., 1985; Doran, 1980; Ramsay et al., 1986). La composizione e la struttura delle comunità microbiche nel suolo dipendono, oltre che dalle interazioni tra le singole specie presenti, anche dalla natura chimico-fisica del terreno. Infatti, la struttura fisica del suolo, l'umidità, il pH, la temperatura e i nutrienti presenti, influenzano la vita microbica e selezionano gli organismi più adatti (Garbeva et al., 2004). La composizione del suolo rappresenta uno dei principali fattori che influenzano significativamente la comunità microbica a livello sia interspecifico sia intraspecifico (McCaig et al., 2001), agendo sia sulla densità microbica che sulla struttura della comunità microbica rizosferica (Chiarini et al., 1998) ed è responsabile della diversità fenotipica di popolazioni rizobatteriche (Latour et al., 1996). Inoltre, il tipo di suolo può rappresentare l'elemento selettivo che consente la sopravvivenza di alcune specie microbiche (Bashan et al., 1995). Anche le piante possono influire sulla composizione della microflora batterica presente nella rizosfera. Il continuo rilascio di nutrienti organici da parte della pianta e la natura di questi composti influenzano l'attività microbica nella regione rizosferica, che si contraddistingue per il suo spiccato carattere selettivo, favorendo lo sviluppo di alcune specie microbiche rispetto ad altre e contribuendo a determinare la biodiversità nell'ambiente (Rovira, 1965).

I *paddy soils* sono le aree in cui si ritrova la coltivazione del riso, che insieme a quella dell'olivo, è una delle più antiche ed importanti colture agricole del mondo, che ricopre una superficie di circa 143 milioni di ettari a livello globale (Liesack et al., 2000), e che è stata

intensificata per sostenere l'aumento della popolazione umana (Wang et al., 2014). Le risaie (*paddy soils*), sono le zone umide, più estese e le più modificate dall'uomo. Le risaie sono conosciute come una delle principali fonti di metano atmosferico e la mitigazione delle emissioni di metano provenienti da quelle sorgenti di origine antropica è urgentemente richiesta (Denman et al., 2007; Gutierrez et al., 2013).

Il metano è ritenuto come un prodotto terminale della decomposizione anaerobica di materiali organici da parte di *archaea* metanogenici. Gli *Archaea* metanogenici svolgono un ruolo fondamentale per la metanogenesi, e la loro ecologia nell'ecosistema risaia è stata intensamente studiata (Conrad, 2007; Watanabe et al., 2013). I metanotrofi sono stati il soggetto del crescente interesse da parte della comunità scientifica degli ultimi anni, poiché essi usano CH₄ come unica sorgente di carbonio. L'accoppiamento ambientale di metanogenesi e metanotrofia porta ad un elevato turnover del ciclo globale dei composti C1. La presenza dei metanotrofi gioca un ruolo importante nella significativa riduzione del contenuto di CH₄ (Rastogi et al., 2009). Tutti i metanotrofi contengono un enzima monoossigenasi metano particolato legata alla membrana (pMMO) che catalizza l'ossidazione di CH₄ a metanolo, ed è conseguentemente ossidato a formaldeide dall'enzima metanolo deidrogenasi; la maggior parte dei metanotrofi conosciuti possiedono un gene *pmoA*, che codifica per la subunità α (PmoA) della pMMO, fatta eccezione per *Methylocella palustris* (Fjellbirkeland et al., 2001; Horz et al., 2001).

Tutti i metanogeni conosciuti esprimono l'enzima metil coenzima M reduttasi (MCR), che catalizza lo step terminale nella produzione di metano biogenico. Attualmente la presenza di MCR è considerato un indicatore diagnostico di metanogenesi. I genomi di tutti gli *archaea* metanogenici codificano per una copia dell'operone *mcrA*. L'oloenzima *mcrA*, composto da subunità α, β e γ, catalizza la formazione eterodisolfurica tra coenzima M e B dai rispettivamente metil coenzima M e B (Hallam et al., 2003). I vincoli funzionali inerenti la sua attività catalitica hanno portato ad un alto grado di conservazione della sequenza amminoacidica MCR, anche tra i lignaggi metanogenici distanti filogeneticamente. Questa struttura primaria conservata è stata usata per sviluppare primers PCR degenerati per recuperare naturalmente frammenti di *mcrA* da una varietà di ambienti. I dati risultanti della sequenza *mcrA* possono essere impiegati per avere informazioni sulla presenza di metanogeni e sulla loro diversità (Hallam et al., 2003).

6.1 Scopo dell'esperimento

La parte sperimentale svolta presso l'Institute of Urban Environment - Chinese Academy of Science (IUE-CAS) di Xiamen (China) con il gruppo del prof. Zhu, che specificamente si occupa di indicatori biologici e molecolari di qualità di suoli agricoli, ha riguardato proprio i *paddy soils*.

Nello specifico, l'obiettivo dell'esperimento svolto presso l'IUE-CAS è stato quello di approfondire le ricerche e le tecniche molecolari concernenti lo studio della biodiversità edafica di risaie, che costituiscono un'importante fonte di energia per il sostentamento della popolazione mondiale. Infatti, dal suddetto cereale dipende circa un terzo della popolazione mondiale, e riveste una posizione di primo piano anche nell'agricoltura dei paesi mediterranei, non ultima l'Italia. L'incremento della produzione di tale monocoltura, in particolare nei cosiddetti *paddy soils*, che costituiscono una delle principali sorgenti di CH₄ biogenico ha causato un forte aumento nelle emissioni di questo gas. Il metano è conosciuto come famoso gas "effetto serra" e la sua concentrazione atmosferica sta aumentando dell'1% annuo; inoltre, è stato stimato che circa il 70-80% del CH₄ atmosferico deriva da fonti biogeniche (Horz et al., 2001). Alla luce di tali considerazioni sono stati scelti due geni funzionali, *pmoA* e *mcrA*, che rispettivamente codificano per enzimi fondamentali per il metabolismo rispettivamente di metanotrofi e metanogeni.

La presente ricerca effettuata con l'intento di studiare la microflora edafica di *paddy soils*, è stata realizzata attraverso:

- estrazione del DNA con il FastDNA Spin Kit for Soil;
- determinazione della concentrazione del DNA per mezzo del Nanodrop ND-100 Spectrophotometer;
- costruzione di una *clone library* per rilevare la diversità di geni funzionali *pmoA* e *mcrA* che codificano per enzimi rispettivamente presenti in metanotrofi e metanogeni;
- qPCR per rilevare l'abbondanza dei geni funzionali *pmoA* e *mcrA*.

6.2 Materiali e metodi

6.2.1 Area di studio e campionamento

La ricerca è stata svolta su due suoli di risaie, provenienti dalle province del Guangdong (FST) e del Sichuan (SC) (Fig. 6.1). Il territorio del Guangdong (21°51'55N, 112°25'45E) fa parte della costa meridionale della Cina continentale. La provincia del Guangdong si affaccia a sud sul Mar Cinese Meridionale e la lunghezza complessiva delle coste è di 4.300 km. Il limite sud-occidentale è occupato dalla penisola di Leizhou, sulla quale sono presenti alcuni vulcani inattivi. Il delta del Fiume delle Perle è il punto di convergenza di tre fiumi che scorrono a monte: il fiume Est, il fiume Nord e il fiume Ovest. Centinaia di piccole isole occupano parte del delta del Fiume delle Perle. La provincia è geograficamente delimitata a nord da alcune catene montuose chiamate nel complesso Catena Montuosa Meridionale. Il punto più alto della provincia è di 1.600 metri sopra il livello del mare.

La provincia del Sichuan (31°16'1N, 105°27'10E) è una provincia della Repubblica Popolare Cinese. La capitale è Chengdu, mentre altre città importanti sono Zigong, anche nota come Tzu-kung, Kangding e Litang. La provincia ha un'estensione di 485.000 chilometri quadrati. È la terza provincia più popolata della Cina. Confina a nord con la provincia di Gansu, a nord-est con la provincia di Shanxi, ad est con Chongqing, a sud-est con la provincia di Guizhou, a sud con la provincia di Yunnan, ad ovest con la regione autonoma del Tibet e a nord-ovest con la provincia di Qinghai. Si trova nella parte sud-ovest della Cina, attraversata da diversi fiumi, tra cui il più importante è lo Yangtze; ad est è situata la depressione chiamata conca rossa, molto fertile e con un clima caldo ed inverni miti, ad ovest altipiani freddi e montagne che segnano l'inizio del Tibet.



Figura 6.1: Siti di campionamento appartenenti alle province del Guangdong e del Sichuan dei *paddy soils* presi in esame.

Il campionamento di suolo è stato effettuato fino a 20 cm di profondità, nell'estate 2013. Una volta in laboratorio, i singoli campioni di suolo sono poi stati separati: quelli da setacciare, mediante un setaccio in plastica con maglie di 10 mm, in modo da poter effettuare le analisi chimico-fisiche e molecolari; e quelli da non sottoporre a setacciatura per effettuare la determinazione della tessitura.

6.2.2 Caratterizzazione dei suoli: tessitura, pH, tenore idrico, contenuto di carbonio e azoto totale

I suoli campionati e non setacciati sono stati messi in un liofilizzatore (Frozen-died soil, Made in Beijing-China). È stata, poi, presa una quantità di suolo, e determinata la **tessitura** attraverso un macchinario (Zeta potential and nano/submicron size analyzer, ZetaPALS) a -50°C per un numero di ore che varia in base alla tipologia di suolo presa in esame. Tali determinazioni sono state effettuate in triplicato per ciascun campione.

Per determinare il **pH** del suolo è stato utilizzato un pH-metro (XL60 Fisher, made in USA), e la misura è stata fatta per via potenziometrica, su suolo fresco. Il pH è stato

determinato sul surnatante di una sospensione suolo:acqua (1:2,5) dopo agitazione per 30 minuti e decantazione. Le misure sono state eseguite in triplicato per ciascun campione.

Il **tenore idrico** dei suoli (T.I. %) è stato determinato per via gravimetrica e in triplicato. Vengono pesati 10 g di suolo fresco e posti per 16h, in stufa, dopodiché il suolo privo di acqua, viene ripesato e per differenza è determinata la % di tenore idrico.

Per la determinazione del contenuto di **carbonio**, sono pesati 0,3 g di suolo precedentemente liofilizzati; dopodiché il contenuto di C totale è stato misurato attraverso un analizzatore (TOC-VCPH of Shimadzu-Japan).

La stessa quantità di suolo (0,3 g), precedentemente liofilizzata, viene utilizzata per effettuare la determinazione del contenuto di **azoto** totale; successivamente attraverso una combustione a secco (Vario MAX C/N Germany), viene realizzata la misurazione dell'N totale.

6.2.3 Caratterizzazione Molecolare dei suoli

Estrazione del DNA con il FastPrep® System

Il FastPrep® System è un metodo di estrazione diretta del DNA totale da suolo basato sulla lisi meccanica dei microrganismi edafici. Il FastPrep® System combina il FastDNA® SPIN Kit for SOIL ed il FastPrep® Instrument (FastPrep® FP 120A Instrument), il quale consiste in un agitatore caratterizzato da un movimento sussultorio con velocità molto elevate ($4.0-6.5 \text{ m s}^{-1}$); tale movimento, combinato con la presenza di *beads* di silice e ceramica di varie dimensioni nel tubo di lisi del kit associato, permette di lisare in modo efficiente tutti i microrganismi, anche quelli più resistenti alla lisi chimica ed enzimatica quali le endospore, le spore degli eubatteri, i batteri Gram-positivi, i lieviti, le alghe, i nematodi ed i funghi. Il FastPrep® System consente l'estrazione rapida di DNA direttamente dal suolo senza l'ausilio di solventi organici tossici come il fenolo ed il cloroformio. Il DNA genomico ottenuto con tale sistema ha dimensioni che variano tra 6 e 25 kbp; la sensibile degradazione del materiale genetico è dovuta all'energica forza applicata per lisare le cellule, ma solitamente ciò non rappresenta un problema per le applicazioni successive del DNA estratto. Anche la resa estrattiva in termini di quantità, dipendente dalle caratteristiche del suolo e dalla quantità degli organismi presenti, è buona ($2-750 \mu\text{g DNA g}^{-1}$ di suolo). La purezza del DNA estratto generalmente è buona e permette di utilizzarlo senza dover applicare ulteriori fasi di purificazione. I componenti principali con cui viene fornito il kit sono i seguenti:

- Lysing Matrix, si tratta di tubi da centrifuga contenenti una miscela di particelle di silice e ceramica per la lisi meccanica dei microrganismi; essa contiene una soluzione caotropica costituita da una miscela di detergenti e sali che hanno la funzione di inattivare le nucleasi e favorire la separazione del DNA dalla matrice del suolo;

- Homogenization Reagents, l'omogenizzazione avviene in presenza del MT Buffer e del Sodium Phosphate Buffer, reagenti studiati per proteggere e solubilizzare gli acidi nucleici e permetterne l'estrazione con una contaminazione minima da RNA;

- DNA Purification and Elution Reagents, dopo la lisi il DNA viene purificato mediante la procedura GENE CLEAN®, che fa uso di SPIN filters costituiti da una resina di silice, della Binding Matrix, della Salt/Ethanol Wash Solution e della DNA Elution Solution, ed ha lo scopo di purificare il DNA dai contaminanti che inibiscono la Taq DNA Polimerasi.

In questa ricerca è stato seguito il protocollo suggerito dalla casa produttrice del FastPrep® System, che prevede l'utilizzo di 500 mg di suolo e condizioni di lisi mediante il FastPrep® Instrument riassumibili in tempi di 40 s e velocità di 6.0 m s^{-1} .

Determinazione quantitativa del DNA

Il DNA estratto dal suolo è stato valutato sia qualitativamente che quantitativamente. L'analisi spettrofotometrica di molte molecole, ad esempio gli acidi nucleici, si basa sul fatto che esse possono assorbire l'energia di una radiazione incidente ad una determinata lunghezza d'onda. Una sospensione pura di DNA ha uno spettro di assorbimento nell'ultravioletto con il massimo alla lunghezza d'onda di 260 nm. Ogni oligonucleotide presenta un coefficiente di assorbimento che dipende dalle dimensioni della molecola. Tale fattore permette di determinare la precisa concentrazione di una sospensione di un determinato oligonucleotide, ma, una sospensione di DNA dalla composizione non nota, può non presentare un unico coefficiente di assorbimento. Per una stima abbastanza precisa della concentrazione di una sospensione di DNA può essere utilizzato un fattore generale, derivato dalla media dei valori di coefficienti di assorbimento di DNA differenti per composizione e dimensione. Secondo tale fattore, ad una sospensione di DNA a doppio filamento (ds DNA) la cui concentrazione è di $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ corrisponde un'assorbanza a 260 nm pari ad una densità ottica ($A_{260}=1 \text{ OD}$). La tecnica spettrofotometrica può essere impiegata anche per valutare la qualità del materiale genetico, ovvero la purezza della sua sospensione. Infatti, durante l'estrazione di DNA dalle cellule si coestraggono anche altre sostanze organiche, come ad esempio le proteine. Queste

ultime assorbono come il DNA nella regione ultravioletta, ma con il massimo alla lunghezza d'onda di 280 nm. Una misura del grado di purezza da materiale proteico del DNA estratto consiste nel rapporto tra l'assorbanza della sospensione alla lunghezza d'onda di 260 nm, tipica del DNA, e l'assorbanza a 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Se il DNA è purificato il rapporto OD_{260}/OD_{280} sarà tra 1.8 e 2.0; valori inferiori a 1.8 indicano una contaminazione da proteine non trascurabile, mentre se il rapporto è maggiore di 2.0 si ha probabilmente una contaminazione da RNA. In un estratto di DNA possono però essere presenti molti altri contaminanti, tra cui polisaccaridi, carboidrati, fenoli, peptidi, ed in particolare per il DNA estratto da campioni di suolo, specialmente quelli ricchi di sostanza organica, composti come gli acidi umici e fulvici. Per questi ultimi, generalmente, il grado di contaminazione da questi acidi può essere ricavato dal rapporto OD_{260}/OD_{230} , essendo il massimo di assorbimento per gli acidi umici a 230 nm. Tale rapporto non dovrebbe essere > 1.5 per un campione di DNA puro.

Secondo il piano sperimentale previsto nell'IUE-CAS, i campioni di acidi nucleici sono stati analizzati al Nanodrop ND-100 Spectrophotometer, munito del software ND-1000 v.3.5.2.

È iniettato innanzitutto 1 μ l di bianco per tarare lo strumento, successivamente la stessa quantità di un Buffer per il bianco (usato precedentemente per dissolvere il DNA), dopodiché 1 μ l di ciascun campione è iniettato nello strumento; grazie al software suddetto, è stato possibile ottenere direttamente le concentrazioni dei campioni. Sono state effettuate 4 repliche per ciascun campione. Dopo aver determinato la concentrazione al Nanodrop, viene realizzato un gel d'agarosio all'1% per realizzare un'elettroforesi. Questa tecnica è usata per la separazione di acidi nucleici su gel di agarosio o di acrilamide basandosi sulla migrazione di particelle cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. Molecole, come gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili e quindi sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche. Sotto l'influenza di un campo elettrico, le molecole cariche poste in un gel migrano verso il catodo o l'anodo, a seconda che possiedano una carica positiva o negativa. Gli acidi nucleici, risultando carichi negativamente, per via dei gruppi fosfato, migrano dal polo negativo verso il polo positivo. La velocità della migrazione elettroforetica del DNA/RNA a doppia elica dipende dal peso molecolare dell'acido nucleico, dalla concentrazione d'agarosio (Tab. 6.1), dalla conformazione dell'acido nucleico e dal voltaggio applicato.

In condizioni standard, la mobilità elettroforetica delle molecole di DNA è inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare.

Tabella 6.1: Separazione di molecole lineari di DNA a varie concentrazioni d'agarosio.

% Agarosio	Risoluzione (bp)
0.5	1000-30000
0.7	800-12000
1.0	500-10000
1.2	400-7000
1.5	200-3000
2.0	50-2000

I gel d'agarosio sono solitamente utilizzati orizzontalmente per via della scarsa consistenza del gel. In questa ricerca è stato utilizzato il buffer TAE 1X, sia per preparare i gel d'agarosio che come tampone della corsa elettroforetica; i gel avevano concentrazioni di agarosio pari all'1%. Il colorante è stato incorporato nei gel prima della corsa, alla concentrazione di 0,5 µg/µl. L'elettroforesi è stata effettuata per un tempo pari a 30 minuti applicando una tensione pari a 120 V. Per facilitare il caricamento dei campioni nel gel e per poter verificare l'elettroforesi durante la corsa, è stato utilizzato un loading buffer contenente il colorante visibile ad occhio nudo blu di bromofenolo, nonché il glicerolo, al fine di conferire al campione una densità maggiore di quella del tampone di corsa. Per valutare quantità e peso molecolare dei frammenti caricati nel gel è stato utilizzato un gene marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix) a 500 bp; dopodiché il gel è stato visualizzato al trans-illuminatore UV. La visualizzazione e lo spessore delle bande hanno permesso una comparazione con le concentrazioni di DNA ottenute al Nanodrop ND-100 Spectrophotometer precedentemente.

Amplificazione del DNA mediante Polymerase Chain Reaction

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica che consente di sintetizzare in grandi quantità ed in tempi relativamente brevi frammenti di acidi nucleici dei quali si

conoscono le sequenze nucleotidiche iniziale e terminale. Con questa tecnica, un filamento complementare ad un filamento stampo di DNA viene sintetizzato utilizzando nucleotidi liberi grazie all'azione dell'enzima termostabile Taq DNA polimerasi. L'amplificazione dei frammenti di interesse avviene utilizzando come innesco oligonucleotidi la cui sequenza è complementare a quella della porzione da amplificare. In tal caso i *primers* sono detti specifici e permettono di studiare geni poco rappresentati nel campione in esame. La PCR proveniente dal campo medico è stata recentemente adattata all'analisi del DNA estratto dal suolo (Van Elsas & Wolters, 1995) rappresentando una svolta decisiva nell'ecologia molecolare.

La sequenza dei primers utilizzati in questa ricerca, rispettivamente per i geni funzionali *pmoA* e *mcrA*, che sono stati investigati, è la seguente:

<i>pmoA</i>	A189f: 5'- GGNGACTGGGACTTCTGG - 3'	470bp
	A650: 5'- ACGTCCTTACCGAAGGT - 3'	

<i>mcrA</i>	ME3MF:5'- ATGTCNNGGTGGHGTMGGSTTYAC - 3'	472bp
	ME2r: 5'- TCATBGCRTAGTTDGGRTAGT - 3'	
	ME3MF-e: 5' - ATGAGCGGTGGTGTCCGGTTTCAC -3'	

La PCR è stata effettuata in volumi della miscela di reazione di 25 µl sia per *pmoA* che per *mcrA*, secondo il manuale di istruzione fornito dalla Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master mix (2X), effettuando qualche modifica. La miscela di reazione per il primo gene funzionale investigato è costituita da: 12,5 µl di Dream Taq Green PCR Master mix (2X), 1 µl di primer forward; 1 µl di primer reverse; 0,25 µl di Bovine Serine Albumine (BSA) che è stata utilizzata per la presenza di eventuali inibitori della Taq DNA Polimerasi come gli acidi umici; 9,25 µl di H₂O, nuclease-free; ed infine, 1 µl di ciascun *template* di DNA. La PCR è stata eseguita alla Life Pro Thermal Cycler (Bioer Serves Life), con una denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti, seguita da 40 cicli a 95°C per 45 secondi, a 55°C per 1 minuto, a 72°C per 1 minuto, ed un'estensione finale a 72°C per 10 minuti. Al termine della PCR, aliquote di ampliconi (4 µl) sono state controllate mediante elettroforesi su gel di agarosio (1x TAE, 1% w/v), paragonando le bande degli ampliconi con quelle a peso molecolare noto di un DNA- Marker (Gene Ruler, DNA Ladder Mix).

La miscela di reazione per *mcrA* è invece, così preparata: 12,5 µl di Dream Taq Green PCR Master mix (2X), 0,5 µl di primers forward (10µM) precedentemente mixati (ME3MF e ME3MF-e); 0,5 µl di primer reverse; 0,25 µl di Bovine Serine Albumine (BSA); 10,25 µl di H₂O, nuclease-free; ed infine, 1 µl del *template* di DNA. La PCR è stata eseguita alla Life Pro Thermal Cycler (Bioer Serves Life), con una denaturazione iniziale a 95°C per 2 minuti, seguita da 35 cicli a 95°C per 1 minuto, a 55°C per 1 minuto, a 72°C per 1 minuto, ed un'estensione finale a 72°C per 10 minuti. Al termine della PCR, aliquote di ampliconi (4 µl) sono state controllate mediante elettroforesi su gel di agarosio (1x TAE, 1% w/v), paragonando le bande degli ampliconi con quelle a peso molecolare noto di un DNA - Marker (Gene Ruler, DNA Ladder Mix).

Purificazione di un frammento di DNA dal gel di agarosio

La purificazione dei frammenti di DNA dai gel di agarosio è stata effettuata grazie all'utilizzo di un kit universale (TIANGEN). Tale kit provvede ad una purificazione veloce, semplice e altamente efficiente. È stato stimato che l'efficienza di recupero è più dell'80%. Il DNA purificato da questo kit è di alta qualità e può essere ritenuto uno stampo eccellente per la digestione con enzimi di restrizione, analisi PCR, sequenziamento, libreria di DNA genomico, procedure di ligazione e trasformazione del DNA. In questa ricerca è stato seguito il protocollo suggerito dalla casa produttrice del kit. Dopo l'amplificazione PCR le bande attese dei geni specifici furono escisse, con un bisturi da laboratorio precedentemente sterilizzato, dal gel di agarosio e purificate con il kit TIANGEN. Tale operazione è stata eseguita in triplicato.

Dopo aver eseguito tutte le istruzioni del kit, è stato effettuato nuovamente un gel di agarosio (1x TAE, 1% w/v), come descritto poc'anzi, per controllare l'avvenuta purificazione dei prodotti PCR. In seguito, al Nanodrop ND-100 Spectrophotometer, munito del software ND-1000 v.3.5.2., è stata determinata la concentrazione di ciascun gene funzionale presente nei due tipi di suolo (FST e SC) presi in esame, come descritto nel paragrafo 6.3.4. Dopodiché viene realizzato un gel d'agarosio (1x TAE, 1% w/v), per realizzare un'elettroforesi. Per valutare quantità e peso molecolare i frammenti caricati nel gel sono stati visualizzati al trans-illuminatore UV. La visualizzazione e lo spessore delle bande hanno permesso una comparazione con le concentrazioni di DNA ottenute al Nanodrop precedentemente.

Costruzione di librerie di cloni

La capacità di tagliare e riunire le molecole di DNA ha portato nel 1972 al primo esperimento di clonaggio del DNA. Per la prima volta fu possibile estrarre un frammento di DNA da una sorgente ed inserirlo, o clonarlo, nel DNA proveniente da un'altra sorgente. Forse, il tipo più comune di esperimento di clonaggio implica l'inserimento di un frammento di DNA estraneo in un vettore appropriato, affinché il frammento esogeno possa essere propagato in *E. coli* (Reece, 2006). Il protocollo utilizzato per costruire la *clone library* è quello descritto da Wang et al. (2014). In seguito alla purificazione dei prodotti PCR, come descritto nel paragrafo precedente, e alla corsa sul gel di agarosio per confermare la loro misura, si è proceduto ad effettuare la ligazione nel vettore T-pMD 19 (D102A, Takara). Il processo è avvenuto secondo le istruzioni fornite dal DNA Ligation kit. In un tubo da micro centrifuga è stata effettuata una miscela di reazione composta da: 4 µl di *template* di DNA; 1 µl di T-Vector pMD19; 5 µl di mix di ligazione (DNA Ligation Kit Mighty Mix), fornita dal kit. Il tutto è stato incubato *over night* a 16°C su un oscillatore. Dopodiché viene preparato un *medium* costituito da NaCl, tryptone, estratto di lievito, agar, acqua distillata e ampicillina e si attendono circa 20 minuti affinché si solidifichi nelle piastre Petri. Successivamente, i prodotti di PCR, incubati precedentemente *over night*, sono clonati nelle cellule α-DH-5 di *E. coli*. In un tubo da minicentrifuga sono iniettati 10 µl di tali prodotti e per 90 secondi sono posti in un bagnetto termostato a 42°C; dopodiché vengono iniettati 500 µl in ciascun campione di terreno di coltura rimasto liquido perché privo di agar. La soluzione viene messa su agitatore (Ningbo Haishu Saifu Test Instrument Factory - SAFE) a 102 rpm, 37°C per un'ora. Infine, 300 µl di ciascun campione sono inseriti con una spatola nelle piastre Petri, preparate precedentemente. Quest'ultime vengono incubate capovolte, al buio per 16h, su di un agitatore e successivamente consegnate alla compagnia che ha effettuato il sequenziamento con il metodo Sanger. Le sequenze di DNA sono state, poi, esaminate e modificate usando Bioedit e MEGA [versione 6.0]. L'analisi filogenetica è stata eseguita secondo Wang et al. (2014). Le sequenze dalla clone library sono state confrontate per omologia nella GenBank utilizzando lo strumento BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e confermate per la loro identità. Le affinità più strettamente correlate e le sequenze di riferimento supplementari sono state recuperate e successivamente allineate con cloni rappresentativi in MEGA [versione 6.0]. Gli Alberi di Neighbor-joining sono stati creati da MEGA [versione 6.0]. I Clusters sono stati valutati mediante analisi bootstrap attraverso la realizzazione di 1000 repliche.

Quantitative real-time PCR

La real-time RT-PCR quantitativa essendo accurata e precisa è applicabile ad un elevato numero di campioni ed è relativamente facile da eseguire. I sistemi di real-time PCR si basano sulla rilevazione e la quantificazione di un reporter fluorescente, il cui segnale aumenta in maniera direttamente proporzionale alla quantità del prodotto di PCR nella reazione. Nella forma più semplice, il reporter è il colorante SYBR Green specifico per il DNA a doppia elica. Il SYBR Green lega il DNA a doppia elica, probabilmente nel solco minore, e una volta eccitato, emette luce. Quindi, se il colorante viene incluso in una reazione di PCR, quando il prodotto di PCR si accumula la fluorescenza aumenta. I vantaggi del SYBR Green sono che è economico, facile da usare, e sensibile. La real-time PCR è un potente strumento di quantificazione, ma il costo dei reagenti e della strumentazione è molto più alto di quello di normali reazioni di PCR (Reece, 2006). Nell'ambito di questa ricerca, la qPCR è stata realizzata seguendo il protocollo modificato di Nie et al. (2014).

Gli standard per la real-time PCR sono stati preparati dai cloni preparati precedentemente per la costruzione della *clone library* (Wang et al., 2014). Il DNA plasmidico è stato estratto con il TIANprep Mini Plasmid Kit (Tiangen) dai suddetti cloni, seguendo il manuale d'istruzioni. Per verificare l'avvenuta estrazione del plasmide è stata misurata la concentrazione al Nanodrop ND-100 Spectrophotometer e per un ulteriore controllo viene realizzato un gel di agarosio (1x TAE, 1% w/v). Le curve standard per i geni target sono state costruite usando serie di diluizioni di 10 volte (da 10^2 a 10^8) dei plasmidi contenenti i frammenti del gene target proveniente da ciascun campione di suolo. Le diluizioni sono effettuate in duplicato. Infine sono stati eseguiti tre saggi indipendenti di qPCR per ogni campione.

La miscela di reazione per il primo gene funzionale esaminato, *pmoA*, è così costituita: 10 µl di SYBR 2 Premix Ex Taq; 0,4 µl per i *primers forward* (A189f) e *reverse* (A650); 0,2 µl di BSA (0,1%); 7 µl di H₂O, nuclease-free; 2 µl di campione di DNA; 2 µl di plasmide; 2 µl del controllo negativo. La PCR quantitativa è stata eseguita alla LightCycler 480II (Roche), con il seguente profilo termico: 96°C per 30 secondi; 30 cicli di 95°C per 5 secondi, 55°C per 1 minuto, e 72°C per 1 minuto.

La miscela di reazione per *mcrA* è invece, così preparata: 10 µl di SYBR 2 Premix Ex Taq; 0,4 µl per i *primers forward* (ME3MF; ME3MF-e) e *reverse* (ME2r') 0,2 µl di BSA

(0,1%); 7 µl di H₂O, nuclease-free; 2 µl di campione di DNA; 2 µl di plasmide; 2 µl del controllo negativo. La qPCR è stata eseguita alla LightCycler 480II (Roche), con il seguente profilo termico: 95°C per 30 secondi; 40 cicli di 95°C per 15 secondi, 62°C per 1 minuto, e 72°C per 40 secondi. I dati sono stati elaborati grazie all'utilizzo di due software LC480 ed Exor4 for XDMS.

6.3 Risultati e discussione

6.4 Caratteristiche chimico-fisiche dei suoli

Il riso è coltivato nel mondo su suoli con caratteristiche pedologiche, strutturali ed edafiche molto differenziate, dovute a una diversa origine geologica e all'evoluzione in differenti ambienti climatici (Ferrero, 2007). I suoli presi in esame, una volta giunti in laboratorio, sono stati innanzitutto caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico e tessiturale.

I suoli studiati presentano una differente localizzazione geografica e caratteristiche chimico-fisiche (Tab. 6.2) notevolmente diverse.

I suoli della provincia del Guangdong (FST) appartengono alla classe argilloso - sabbiosa; quelli del Sichuan (SC) invece alla classe sabbioso-limosa, secondo il criterio USDA. Secondo Ferrero (2007), il suolo che risulta più idoneo alla coltivazione è quello che è in grado di trattenere meglio l'acqua, evitandone le perdite per percolazione. In tal senso risultano particolarmente idonei i terreni argillosi, argilloso - limosi e limosi che, con le opportune pratiche agronomiche, consentono anche di procedere al rapido sgrondo dell'acqua, quando questa operazione si rende necessaria. I suoli FST presentano valori di pH subacidi (=5,96), mentre quelli SC sono sub-alcalini (pH=7,36). Data la tessitura e il valore di pH le risaie del Sichuan presentano anche un valore di tenore idrico pari al 41,67%, più elevato rispetto alle *wetlands* del Guangdong, con un contenuto idrico pari al 37,30%. I valori inerenti C totale e l'N totale per entrambi i *paddy soils* campionati presentano valori inferiori rispetto a quelli riportati da Nie et al. (2014) per la stessa tipologia edafica.

Inoltre, dai dati sperimentali ottenuti, si evidenzia anche un valore più alto del carbonio organico totale (30,43 g/ kg *paddy soil* secco) e del C/N, nei suoli SC, rispetto a quelli di FST. L'elevato contenuto di materiale organico è una caratteristica di questi suoli, il suolo sommerso di una risaia è un ambiente particolare con caratteristiche fortemente modificate dalle condizioni di anaerobiosi, che lo differenziano dalla maggior parte dei suoli

agrari. Dopo la sommersione, infatti, il suolo diventa velocemente anaerobico perché l'ossigeno presente viene velocemente consumato dai normali processi di respirazione e ossidazione. Inoltre, la flora microbica di un suolo sommerso cresce meno velocemente rispetto a quella di un suolo normalmente drenato (Ferrero, 2007).

Tabella 6.2: Proprietà chimico-fisico dei *paddy soils* campionati nelle due province cinesi.

Campione	Posizione	Tessitura suolo	pH	Tenore idrico (%)	TOC (g/kg suolo secco)	N totale (g/kg suolo secco)	C/N
FST	21°51'55N, 112°25'45E	Argilloso - sabbioso	5,96	37,30	20,12	1,86±0,00	9,22
SC	31°16'1N, 105°27'10E	Sabbioso - limoso	7,36	41,67	30,43	2,66±0,01	14,71

6.4.1 Caratterizzazione quantitativa del DNA

Tra i metodi applicati, quelli utilizzati per la valutazione della diversità genetica delle comunità microbiche si basano sull'estrazione degli acidi nucleici basati sull'utilizzo di kit. Il FastPrep® System ha permesso di ottenere concentrazioni di DNA pari a 157,10 ng/μl per i suoli del Sichuan e a 83,28 ng/μl per quelli del Guangdong. Tali concentrazioni sono in accordo con il range riportato in letteratura da de Liphay et al. (2004). Dalla letteratura scientifica a riguardo si evince che il processo di bead-beating su cui si basa il FastPrep® System è in grado di aumentare la resa di estrazione del DNA dal suolo rispetto ai metodi estrattivi tradizionali (Miller et al., 1999).

Il suolo del Sichuan è quello che presenta il più alto contenuto di DNA e di carbonio organico totale (TOC). Corrispondenza diretta tra contenuto di DNA, estratto utilizzando il FastPrep® System, e contenuto di TOC nei suoli è stata riportata da de Liphay et al. (2004) e da Lloyd-Jones et al. (2001). Gli stessi autori hanno ottenuto maggiore quantità di DNA da suoli con maggiore contenuto di limo più argilla.

Il grado di purezza del DNA estratto dai suoli studiati rappresenta un fattore molto importante nelle tecniche come la PCR. Qualora possibile esso è stato valutato attraverso la misura dell'assorbanza a 230, 260 e 280 nm di piccole aliquote della sospensione contenente il DNA. I rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} calcolati hanno permesso di valutare il grado di

contaminazione degli estratti rispettivamente da proteine e acidi umici. I valori di A_{260}/A_{280} compresi tra 1.81 e 1.93 hanno indicato l'assenza di contaminazione da materiale proteico; tale range è in accordo con quanto riportato da Ceccherini et al. (2007). Tebbe et al. (1993) hanno osservato un incremento del rapporto A_{260}/A_{280} da 1.2 a 1.8 per campioni di DNA estratto da suolo dopo l'applicazione di procedure di purificazione.

Dal momento che il rapporto di assorbanza A_{260}/A_{230} è risultato inferiore (0.21-0.77) al valore limite di 1.5 che indica il grado di purezza da acidi umici del DNA estratto dal suolo, si presume che il DNA estratto con il FastPrep® System presenti una contaminazione da acidi umici trascurabile. I contaminanti organici sono spesso presenti negli estratti di DNA ottenuti da suolo a prescindere dal metodo di estrazione applicato, come è ampiamente riportato in letteratura (Cullen et al., 1998; Kuske et al., 1998; Niemi et al., 2001; Robe et al., 2003; Zhou et al., 1996). Molti autori suggeriscono nella fase di estrazione l'utilizzo di sostanze in grado di allontanare gli acidi umici e l'applicazione di diverse procedure di purificazione degli estratti per l'impiego in analisi successive (Kuske et al., 1998; Porteous et al., 1997; Roose-Amsaleg et al., 2001; Zhou et al., 1996).

La maggiore efficienza estrattiva del FastPrep® System, oltre che i vantaggi relativi ai tempi richiesti per l'estrazione e alle piccole quantità di suolo necessarie, è stata fondamentale nella scelta del metodo da applicare ai suoli per lo studio della microflora edafica.

6.4.2 Clone library e filogenesi delle sequenze dei geni *pmoA* e *mcrA*

In questo studio sono stati indagati dal punto di vista filogenetico i geni funzionali *pmoA* e *mcrA*. Le sequenze dalla clone library sono state confrontate per omologia nella GenBank utilizzando BLASTN e per *pmoA* è stato scelto il 95% di similarità secondo quanto riportato da Rastogi et al. (2009) e per *mcrA* è stato scelto l'88% di similarità secondo Horz et al. (2012). Gli alberi Neighbour-joining sono stati costruiti con sequenze rappresentative di ciascun clone della library e da quelle più strettamente affini provenienti dal database GenBank. L'albero filogenetico per *pmoA* (Fig. 6.2) è costituito da 7 *clusters* e le sequenze presenti provengono da paddy soils, da rizosfera di risaie, da sedimenti di laghi, miniere d'oro e spartiacque. Le *operational taxonomic units* (OTU) presenti appartengono al tipo I dei batteri metanotrofi, a *Methylocaldum sp.* e a *Methylocystis*. Inoltre, tale albero è stato costruito con *Nitrosococcus mobilis* con Accession number (AF037108) come outgroup (Su et al., 2014).

L'albero filogenetico per *mcrA* (Fig. 6.3) è costituito da 5 *clusters* e le sequenze presenti provengono da sedimenti marini e rizosfera di risaie. Le OTU appartengono a *Methanobacterium*, *Methanocaldococcus*, *Methanogenic archaeon*, ed è stato utilizzato *Acquifex pyrophilus* (M83548) come outgroup (Watanabe et al., 2013).



Figura 6.2: Albero filogenetico per *pmoA* costruito con *Nitrosococcus mobilis* (AF 037108) come outgroup.

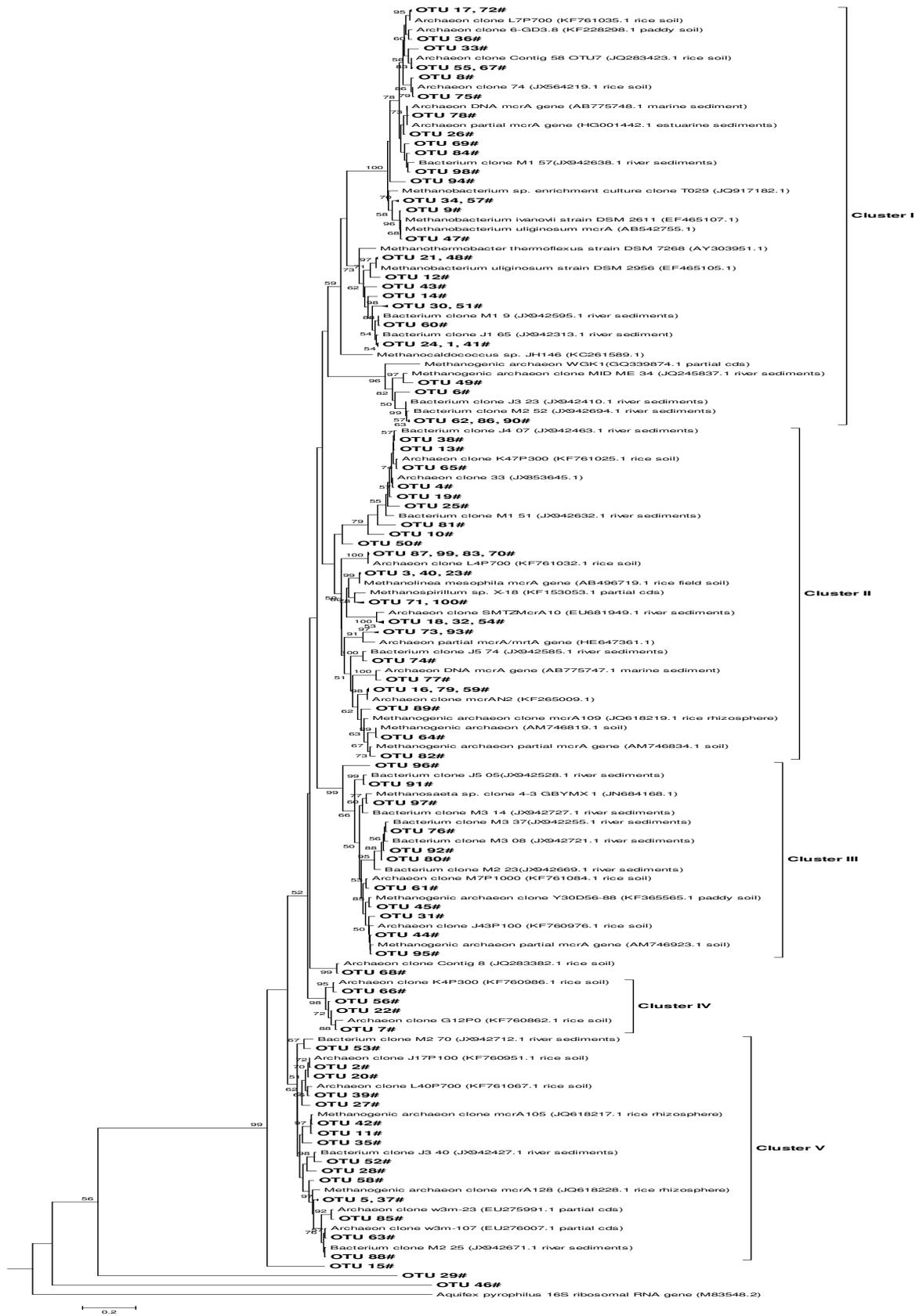


Figura 6.3: Albero filogenetico per *mcrA* costruito con *Acquifex pyrophilus* (M83548) come outgroup.

6.4.3 Abbondanza di *pmoA* e *mcrA* nei paddy soils

La real-time quantitative PCR è stata effettuata per valutare l'abbondanza dei geni funzionali investigati: *pmoA* (gene della metano monossigenasi particolato) e *mcrA* (gene della subunità A del metil coenzima M reduttasi).

Le qPCR effettuate hanno rivelato che per entrambi i geni funzionali considerati, *pmoA* e *mcrA*, il numero di copie è risultato differente nei due suoli (Tab. 6.3). Il gene funzionale *pmoA* è risultato più abbondante nei suoli del Sichuan (SC) rispetto a quelli del Guangdong (FST). La stessa situazione è stata registrata anche per il gene *mcrA*. Queste differenze potrebbero essere attribuite sia alle differenti caratteristiche chimico-fisiche dei suoli che alle diverse condizioni microclimatiche. Il suolo più alcalino e più ricco in sostanza organica ed azoto è anche quello con un numero maggiore di geni funzionali. Inoltre, secondo Ferrero (2007), con il crescere del pH, e l'instaurarsi di piene condizioni di anaerobiosi, viene a mancare una sufficiente quantità di ossidanti inorganici, cessa la produzione di H₂ e inizia la metanogenesi. Il range di valori registrato, in seguito alla quantitative PCR (Tab. 6.3), è in accordo con Bárcena et al. (2014). Inoltre, il gene funzionale *mcrA* è quello presente in numero di copie maggiore in entrambi i suoli campionati; ciò potrebbe indicare un prevalere dell'attività di produzione biogenica di metano in tali aree agricole sull'azione metanotrofica (Bourne et al., 2001).

Tabella 6.2: Abbondanza dei geni funzionali *pmoA* e *mcrA* nei paddy soils esaminati.

Gene	Siti	x10 ⁹ Copie g ⁻¹ suolo
<i>pmoA</i>	FST	2,70E+07
	SC	4,27E+07
<i>mcrA</i>	FST	5,43E+06
	SC	7,73E+06

6.5 Conclusioni dell'esperienza

Il suolo sembra essere la principale riserva di diversità genetica microbica e può essere considerato come un ambiente complesso. Questa estrema complessità risulta dall'interazione multipla di parametri che includono la tessitura del suolo e la struttura, il contenuto idrico, il pH, le variazioni climatiche e l'attività biotica (Robe et al., 2003).

I risultati ottenuti nella presente ricerca hanno messo in luce l'importanza dell'approccio molecolare di studio nella comprensione del funzionamento delle risaie e più in generale degli agroecosistemi.

La scelta del protocollo di estrazione del DNA non solo va ad influenzare la diversità filogenetica delle comunità microbiche, ma anche la diversità funzionale. Questo significa che la rilevata presenza di un gene funzionale e quindi dell'attività enzimatica può dipendere dalla natura della procedura di estrazione applicata al DNA. Nel corso di questa esperienza, infatti il suolo SC in cui è stata ottenuta la maggiore resa di DNA, con il maggiore contenuto di TOC, il pH più alcalino e il maggiore C/N è risultato quello più abbondante in metanogeni (*mcrA*), che a loro volta sono risultati essere anche quelli più diversificati filogeneticamente.

Capitolo 7. Conclusioni

In questo studio dato il crescente interesse per il mantenimento della biodiversità agraria e per la salvaguardia della qualità dei prodotti alimentari si è cercato di valutare le relazioni esistenti tra la qualità dei suoli, lo stato di salute della pianta di *Olea europaea* L., e la qualità degli oli prodotti sperimentalmente a partire da cultivar diverse endemiche dell'Italia centro-meridionale.

Un aiuto alla ricerca di tali relazioni non viene solo dalla stima di parametri chimico-fisici, biologici e biochimici, ma anche attraverso l'utilizzo di un'analisi statistica: l'RDA (Fig. 7.1). La *Redundance analysis* (RDA) è stata effettuata considerando tutti i parametri esaminati per le quattro matrici di studio: suolo, foglie, frutti e oli, ed in particolare, ha evidenziato le relazioni tra la variabile indipendente (suolo; nel grafico è in rosso) e le variabili dipendenti (foglie e frutti, in nero; e oli, cerchiati in verde). Le variabili più distanti dal centro sono quelle più correlate agli assi e tra di loro. Sostanzialmente questa analisi statistica ha coadiuvato questa ricerca sperimentale nella comprensione di quali parametri realmente possono influenzare la qualità di un prodotto fondamentale dal punto di vista agroalimentare come l'olio extravergine di oliva e quali invece, influenzano la sua composizione solo marginalmente. Inoltre dall'analisi è evidente come l'importanza dei diversi parametri e le relazioni conseguenti possono cambiare da un anno all'altro.

Questa ricerca ha, innanzitutto, evidenziato che la qualità di un olio, dal punto di vista della stabilità ossidativa, che è uno dei requisiti agroalimentari fondamentali, può dipendere dalle caratteristiche biologiche dei suoli e in minima parte anche da quelle chimiche, che favoriscono la produzione di pigmenti antiossidanti negli oli, come i carotenoidi e le clorofille, che sono tra i principali responsabili della sua stabilità ossidativa.

L'analisi RDA, ha infatti, confermato che i parametri biologici (Respirazione microbica e BFT) e il rapporto C/N del suolo sono in relazione tra di loro, infatti sono posizionati nello stesso quadrante. Questi parametri a loro volta influenzano positivamente l'attività del PSII (Φ PSII) delle foglie, il contenuto di acqua nei frutti e di pigmenti quali, appunto, le clorofille e carotenoidi degli oli. Questi parametri, hanno, in particolare caratterizzato i siti appartenenti alle varietà *Pisciottana*, *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo* durante il II anno di campionamento. Graficamente si denota anche che parametri come la CIM del suolo e lo SLA fogliare, essendo rappresentati da frecce di dimensioni inferiori, influenzano

in misura minore rispetto agli altri, il contenuto di antiossidanti negli oli delle cv. prese in esame.

Inoltre, l'influenza del fattore varietale, è confermata, oltre che dai risultati sperimentali ottenuti per la stessa cultivar cresciuta in siti diversi, anche dall'analisi dell'RDA, per la stretta vicinanza sugli assi, per quanto riguarda le cv. *Frantoio* e *Moraiolo*, campionate ad Assisi e Perugia.

Per quanto concerne gli indici di qualità i campioni di olio estratti si sono distinti, oltre che per il contenuto di acidità libera estremamente bassa, anche per i valori del numero di perossidi e degli indici spettrofotometrici, molto contenuti e inferiori ai limiti di legge. I risultati sperimentali ottenuti hanno rilevato, però, una differenza negli indici degli oli misurati tra la regione Campania e Umbria. A tal proposito, in accordo, con quanto riportato dalla letteratura scientifica (Sakouhi et al., 2011; di Vaio et al., 2013; Inglese et al., 2011), i risultati ottenuti, e l'analisi dell'RDA, hanno confermato che l'abbondanza delle precipitazioni e la variazione delle temperature influenzano positivamente non solo gli indici di qualità e la resa % degli oli, ma anche il rapporto C/N fogliare. Questi parametri sono particolarmente importanti per gli uliveti delle varietà *Ortice*, *Pisciottana* sia di Licosa che di Pisciotta ed infine la cv. *Frantoio* a Perugia; ciò è evidente sia per l'anno 2012 che per il 2013. Si denota quindi, una chiara influenza dell'ambiente e quindi dell'area di coltivazione sull'attribuzione della categoria merceologica ad un olio, che è uno dei requisiti principali per il riconoscimento del marchio DOP. Nel caso dei siti cilentani campionati sia a Pisciotta che a Licosa sotto la cv. *Pisciottana* l'influenza delle condizioni ambientali, può essere così rilevante da influenzare non solo le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli e dell'intera pianta (C/N fogliare più alto), che tende ad investire maggiormente in carbonio strutturale per fronteggiare alle eventuali situazioni di stress idrico, ma anche quelle degli oli. Infatti, gli oli della cv. *Pisciottana* presentano contenuti maggiori di acido oleico e valori di perossidi, che rientrano ampiamente nei limiti di legge stabiliti ma che però potrebbero portare ad una minore *shelf-life*.

L'analisi statistica dell'RDA conferma la relazione positiva, già evidente nei risultati sperimentali ottenuti, tra il contenuto in polifenoli totali dei frutti e degli oli per i quali si distinguono in particolare le cultivar umbre; con le caratteristiche carpologiche del frutto (rapporto Polpa/Nocciolo e contenuto proteico). Inoltre, tali parametri oltre ad essere in relazione tra di loro, sono correlati maggiormente ai suoli sotto tutte le cultivar prese in

esame, ad eccezione del suolo sotto *Pisciottana*, campionato a Licosa e considerato un sito particolare, perché sottoposto al disturbo da sovrapascolo di cinghiali.

Il contenuto in polifenoli totali degli oli estratti dalle varietà genetiche campane ed umbre, non risulta influenzare in modo rilevante, né a sua volta risulta essere influenzato dal contenuto in sostanza organica dei suoli e dalle caratteristiche idriche fogliari (RWC e LDMC). Infatti, confrontando la stessa cultivar cresciuta in siti diversi è risultato che l'influenza del genotipo in alcuni casi è così evidente, come nelle varietà umbre, da prevalere su tutte le altre condizioni. Infatti, nonostante i suoli sotto *Frantoio* e *Moraiolo* potrebbero essere considerati tipici esempi di suoli agrari, poveri di sostanza organica e con un alto rapporto C/N, dove a seguito delle pratiche agricole si è avuto un depauperamento delle risorse organiche con piccoli accumuli di sostanze più difficili da degradare ed il cui consumo è più complesso, la composizione degli oli estratti resta qualitativamente nella media secondo il range ottenuto sperimentalmente e riportato da Montedoro et al. (1992). D'altronde, come descritto anche in letteratura (Terashima & Hikosaka, 1995), si potrebbe dedurre che la pianta, investendo in una maggiore allocazione delle risorse nella biomassa, è in grado di produrre una quantità maggiore di metaboliti secondari (sostanze fenoliche).

In questo studio di fondamentale importanza sono risultate le caratteristiche qualitative dei suoli che si ripercuotono sulla buona produttività della pianta, in particolare sull'attività antiossidante, che segue lo stesso *trend* del dosaggio di polifenoli non solo nei frutti ma anche negli oli, ed è, per tale motivo, in grado di prolungarne anche la *shelf-life*. Dai risultati sperimentali ottenuti, i suoli sotto la cultivar *Ravece* si sono distinti per tutti questi parametri chimico-fisici, e in misura minore, quelli sotto la varietà *Ortice* e quelli sotto le varietà umbre. Le caratteristiche qualitative dei suoli e quindi dell'area di coltivazione della pianta *Olea europaea* L., costituiscono l'essenza degli oli appartenenti a queste varietà, che li rendono oltre che unici dal punto di vista organolettico, anche tipici del territorio come documentato dal disciplinare per la DOP e dalla letteratura scientifica a riguardo (Di Vaio et al., 2013). La correlazione tra i parametri chimico-fisici (pH; T.I.; CIM; CSC) e biologici (biomassa microbica) dei suoli, i quali influenzano positivamente l'area fogliare (LA), l'indice di produttività della pianta (SLA) e l'attività antiossidante dei frutti, saggiata con il *FRAP assay* è confermata dall'ultimo quadrante dell'analisi statistica della *Redundance analysis*.

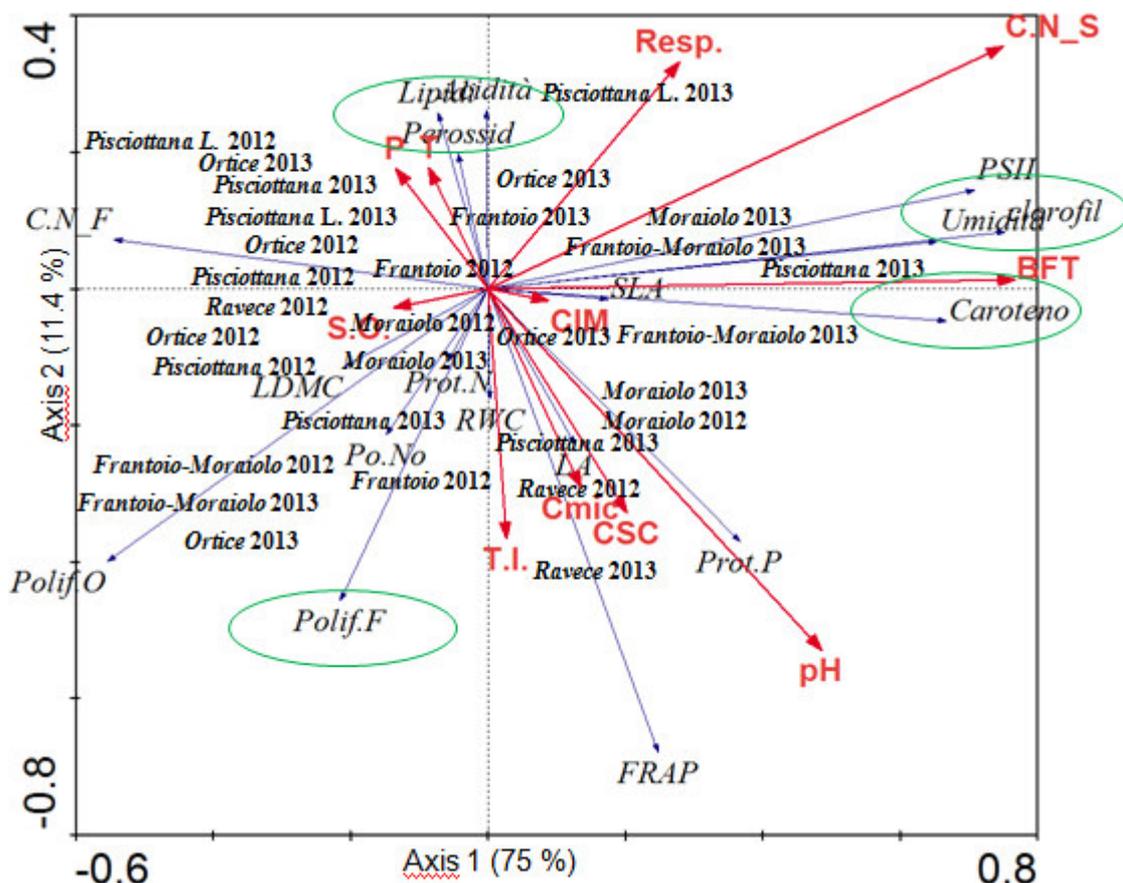


Figura 7.1: Risultati ottenuti dall'analisi RDA, in cui la variabile indipendente è costituita dalle caratteristiche chimico-fisiche (in rosso; CIM; TI; SO; CSC; pH; C/N_S.) e biologiche (in rosso; Cmic; Resp; BFT) dei suoli sotto le cultivar *Pisciottana*, *Ravece*, *Ortice*, *Frantoio* e *Moraiolo*. Le variabili dipendenti sono: i tratti funzionali e fotochimici fogliari (in nero; LA; SLA; RWC; LDMC; C/N_F; ΦPSII); le caratteristiche chimico-fisiche (in corsivo *Po.No.*; *Umidità*; *Lipidi*; *Prot. P*; *Prot. N*) e biochimiche (in corsivo; *Polif. F*; *FRAP*) dei frutti; gli indici di qualità degli oli (in verde; *Acidità*; *Perossidi*; *Polif. O*; *Caroteno* e *clorofil*).

Abbreviazioni: CIM=Capacità idrica massimale, TI=Tenore idrico, SO=sostanza organica, CSC=capacità di scambio cationico, C/N_S=rappporto C/N suolo, Cmic=biomassa microbica, Resp=respirazione microbica, BFT=biomassa fungina totale, LA=area fogliare, SLA= area fogliare specifica, RWC=contenuto idrico relativo, LDMC=contenuto fogliare di materia organica secca, C/N_F=rappporto C/N foglie, ΦPSII=resa quantica del trasporto elettronico, *Po.No*= rapporto polpa/nocciolo, *Prot. P*=contenuto proteico polpa, *Prot. N*=contenuto proteico nocciolo, *Polif. F*= contenuto polifenoli frutto, *FRAP*=attività antiossidante, *Polif. O*=contenuto polifenoli olio, *Caroteno*=contenuto carotenoidi, *clorofil*=contenuto clorofilla.

Infine dai risultati ottenuti è evidente che, l'uliveto a *Pisciottana* di Licosa subisce l'influenza del pascolo del cinghiale. Infatti, l'attività di *Sus scrofa* L. sembra influenzare le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli, soprattutto sostanza organica, CSC, pH e quelle biologiche, riducendone alcune ed incrementandone altre.

La compattazione, dovuta all'attività di calpestio di alcune aree così come l'attività di aratura legata alle grufolate di questi animali nonché la riduzione della necromassa vegetale che viene asportata soprattutto nell'orizzonte superficiale, così da esporre maggiormente il suolo a fenomeni di lisciviazione e a perdite di nutrienti, insieme all'eventuale rilascio di deiezioni, e a caratteristiche fogliari, atte ad investire in tessuti di sostegno adatti al superamento di particolari condizioni di stress come l'insoglio, comporta la produzione di frutti di dimensioni inferiori rispetto a quelli delle aree non disturbate, con più bassi valori di polifenoli totali e attività antiossidante e oli qualitativamente inferiori sia dal punto di vista degli indici di qualità che di composizione fenolica totale.

Dalla presente ricerca è possibile concludere che, la concomitanza di caratteristiche varietali e pedo-ambientali possono contribuire ad ottenere un prodotto dalle caratteristiche compositive uniche non solo dal punto di vista agroecologico ma anche alimentare nell'ambito della Dieta Mediterranea. Da qui, l'importanza di preservare la biodiversità agraria dei suoli che costituiscono il substrato per la crescita di determinate specie varietali, grazie alle quali è possibile il mantenimento della biodiversità alimentare, che costituisce il fulcro principale della Dieta Mediterranea.

Capitolo 8. Bibliografia

Aboal J. R., Arevalo J. R., Fernandez A., (2005). Allometric relationships of different tree species and stand above ground biomass in the Gomera laurel forest (Canary Islands). *Flora*, 200:264-274.

Abrams M. D., Kubiske M. E., Mostoller S. A., (1994). Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. *Ecology*, 75:123-133.

Ajana H., El Antari A., Hafidi A., (1999). Evolution of biométrie parameters and chemical composition of olives from the Moroccan Picholine variety during fruit ripeness. *Grasas y Aceites*, 50 (1):1-6.

Ajana H., El Antari A., Hafidi A., (1999). Evolution of biométrie parameters and chemical composition of olives from the Moroccan Picholine variety during fruit ripeness. *Grasas y Aceites*, 50 (1):1-6.

Alexander M., (1977). *Introduction to Soil Microbiology*. Wiley, NY.

Allen B. L., (1989). *Chemical analysis of ecological materials*. Blackwell Scientific Publication.

Allsopp N., (1999). Effects of grazing and cultivation on soil patterns and processes in the Paulshoek area of Namaqualand. *Plant Ecology*, 142:179-187.

Alpi A., Pupillo P., Rigano C., (2000). *Fisiologia delle piante*, Ed. Edises.

Altieri M. A., (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74:19-31.

Altieri, M. A., (1994). Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems. *Haworth Press*, New York, p. 185.

Altiok E., Baycin D., Bayraktar O., Ulku, S., (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62:342-348.

Amiot M. J., Fleuriet A., Macheix J. J., (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34:823-826.

Anderson J. P. E., (1982). Soil respiration. *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison Wisconsin, pp. 831-871.

Anderson J. P. E., Domsch K. H., (1975). Measurements of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 21:314-322.

Anderson T. H., (1994). Physiological analysis of microbial communities in soil: applications and limitations. *Beyond the biomass*, (Ritz K., Dighton J., Giller K. E., eds). John Wiley & Sons. Chichester , pp:67-76.

Anderson T. H., Domsch K. H. (1993). The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 25:393-395.

Anderson T. H., Domsch K. H., (1986). Carbon assimilation and microbial activity in soil. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 149:457-468.

Angelopoulos K., Dichio B., Xiloyannis C., (1996). Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and re-watering. *Journal of Experimental Botany*, 47 (301):1093-110.

Angerosa F., D'Alessandro N., Corana F., (1996 a). Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography chimica ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 736:195-203.

Aranda V., Ayora-Cañada M. J., Domínguez-Vidal A., Martín-García J. M., Calero J., Delgado R., Verdejo T., González-Vila F. J., (2001). Effect of soil type and management (organic vs. conventional) on soil organic matter quality in olive groves in a semi-arid environment in Sierra Mágina Natural Park (S Spain). *Geoderma*, 164:54-63.

Atlas R. M., Bartha R., (1998). *Microbial ecology*. Fundamentals and applications, 4th edition Addison-Wesley.

Avena G., Blasi C., Caporali F., Dall'Aglio M., De Lillis M., Dowgiallo G., Mazzoleni S., Nimis P., Pacini E., Paolella A., Pedrotti F., Pignatti S., Piussi P., Salleo S., Venanzoni R., Virzo De Santo A., (1995). *Ecologia Vegetale*. UTET.

Bacelar E. A., Moutinho-Pereira J. M., Goncalves B. C., Lopes J. I., Correia C. M., (2009). Physiological responses of different olive genotypes to drought conditions. *Acta Physiology Plant*, 31:611-621.

Bacelar E., Santos D.L., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves, B.C., Ferreira, H.F., Correia, C.M., (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*, 170:596-605.

Baldini E., Marangoni B., (1993). *Coltivazioni Arboree*, Ed. Loescher-Torino.

Barbarisi C., Di Stasio M., La Cara F., Nazzaro M., Siano F., Coppola R., Volpe F., Di Mattia A., Volpe M. G. (2014). Shelf-life of Extra Virgin Olive Oils from Southern Italy. *Current Nutrition & Food Science*, 10:00-00.

Bárcena T. G., D'Imperio L., Gundersen P., Vesterdal L., Priemé A., Christiansen J. R., (2014). Conversion of cropland to forest increases soil CH₄ oxidation and abundance of CH₄ oxidizing bacteria with stand age. *Applied Soil Ecology*, 79:49-58.

Bardgett R. D., Wardle D. A., (2003). Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology*, 84:2258-2268.

Bashan Y., Puente M. E., Rodriguez-Mendoza M. N., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R., Pedrin S., (1995). Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Applied Environmental Microbiology*, 61:1938-1945.

Battigelli J. P., Mc Intyre G. S., Broersma K., Krzic M., (2003). Cattle grazing effects on density and diversity of soil mesofauna in british Columbia Grasslands. *Canadian Journal of Soil Science*, 83:533-535.

Benedetti A., (2010). *Soil System Scale*. Indicatori di biodiversità per la sostenibilità in agricoltura. Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura.

Benedetti A., Dell'Abate M.T., Mocali S., Pompili L., (2006). Indicatori microbiologici e biochimici della qualità del suolo. *Atlas, Atlante di Indicatori della Qualità del Suolo*, a cura di Paolo Sequi, Anna Benedetti e Maria Teresa Dell'Abate, CRA-Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, pp. 65-81.

Benitez E., Nogales R., Campos M., Ruano F., (2006). Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology*, 32:221-231.

Benzie I. F. F., Strain J. J., (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76.

Berg B., Söderström B., (1979). Fungal biomass and nitrogen in decomposing Scots pine needle litter. *Soil Biology & Biochemistry*, 11:339-341.

Bianco A. D., Uccella N., (2000). Biophenolic components of Olives. *Food Research International*, 39:475-485.

Bianco A., Chiacchio M. A., Grassi G., Iannazzo D., Piperno A., Romeo R., (2006). Phenolic components of *Olea europaea*: Isolation on new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, 95:562-565.

Blanke M. M., Lenz F., (1989). Fruit photosynthesis. *Plant Cell & Environment*, 12: 31-46.

Bloem J., Schouten T., Didden W., Akkerius G.J., Keidel H., Rutgers M., Breure T., (2003). Measuring soil biodiversity: experiences, impediments and research needs. Agricultural Impacts on soil erosion and soil biodiversity: developing indicators for policy analysis. Proceedings from OECD Expert Meeting, Rome, Italy, March 2003. Ed. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, p.109.

Bolton Jr H., Elliot L. F., Papendick R. I., Bezdicek D. F., (1985). Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effects of fertilization and cropping practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 17:297-302.

- Borneman J., Skroch P. W., O' Sullivan K. M., Palus J. A., Rumjanek N. G., Jansen J. L., Nienhuis J., Triplett E. W., (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1935-1943.
- Bosabalidis A., Kofidis G., (2002). Comparative effects of drought on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science*, 163:375-379.
- Boskou D., (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in food science & technology*, 17:505-512.
- Bourne D. G., McDonald I. R., Murrel C. J., (2001). Comparison of *pmoA* PCR Primer Sets as Tools for Investigating Methanotroph Diversity in Three Danish Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (9):3802-3809.
- Bown D., (1995). *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*, Dorling Kindersley, London.
- Bratton S. P., (1975). The effect of the European wild boar, *Sus scrofa*, on Gray beech forest in the great Smoky Mountains. *Ecology*, 56:1356-1366.
- Breton C., Terral J. F., Pinatel C., Médail F., Bonhomme F., Bervillé A., (2009). The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus Biologies*, 332:1059-1064.
- Briske D. D., Richards J. H. (1995). Plant responses to defoliation: A physiological, morphological, and demographic evaluation. *Widlands Plants: Physiological Ecology and Development Morphology*. Eds. D. J., p.927.
- Brookshire E. N. J., Valett H. M., Thomas S. A., Webster J. R., (2007). Atmospheric N deposition increases organic N loss from temperate forests. *Ecosystems*, 10:252-262.
- Brunori G., (2005). Biodiversità e tipicità. Paradigmi economici e strategie competitive. Atti del XLII Convegno di Studi. Società Italiana di Economia Agraria. Pisa, 22-24 settembre. Ed. Franco Angeli.
- Brush S.B., (1982). The natural and human environment in the central Andes. *Mountain Research and Development*, 2:14-38.
- Bubola K. B., Koprivnjak O., Sladonja B., (2012). Influence of filtration on volatile compounds and sensory profile of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 132:98-03.
- Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A., (1998). *Ecologia generale*, UTET.
- Burns K.C., (2004). Patterns in specific leaf area and the structure of a temperate heath community. *Diversity and Distributions*, 10 (2):105-112.
- Cabras P., Martelli A., (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin.
- Calow P., (1987). Towards a definition of functional ecology. *Functional Ecology*, 1:57-61.

- Casals P., Gimeno C., Carrara A., Lopez-Sangil L., Sanz M. J., (2009). Soil CO₂ efflux and extractable organic carbon fractions under simulated precipitation events in a Mediterranean Dehesa. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1915-1922.
- Ceccherini M. T., Ascher J., Pietramellara G., Vogel T. M., Nannipieri P., (2007). Vertical advection of extracellular DNA by water capillarity in soil columns. *Soil Biology & Biochemistry*, 39:158-163.
- Cerretani L., Giuliani A., Cichelli A., (2014). Le sostanze naturali che colorano l'extra. *Olio e Olio* n.3/2014, 20-22.
- Chapin III F.S., (1993). Functional role of growth forms in ecosystem and global processes. *Scaling physiological processes* (Ehleringer j.r., field, c.b., eds.). Leaf to globe. *Academic press inc*, pp.287-312.
- Chartzoulakis K., Patakas A., Bosabalidis A. M., (1999). Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 42:113-120.
- Chase J. M., Leibold M. A., Downing A. L., Shurin J. B., (2000). The effects of productivity, herbivory, and plant species turnover in grassland food webs. *Ecology*, 81:2485-2497.
- Chatzistathis Th., Theriosa I., Alifragis D., Dimassi K., (2010). Effect of sampling time and soil type on Mn, Fe, Zn, Ca, Mg, K and P concentrations of olive (*Olea europaea* L., cv. 'Koroneiki') leaves. *Scientia Horticulturae*, 126:291-296.
- Chaves M. S., (1975). Caractères des sols et fertilization de l'Olivier. 2ème Séminaire Oleicole International. Cordoue, 6-17 October 1975, pp.58-64.
- Chiarini L., Bevivino A., Dalmastrì C., Nacamulli C., Tabacchioni S., (1998). Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Applied Soil Ecology*, 8:11-18.
- Cimato A., (1990). Effect of agronomic factors on virgin olive oil quality. *Olivae*, 31:20-31.
- Cimato A., Franchini E., (2002). *La fertilizzazione dell'oliveto - La qualità dell'olio d'oliva*. ARSIA, Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo -forestale. Istituto sulla Propagazione delle Specie Legnose Consiglio Nazionale delle Ricerche, via Pietrapiana, 30 - 50121 Firenze.
- Cinquanta L., Esti M., La Notte E., (1997). Evolution of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil During Storage. *JAOCs*, Vol. 74.
- Coley P. D., Bryant J. P., Chapin F. S., (1985). Resource availability and plant anti herbivore defence. *Science New Series*, 230 (4728):895-899.
- Colwell R. R., (1997). Microbial biodiversity and biotechnology. Reaka-Kudla ML, Wilson DE, Wilson EO (eds) *Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources*. *Joseph Henry Press*, University of Washington, Washington, DC, pp. 279-288.

- Conde C., Delrot S., Geros H., (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165:1545-1562.
- Connor D. J., Fereres E., (2005). The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Horticultural Reviews*, 34:155-229.
- Conrad R., Chan O. C., Claus P., Casper P., (2007). Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Limnology and Oceanography*, 52 (4):1393-1406.
- Cornelissen J. H. C., Lavorel S., Garnier E., Diaz S., Buchmann N., Gurvich D. E., Reich P. B., ter Steege H., Morgan H. D., van der Heijden M. G. A., Pausas J. G., Poorter H., (2003). A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51:335-380.
- Cowling R. M., Rundel P. W., Lamont B. B., Arroyo M. K., Arianoutsou M., (1996). Plant diversity in Mediterranean-climate regions. *Trends Ecology*, 11:352-360.
- Cullen D. W., Hirsch P. R., (1998). Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology & Biochemistry*, 30 (8-9):983-993.
- Curiel Yuste J., Baldocchi D. D., Gershenson A., Goldstein A., Misson L., Wong S., (2007).
- D'Aponte L., Nocerino S., Di Vaio C., (2012). L'olivo in Campania. Il germoplasma dell'olivo in Campania. Descrizione delle principali *cultivar* ed effetto dell'ambiente. A cura di Claudio Di Vaio, Imago Editrice s.r.l.
- D'Imperio M., Dugo G., Alfa M., Mannina L., Segre A., (2007). Statistical analysis on Sicilian olive oils. *Food Chemistry*, 102:956-965.
- Dabbou S., Issaoui M., Servili M., Taticchi A., Sifi S., Montedoro G.F., Hammami M., (2010). Characterisation of virgin olive oils from European olive cultivars introduced in Tunisia. *European Journal of lipid science and technology*, 111:392-401.
- de Liphthay J. R., Enzinger C., Johnsen K., Aamand J., Sørensen S. J., (2004). Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil biology & Biochemistry*, 36:1607-1614.
- De Marco A., Ranucci S., Meola A., Virzo De Santo A., (2006). *Decomposition of leaf litter of Phyllirea Angustifolia L., and mixed aboveground litter of herbaceous species from a mediterranean maquis*, EGU General Assembly. Vienna, Austria, 02-07-April 2006. *Geophysical Research Abstracts* Vol.8.
- Degens P. B., Schipper A. L., Sparling G. P., Duncan L. C., (2001). Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (9):1143-1153.

- Del Caro A., Vacca V., Poiana M., Fenu P., Piga A., (2006). Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits. *Food Chemistry*, 98:311-316.
- Derner J. D., Briske T. W., (1997). Boutton does grazing mediate soil carbon and nitrogen accumulation beneath C4, perennial grasses along an environmental gradient? *Plant and Soil*, 191: 147-156.
- Desouky I. M., Haggag L. F., Abd El-Migeed M.M.M., El-Hady E.S., (2009). Changes in Some Physical and Chemical Properties of Fruit and Oil in Some Olive Oil Cultivars During Harvesting Stage. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (6):760-765.
- Di Vaio C., Nocerino S., Paduano A., Sacchi R., (2013). Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93:1134-1139.
- Dichio B., Xiloyannis C., Angelopoulos K., Nuzzo V., Bufo S. A., Celano G., (2003). Drought-induced variations of water relation in *Olea europaea*. *Plant Soil*, 257:381-389.
- Domínguez J., Negrín M. A., Rodríguez C. M., (2001). Aggregate water-stability, particle-size and soil solution properties in conductive and suppressive soil to Fusarium wilt of banana from Canary Islands (Spain). *Soil biology and biochemistry*, 33:449-455.
- Doran J. W., (1980). Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Science Society of American Journal*, 44:765-771.
- Doran J. W., Parkin T. B., (1994). *Defining and assessing soil quality*. (Doran J. W., Coleman D. C., Bezdicek D. F., Stewart B. A. eds.). *American society of agronomy special publication*, Madison, WI, 35:3-21.
- Drinkwater L. E., Wagoner P., Sarantonio M., (1998). Legume based cropping system have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature*, 396 (19):262-264.
- Ekelund F. , Rønn R., Christensen S., (2001). Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. *Soil Biology & Biochemistry*, 33:475-481.
- Ennajeh M., Tounekti T., Vadel A. M., Khemira H., Cochard H., (2008). Water relation and drought-induced embolism in olive (*Olea europaea* L.) varieties “Meski” and “Chemlali” during severe drought. *Tree Physiology*, 28:971-976.
- Esteve C., Del Rio C., Marina M. L., Garcia M. C., (2011). Development of an ultra-high performance liquid chromatography analytical methodology for the profiling of olive (*Olea europaea* L.) pulp proteins.
- Eviner V. T., Chapin III F. S., (2003). Functional matrix: A conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34:455-85.
- Fadda C., Del Caro A., Sanguinetti A. M., Urgeghe P.P., Vacca V., Arca P. P., Piga A., (2012). Changes during storage of quality parameters and in vitro antioxidant activity of extra

virgin monovarietal oils obtained with two extraction technologies. *Food Chemistry*, 134:1542-1548.

Faraloni C., Cutino I., Petruccelli R., Leva A. R., Lazzeri S., Torzillo G., (2011). Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for in vitro screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 73:49-56.

Farinelli D., Ruffolo M., Scatolini G., Siena M., Tombesi A., (2009). Monitoraggio del periodo ottimale di raccolta IPG nella DOP "Umbria". *Acta Italus Hortus*, 1:159-163.

Ferrero, (2007). *Coltura e Cultura*. Edizioni *Bayer Crop Science*.

Fialho J. F., Borges A. C., Barros N. F., (1991). Cobertura vegetal e as características químicas e físicas e atividade da microbiota de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 15:21-28.

Field C., Mooney H. A., (1986). The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. *On the economy of plant form and function* (Givinish T.J., eds). Cambridge University Press, Cambridge, 493-523.

Fiorino P., Ottanelli A., (2004). Crescita ed inflazione dei frutti di cultivar di olivo (*Olea europaea*) nella Toscana interna e possibili influenze dell'ambiente nella determinazione dei trigliceridi. Atti del Convegno Nazionale 'Germoplasma Olivicolo e Tipicità dell'Olio', Perugia, pp. 158-164.

Fjellbirkeland A., Torsvik V., Overeas L., (2001). Methanotrophic diversity in an agricultural soils evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxoF* and 16S rDNA sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79:209-17.

Florenzano G., (1983). *Fondamenti di microbiologia del terreno*. Redi: edizioni per l'agricoltura.

Folch J., Lee M., Sloane S., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 266:497-509.

Fratoni F., Piastrelli G., (1984). Il bosco in funzione dell'allevamento degli animali selvatici. Atti III Convegno Umbriacarni, pp.125-152.

Fritze H., (2000). Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. *European Journal of Soil Science*, 51:565-573.

Fu L., Xu B., Xu X., Gan R., Zhang Y., Xia E., Li H., (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129:345-350.

Gálvez M., Parra M. A., Navarro C., (2004). Relating tree vigour to the soil and landscape characteristics of an olive orchard in a marly area of southern Spain. *Scientia Horticulturae*, 101:291-303.

- Garbeva P., van veen J. A., van Elsas J. D., (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42:243-70.
- Garcia F. O., Rice C. W., (1994). Microbial biomass dynamics in tallgrass prairie. *Soil Science society of American Journal*, 58: 816-823.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15:8813-8826.
- Garnier E., Aronson J., (1998). Nitrogen use efficiency from leaf to stand level: clarifying the concept. *Inherent variation in plant growth* (Lambers H., Poorter H., Van Vuuren M.M.I., eds). Physiological mechanisms and ecological consequences. Backhuys Publishers: Le iden, 515-538.
- Garnier E., Cordonnier P., Guillerm J. L., (1997). Specific leaf area and leaf nitrogen concentration in annual and perennial grass species growing in Mediterranean old fields. *Oecologia*, 111 (4):490-498.
- Garnier E., Laurent G., (1994). Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytologist*, 128:725-736.
- Gessa C., Testini C., (1989). *Chimica del suolo*. Patron, Bologna.
- Giudicianni I., (2006). *L'olivo nella storia. I profumi dell'olio*. A cura di Maria Luisa Ambrosino. Società Editrice Imago Media.
- Gómez J. A., Romero P., Giráldez J. V., Fereres E., (2004). Experimental assessment of runoff and soil erosion in an olive grove on a Vertic soil in southern Spain as affected by soil management. *Soil Use and Management*, 20:426-431.
- Gómez J. A., Guzmán M. G., Giráldez J. V., Fereres E., (2009). The influence of cover crops and tillage on water and sediment yield, and on nutrient, and organic matter losses in an olive orchard on a sandy loam soil. *Soil & Tillage Research*, 106:13-144.
- Gomez-Alonso S., Mancebo-Campos V., Salvador D. M., Fregapana G., (2007). *Food Chemistry*, 100:36-42.
- Goodall D. W., (1983). *Terrestrial ecosystem: temperate broad-leaved evergreen forest*. Ecosystem of the world, 10, Amsterdam.
- Grime J. P., (1974). Vegetation classification by reference to strategies. *Nature*, 250:26-31.
- Grime J. P., (1998). Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecologist*, 86:902-910.
- Grime J. P., (2001). *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. Second edition. John Wiley and Sons, Chichester, UK.152

- Gucci R., Perri E., Servili M., (2004). Il miglioramento delle caratteristiche organolettiche tipiche degli oli extra vergini di oliva rispetto alle esigenze di mercato. Stilgrafica Srl Roma Campagna.
- Guerfel M., Baccouri O., Boujnah D., Chaïbi W., Zarrouk M., (2009). Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119:257-263.
- Guerfel M., Baccouri O., Boujnah D., Chaïbi W., Zarrouk M., (2009). Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119:257-263.
- Gulías J., Flexas J., Mus M., Cifre J., Lefi E., Medrano H., (2003). Relationship between Maximum Leaf Photosynthesis, Nitrogen Content and Specific Leaf Area in Balearic Endemic and Non endemic Mediterranean Species. *Annals of Botany*, 92:215-222.
- Gutierrez J., Kim S. Y., Kim P. J., (2013). Effect of rice cultivar on CH₄ emissions and productivity in Korean paddy soil. *Field Crops Research*, 146:16-24.
- Hachicha Hbaieb R., Kotti F., García-Rodríguez R., Gargouri M., Sanz C., Pérez A. G., (2015). Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chemistry*, 174:240-247.
- Hajimahmoodi M., Sadeghi N., Jannat B., Oveisi M. R., Madani S., Kiayi M., Akrami M. R. E., Ranjbar A. M., (2008). Antioxidant Activity, Reducing Power and Total Phenolic Content of Iranian Olive Cultivar. *Journal of Biological Sciences*, 8 (4):779-783.
- Hallam S. J., Girguis P. R., Preston C. M., Richardson P. M., De Long E. F., (2003). Identification of Methyl Coenzyme M Reductase A (*mcrA*) Genes Associated with Methane-Oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9):5483-5491.
- Handelsman J., (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:669-685.
- Hannan J., Lee J., Carr L., Lankerani A., (1995). Human disturbance and natural habit: a biome level analysis of a global data set. *Biodiversity and conservation*, 4:128-155.
- Hodgson D. A., Rastetter E. B., Shaver G. R., Agren G. I., (1999). Effects of plant growth characteristics on biogeochemistry and community composition in a changing climate. *Ecosystem*, 2:367-382.
- Holland E. A., Parton W. J., Detling J. K., Coppock D. L., (1992). Physiological responses of plant populations to herbivory and their consequences for ecosystem nutrient flow. *The American Naturalist*, 140:685-706.
- Holt J. A., (1997). Grazing pressure and soil carbon, microbial biomass and enzyme activities in semi-arid north eastern Australia. *Applied soil ecology*, 5:143-149.

- Horz H. P., Yimgam. T., Liesack W., (2001). Detection of Methanotroph Diversity on Roots of Submerged Rice Plants by Molecular Retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and Ribosomal DNA, including *pmoA* based Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Applied and Environmental microbiology*, 67 (9):4177-4185.
- Huang C. L., Sumpio B. E., (2008). Olive oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. *Journal of the American College of Surgeon*, 207 (3):407-416.
- Hui D., Jackson R. B., (2005). Geographic and interannual variability in biomass partitioning in grassland ecosystems: a synthesis of field data. *New Phytologist* 169:85-93.
- Hunt R., Cornelissen J. H. C., (1997). Components of relative growth rate and their interrelations in 59 temperate plant species. *New Phytologist*, 135:395-417.
- Inglese P., Famiani F., Servili M., (2009). I fattori di variabilità genetici, ambientali e culturali della composizione dell'olio di oliva. *Italus Hortus*, 16 (4):67-81.
- Inglese P., Famiani F., Servili M., Esposto S., Urbani S., (2011). Factors affecting extra-virgin olive oil composition. *Horticultural Reviews*, 38:83-147. Wiley-Blackwell.
- Insam H., Haselwandter K., (1989). Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia*, 79:174-178.
- Iovieno P., Alfani A., Rutigliano F., Virzo De Santo A., (1996). Inquinamento urbano. Morfologia delle ife fungine in relazione al contenuto di sostanza organica e di elementi in traccia nel suolo. S.It.E. Atti 17, 733-736.
- Issaoui M., Dabbou S., Brahmi F., Ben Hassine K., Ellouze M. H., Hammami M., (2009). Effect of extraction systems and cultivar on the quality of virgin olive oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:1713-1720.
- Jacinthe P. A., Lal R., (2007). Carbon Storage and Mine soil Properties in Relation to Topsoil Application Techniques. *Soil Science of America Journal*, 71:1788-1795.
- Jasper D. A., Robson A. D., Abbott L. K., (1979). Phosphorus and the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemistry*, 11(5): 501-505.
- Jenkinson D. S., Ladd J. N., (1981). Microbial biomass in soil: measurements and turnover. *Soil biochemistry* (Paul E. A. and Ladd J. N. eds) Inc. New York and Basel, pp. 415-471.
- Jiménez B., Sánchez-Ortiz A., Lorenzo M. L., Rivas A., (2013). Influence of fruit ripening on agronomic parameters, quality indices, sensory attributes and phenolic compounds of Picudo olive oils. *Food Research International*, 54:1860-1867.
- Johnson G. N., Young A. J., Scholes J. D., Horton P., (1993). The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant, Cell & Environment*, 16:673-679.

- Jones D. L., Hughes L. T., Murphy D. V., Healey J. R., (2008). Dissolved organic carbon and nitrogen dynamics in temperate coniferous forest plantations. *European Journal of soil science*, 59:1038-1048.
- Kahiluoto H., Ketoja E., Vestberg M., Saarela I., (2001). Promotion of AM utilization through reduced P fertilization 2. Field studies. *Plant and soil*, 231 (1):65-79.
- Kaiser K., Rumpel C., Eusterhues K., Kogel-Knaber I., Guggenberger G., (2002). Stabilization of organic matter by soil minerals investigations of density and particle size fractions from two acid forest soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165:451-459.
- Kaiser K., Zech W., (2000). Sorption of dissolved organic nitrogen by acid subsoil horizons and individual mineral phases. *European Journal of Soil Science*, 51:403-411.
- Karioti A., Chatzopoulou A., Bilia, A. R., Liakopoulos G., Stavrianakou S., Skaltsa H., (2006). Novel secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 8:1898-1903.
- Kazakou E., Violle C., Roumet C., Pintor C., Gimenez O., Garnier E., (2009). Litter quality and decomposability of species from a Mediterranean succession depend on leaf traits but not on nitrogen supply. *Annals of Botany*, 104:1151-1161.
- Keddy P. A., (1992). A pragmatic approach to Functional Ecology. *Functional Ecology*, 6 (6):621-626.
- Kieft T.L. (1994). Grazing and plant-canopy effects on semiarid soil microbial biomass and respiration. *Biology and Fertility of soils*, 18:155-162.
- Kiritsakis A., Markakis P., (1998). Olive oil: a review Advances. *Food Research*, 31:453-482.
- Kiritsakis A., (1991). *Olive Oil*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.
- Komarek, A. R., (1993). A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. *Journal of Dairy Science* (Suppl.1), 76:250.
- Krause G. H., Weis E., (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:313-349.
- Kuske C. R., Banton K. L., Adorada D. L., Stark P. C., Hill K. K., and Jackson P. J., (1998). Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (7):2463-2472.
- Landi L., Renella G., Nannipieri P., (2000). Indicatori chimici della qualità del suolo: il ruolo della sostanza organica. Rendiconti Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Memorie di Scienze Fisiche e Naturali 118°, vol. XXIV: 239-248.
- Latour X., Corberand T., Laguerre G., allard F., Lemanceau P., (1996). The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied Environmental Microbiology*, 61:1004-1012.

Lavee S., (1996). Biology and physiology of the olive. World olive encyclopaedia. Madrid: IOOC.

Lavorel S., Garnier E., (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology*, 16:545-556.

Lavorel S., McIntyre S., Landsberg J., Forbes T. D. A., (1997). Plant functional classification: from general groups to specific groups based on response to disturbance. *Trend in Ecology and Evolution*, 12:474-478.

Lehninger A. L., (1983). La biosintesi dei lipidi, in Principi di Biochimica, Zanichelli Editore, pp. 561-574.

Leone A.P., D'Andria R., Morelli G., Fragnito F., Purificato S., Volpe M. G., Nazzaro M., Buonduonno A., (2013). Peto-environmental determination of olive oil quality. A case study. *CIHEAM / IOC Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens*, 106:43-54.

Lloyd-Jones G., Hunter D. W. F., (2001). Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 33:2053-2059.

Lockeretz W., Shearer G., Khol D., (1981). Organic farming in the corn belt. *Science*, 211 (6): 540-547.

Lombardo N., Marone E., Alessandrino M., Giodino G., Madeo A., Fiorino P., (2008). Influence of growing season temperatures on the fatty acids (FAs) of triacylglycerols (TAGs) composition in Italian cultivars of *Olea europaea* advances. *Horticultural Science*, 22:49-53.

Loreto F., Centritto M., Chantzoulakis K., (2003). Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant, Cell and Environment*, 26:595-601.

Loussert R., Brousse G., (1978). L'olivier. GP Maison neuve et Larose. Mining Geostatics. Academic Press. London. Second International Seminar Biotechnology and Quality of Olive tree Products around the Mediterranean Basin. pp. 167-175.

Lynch J. M., Poole N. J., (1979). Microbial ecology: a conceptual approach. John Wiley, New York.

Magli M., Rotondi A., (1998). L'olio di oliva per i consumatori particolarmente attenti all'aspetto salutistico nutrizionale. *Olivo & olio*, 7:63-68.

Makedos I. D., (1995). Effect of fertilization and grazing intensity on the productivity of grasslands. *European Forest Institute*, 92:73-83.

Manrique T., Rapoport H. F., Castro J., Pastor M., (1999). Mesocarp cell division and expansion in the growth of olive fruits. *Acta Horticulturae*, 474:301-4.

Marschner B., Brodowski S., Dreves A., Gleixner G., Gude A., Grootes P.M., Hamer U., Heim A., Jandl G., Ji R., Kaiser K., Kalbitz K., Kramer C., Leinweber P., Rethemeyer J., Schaffer A., Schmidt M.W.I., Schwark L., Wiesenberger G.L.B., (2008). How relevant

recalcitrante for the stabilization of organic matter in soils? *Journal Plant Nutrition Soil Science*, 171:91-110.

Martinez J. M., Munoz E., Alba, J., Lanzon A., (1975). Report about the use of the “Abencor” analyser. *Grasas y Aceites*, 26:379–385.

Martinez R. A., (1984). Terreno adatto per la coltivazione dell’olivo. *Italian Journal of Agronomy*, pp. 26-29.

McCaig A. E., Grayston S. J., Prosser J. I., Glover L. A., (2001). Impact of cultivation on characterization of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 35:37-48.

McGill B. J., Enquist B. J., Weiher E., Westoby M., (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in ecology & evolution*, 21:178-184.

Mc Grath S., (1998). Soil Remediation: criteria and indicators of soil quality. Proceedings of the 16th World Congress of Soil Science, Montpellier.

Médail F., Quèzel P., (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84:112-127.

Meints V. W., Peterson G. A., (1977). The influence of cultivation on the distribution of nitrogen in soils of the Ustall suborder. *Soil science*, 124:334-342.

Meirinhos, J., Silva B., Valentão P., Seabra R. M., Pereira J. A., Dias A., (2005). Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19:189-195.

Melillo J. M., Aber J. D., Muratore J. F., (1982). The influence of substrate quality on leaf litter decay in a northern hardwood forest. *Ecology*, 62-63.

Méndez A. I., Falqué E., (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control*, 18:521-529.

Metodi Ufficiali di analisi chimica del suolo, (2000).

Metodo Ufficiale n° XIII.2 Supplemento Ordinario G.U. n°248 del 21.10.1999.

Milchunas D. G., Lauenroth W. K., (1993). Quantitative Effects of Grazing on Vegetation
Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L., Ghiorse W. C., (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (11):4715-4724.

Mincione B., Poiana M., Giuffrè A. M., Modafferi V., Giuffrè F., (1996). Ricerche sugli oli di oliva monovarietalì. Nota II Caratterizzazione dell’olio di Peranzana. *La rivista italiana delle sostanze grasse*, LXXIII: 245-257.

- Minguez-Mosquera M. I., Rejano-Navarro L., Gandul-Rojas B., Sàncnez-Gomez A. H., Garrido-Fernandez J., (1991). Color-Pigment Correlation in virgin olive oil. *JAOCS*, 68 (5):332-335.
- Mocali S., (2010). Metodi di analisi molecolare per lo studio dei microrganismi del suolo. Società Italiana della Scienza del Suolo- Commissioni III e IV. Edizioni Cantagalli.
- Modonesi C., Tamino G., (2009). Biodiversità e beni comuni. Editoriale Jaka Book. Fondazione diritti genetici.
- Montedoro G. F., Garofalo L., (1986). Caratteristiche qualitative degli oli vergini di oliva. Influenza di alcune variabili: varietà, ambiente, conservazione, estrazione, condizionamento del profilo finito. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, LXI, pp:3-11.
- Montedoro G. F., Servili M., Baldioli M., Miniati E., (1992). Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:1571-1576.
- Montedoro G. F., Servili M., Baldioli M., Miniati E., (1992). Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Initial Characterization of the Hydrolyzable Fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:1577-1580.
- Montedoro G. F., Servili M., Pannelli G., (2003). Le caratteristiche del prodotto e le relazioni con le variabili agronomiche, in *Olea-Trattato di Olivicultura*, Edizioni agricole, Bologna, pp. 263-289.
- Morrone L., Rotondi A., Magli M. (2012). Olivo a 360°: dalla valorizzazione della biodiversità ad un consapevole consumo dell'olio extravergine di oliva. Consiglio Nazionale delle Ricerche-Dipartimento delle Scienze Bio-Agroalimentari.
- Mousa Y. M., Gerasopoulos D., (1996). Effect of Altitude on Fruit and Oil Quality Characteristics of "Mastoides" Olives. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 71:345-350.
- Muggia P., Bonnländer B., Navarini L., (2006). Rassegna dei metodi per la misura del potere antiossidante. Review of the methods for the determination of antioxidant capacity. *Ingredienti alimentari*, (V):6-15.
- Myers N., Cowling R. M., (1999). Mediterranean Basin, R.A. Mittermeier, N. Meyers, P. Robles Gil and C.G. Mittermeier. Hotspots; Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions: *CEMEX Mexico*, pp. 254-267.
- Nannipieri P., (1993). *Ciclo della sostanza organica nel suolo*, Pàtron editore, Bologna.
- Nergiz C., Engez Y., (2000). Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chemistry*, 69:55-59.
- Nergiz C., Günç Ergönül P. (2009). Organic acid content and composition of the olive fruits during ripening and its relationship with oil and sugar. *Scientia Horticulturae*, 122:216-220.

- Nie S. A., Xu H. J., Li S., Su J. Q., (2014). Relationships between abundance of microbial functional genes and the status and fluxes of Carbon and Nitrogen in rice rhizosphere and bulk soils. *Pedosphere*, 24 (5):645-651.
- Niemi R. M., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K., (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR–DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 45 (3):155-165.
- Niinemets, (1999). Components of leaf dry mass per area-thickness and density-after leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytologist*, 144:35-47.
- Niinemets, (2001). Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density and thickness in trees and shrubs. *Ecology*, 82:453-469.
- O Wilson E., (1992). *The Diversity of life*, Hardcover.
- Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B., Korel F., (2009). Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, 113: 401-410.
- Odum E. P., (1969). The strategy of ecosystem development. *Science*, New Series, 164 (3877):262-270.
- Odum E. P., (1985). Trends expected in stressed ecosystems. *Bioscience*, 35:419-422.
- Odum H. T., (1973). Energy, Ecology and Economics. *Ambio* Vol 2 n.6.
- Oesterheld M., Loreti J., Semmartin M., Paruelo J. M., (1999). Grazing, fire, and climate effects on primary productivity of grasslands and savannas. *Ecosystems of disturbed ground* (Walker L., eds.). Oxford, UK, pp. 287-306.
- Olson F. C. W., (1950). Quantitative estimates of filamentous algae. *Transaction of the American Microscopy Society*, 69:272-279.
- Ordoñez J. C., van Bodegom P. M., Witte J. M., Wright I. J., Reich P. B., Aerts R., (2009). A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. *Global Ecology and Biogeography*, (*Global Ecol. Biogeogr.*), 18:137-149.
- Osman M., Metzidakis I., Gerasopoulos D., Kiritsakis A., (1994). Qualitative changes in olive oil collected from trees grown at two altitudes. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 71:187-190.
- Papaioannou A. G., Vranhakis M. S., Alifragis D. A., Papanastasis V. P., Ispikoudis I., Seilopoulos D. G., (2002). Impact of grazing on soil characteristics of the maquis vegetation zone of Northern Greece. *Geotechnical Scientific Issues*, 13:17-27.
- Papatheodorou E., (1996). Effect of grazing on the structure and dynamic of vegetation and on the dynamic of nutrients in evergreen hard-leaved ecosystems of Chortiatis. Aristotle University Thessaloniki.

- Papendick R. I., Parr J. F., (1992). Soil quality - the key to a sustainable agriculture. *American Journal Alteration Agriculture*, 7:2-3.
- Parker L. W., Doxtader K. G., (1983). Kinetics of microbial degradation of 2,4-D in soil: effects of temperature and moisture. *Journal of Environmental Quality*, 12 (4):553-558.
- Paula S., Pausas J. G., (2006). Leaf traits and respouting ability in the Mediterranean basin. *Functional Ecology*, 20 (6):941-947.
- Paz Aguilera M., Beltràn G., Ortega D., Fernandèz A., Jimènez A., Uceda M., (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89:387-391.
- Peri C., (1995). Qualità: concetti e metodi. Ed. Franco Angeli, Milano.
- Perry D.A., (1994). Forest Ecosystems. *Johns Hopkins University Press*, Baltimore, MD, p:649.
- Petchey O. L., Gaston K. J., (2006). Functional diversity (FD), species richness and community composition. *Ecological Letters*, 5:847-857.
- Pignatti S., (1982). *Flora d'Italia*, Edagricole, Bologna.
- Pignatti S., (1995). *I boschi d' Italia: sinecologia e biodiversità*. UTET, Torino.
- Piotto B., Piccini C., Arcadu P., (2001). *La ripresa della vegetazione dopo gli incendi nella regione mediterranea*. Propagazione per semi di alberi e arbusti della flora mediterranea-ANPA.
- Poorter H., Evans J. R., (1998). Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*, 116 (1-2):26-37.
- Poorter L., Bongers F., (2006). Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecology*, 87:1733-1743.
- Porteous L. A., Seidler R. J., Watrud L. S., (1997). An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology*, 6 (8):787-791.
- Powlson D. S., (1994). The soil microbial biomass: Before, beyond and back. *Beyond the biomass* (Ritz K., Dighton J., Giller K. E. eds). John Wiley & Sons, Chichester, pp. 3-20.
- Prévot, P., Buchmann B., (1960). Foliar diagnosis of irrigated olive trees. Evolution of concentrations in the course of the year. *Fertilite*, pp. 3-11.
- Proietti P., Famiani F., Tombesi A., (1999). Gas exchange in olive fruit. *Photosynthetica*, 36:423-32.
- Provini A., Galassi S., Marchetti R., (1998). *Ecologia Applicata*. Nuova Edizione. Società Italiana di Ecologia. Città Studi Edizioni.

Pugliano G., (2002). La risorsa genetica dell'olivo in Campania. A cura della Regione Campania.

Quèzel P., (1995). *La flore du bassin méditerranéen: origine, mise en place, endémisme. Ecologia Mediterranea*, 21:19-39.

Quèzel P., (1998). *Caracterisation des forêts méditerranéennes*. (Empresa de Gestion Medioambiental S.A. Consejería de Medio Ambiente Junta de Andalucía, ed.). *Conferencia International sobre la conservacion y el uso sostenible del monte mediterráneo*. 28-31 Octubre 1998, Màlaga, pp. 19-31.

Ramsay A. J., Standard R. E., Churchman O. J., (1986). Effect of conversion from ryegrass pasture to wheat cropping on aggregation and bacterial population in a silt loam soil in New Zealand. *Australian Journal of Soil Research*, 24:253-264.

Ranalli A., De Mattia G., Ferrante M. L., Giansante L., (1997). Incidence of olive cultivation area on the analytical characteristics of the oil. Note 1. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 73:501-508.

Rastogi G., Ranade D. R., Yeole T. Y., Gupta A. K., Patole M. S., Shouche Y. S., (2009). Novel methanotroph diversity evidenced by molecular characterization of particulate methane mono oxygenase A A (*pmoA*) genes in a biogas reactor. *Microbiological Research*, 164:536-544.

Recalde L., Esteban E., (1966). Diagnosis of mineral deficiencies in olive tree crops by leaf analysis. I Colloque Europeen sur le controle de la Nutrition minerale et de la fertilization. Montpellier.

Reece R. J., (2006). *Analisi dei geni e dei genomi* Ed. Edises.

Regolamento (CE) n. 1989/03 della Commissione del 6 Novembre 2003 che modifica il regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. Gazzetta Ufficiale Comunità Europea n. L 295/57 del 13 Novembre 2003.

Reich P. B., Ellsworth D. S., Walters M. B., Vose J. M., Gresham C., Volin J. C., Bowman W. D., (1999). Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology*, 80 (6):1955-1969.

Reich P. B., Walters M. B., Ellsworth D. S., (1992). Leaf lifespan in relation to leaf, plant, and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecological Monographs*, 62:365-392.

Reich P. B., Walters M. B., Ellsworth D. S., (1997). From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences-Usa*, 94: 13730-13734.

Reicosky D. C., Forcella F., (1998). Cover crop and soil quality interactions in agroecosystem. *Journal Soil Water Conservation*, 53:224-229.

Rethemeyer J., Kramer C., Gleixner G., John B., Yamashita T., Flessa T. H., Andersen N., Nadeau M. J., Grootes P. M., (2005). Transformation of organic matter in agricultural soils: radiocarbon concentration versus soil depth. *Geoderma*, 128:94-105.

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*, 83:912-919.

Ricci G., (2008). Indagine sull'impatto ambientale ed economico degli ungulati selvatici nell'Appennino bolognese, Aster, Editore da Fondazione Itaca Onlus, 2008, p.174.

Ridolfi M., Terenziani S., Patumi M., Fontanazza G., (2002). Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:835-839.

Riley F.R. (2002). Olive oil production on bronze Age crete: nutritional properties, processing methods, and storage life of Minoan olive oil. *Oxford Journal of Archaeology*, 21: 63-75.

Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T. M., Simonet P., (2003). Extraction of DNA from soil. *European Journal of soil Biology*, 39:183-190.

Rodale Institute, (1991). Conference report and abstract, international Conference on the assessment and monitoring of soil quality. Emmaus, Pennsylvania, 11-13 July 1991.

Rodríguez G., Lama A., Rodríguez R., Jiménez A., Guillén R., Fernández-Bolanós J., (2008). Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, 99:5261-5269.

Roose-Amsaleg C. L., Garnier-Sillam E., Harry M., (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18 (1):47-60.

Rotondi A., Alfei B., Magli M., Panelli G., (2010). Influence of genetic matrix and crop year on chemical and sensory profiles of Italian monovarietal extra-virgin olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 2641-2648.

Rovira A. D., (1965). Effect of *Azotobacter*, *Bacillus* and *Clostridium* on the growth of wheat. *Folia Microbiologica Prague*, 11:193-200.

Rumpel C., Eusterhues K., Kogel- Knaber I., (2004). Location and chemical composition of stabilized organic carbon in topsoil and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:177-190.

Rumpel C., Knaber K. I. and Bruhn F., (2002). Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Organic Geochemistry*, 33:1131-1142.

Rutigliano F. A., D'Ascoli R., De Marco A., Virzo De Santo A., (2002). Soil microbial community as influenced by experimental fires of different intensities. *Fire and Biological*

Processes (Trabaud L., Prodon R., eds.). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 137-150.

Rutigliano F. A., D'Ascoli R., Virzo De Santo A., (2004). Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. *Soil Biology and Biochemistry*, 36 (11): 1719-1729.

Ryana D., Antolovicha M., Prenzlara P., Robardsa K., Lavee S., (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 2:147-176.

Sabatè S., Sala A., Gracia C. A., (1995). Nutrient content in *Quercus ilex* canopies - Seasonal and spatial variation within a catchment. *Plant and Soil*, 168:297-304.

Sacchi R., Della Medaglia A. D., Ambrosino M. L., Paduano A., Spagna Musso S., (2001). Linee Guida per la Qualità dell'Olio Vergine di Oliva. Terza edizione finanziata dall'Unione Europea (Reg. CE 528/99), aprile 2001.

Saitta M., Salvo F., Di Bella G., Dugo G., La Torre G. L., (2009). Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 112:525-532.

Sakouhi F., Herchi W., Sebei K., Absalon C., Kallel H., Boukhchina S., (2011). Accumulation of total lipids, fatty acids and triacylglycerols in developing fruits of *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 132:7-11.

Sánchez J, Harwood J. L., (2002). Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104:564-73.

Sánchez J., (1994). Lipid photosynthesis in olive fruit. *Progress in Lipid Research*, 33:97-104.

Sánchez J., (1995). Olive oil biogenesis. Contribution of fruit photosynthesis. *Plant lipid metabolism* (Kader J-C, Mazliak P., eds. Dordrecht Kluwer Academic Publications), p. 564-6.

Sanesi G., (2000). Elementi di pedologia. I suoli, loro proprietà, gestione e relazioni con l'ambiente. Calderini ed. agricole.

Savarese M., De Marco E., Sacchi R., (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105:761-770.

Schönfelder I., Schönfelder P., (1996). *La flora mediterranea*. De Agostini, Novara.

Schreiber U., Endo T., Mi H., Asada K., (1995). Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology*, 36:873-882.

Scognamiglio M., D'Abrosca B., Pacifico S., Fiumano V., De Luca P. F., Monaco P., Fiorentino A., (2012). Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). *Food Research International*, 46:294-303.

- Sefton C. A., Montagu K. D., Atwell B. J., (2002). Anatomical variation in juvenile eucalypt leaves accounts for differences in specific leaf area and CO₂ assimilation rates. *Australian Journal of Botany*, 50 (3):301-310.
- Sequi P., Benedetti A., Dell'Abate M. T., (2003). ATLAS- atlante di Indicatori della Qualità del Suolo, Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali. Osservatorio Nazionale Pedologico.
- Shipley B., (2002). Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Functional Ecology*, 16 (5):682-689.
- Shipley B., Lechowicz M. J., 2000. The functional co-ordination of leaf morphology, nitrogen concentration, and gas exchange in 40 wetland species. *Ecoscience*, 7 (2):183-194.
- Shoenholtz S. H., Van Miegroet H., Burger J. A., (2000). A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management*, 138:335-356.
- Silva S., Gomes L., Leitão F., Coelho A. V., Vilas Boas L., (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12:385-395.
- Singer F. J., Swank W.T., Clebsh E. E. C., (1984). Effects of wild pig rooting in a deciduous forest. *Journal Wildlife Management*, 48:464-473.
- Singh R. S., Srivastava S. C., Raghubanshi A. S., Singh J. S., Singh S.P., (1991). Microbial C, N and P in dry tropical savanna: effects of burning and grazing. *Journal of Applied Ecology*, 28:869-878.
- Singleton V. L., Rossi J. A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology viticulture*, 16:144-158.
- Smith O. H., Petersen G. W., Needelman B. A., (2000). Environmental indicators of agroecosystems. *Advances in Agronomy*, vol. 69: 75-97.
- Smith T., Smith R., (2009). Elementi di ecologia, 6th edizione. Pearson Education Inc. Benjamin Cummings.
- Söderström, (1979). Seasonal fluctuations of active fungal biomass in horizons of a podzolized pine-forest soil in central Sweden. *Soil Biology and Biochemistry*, 11(2):149-154.
- Sojka R. E., Upchurch D.R., (1999). Reservations regarding the soil quality concept. *Soil Science Society of America Journal*, 63:1039-1054.
- Southwood R. E., Way M. J., (1970). Ecological background to pest management. *Concepts of Pest Management* (Rabb, R.C., Guthrie, F.E., Eds.). North Carolina State University, Raleigh, NC, pp. 6-29.

- Sparling G. P., (1997). Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. *Biological Indicators of Soil Health* (eds C. E. Pankhurst B. M. Double V. V. S. R. Gupta) pp. 97-119.
- Stahl P., Parkin B. T., Christensen M., (1999). Fungal presence in paired cultivated and uncultivated soils in central IOWA, USA. *Biology and Fertility of Soils*, 29:92-97.
- Stark S., Grellmann D., (2002). Soil microbial responses to herbivory in an arctic tundra heath at two levels of nutrient availability. *Ecology*, 83:2736-2744.
- Su Y., Zhang X., Xia F. F., Zhang Q. Q., Kong J. Y., Wang J., He R., (2014). Diversity and activity of methanotrophs in landfill cover soils with and without landfill gas recovery systems. *Systematic and Applied Microbiology*, 37:200-207.
- Swift M. J., Anderson J. M., (1993). Biodiversity and ecosystem function in agroecosystems. *Biodiversity and Ecosystem Function* (Schultze, E., Mooney, H.A., Eds.). Springer, New York, pp. 57-83.
- Swinnen J., (1994). Rhizodeposition and turnover of root-derived organic material in barley and wheat under conventional and integrated management. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 51:99-113.
- Taboada M. A., Lavado R. S., (1988). Grazing effects on the bulk density in a NATraquoll of the flooding Pampa of Argentina. *Journal Range Manage*, 41:500-503.
- Tebbe C. C., Vahjen W., (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (8):2657-2665.
- Terashima I., Hikosaka K., (1995). Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 18:1111-1128.
- Tilman D., Downing J. A., (1994). Biodiversity and stability in grasslands. *Nature* 367:363-365.
- Tittarelli F., Neri U., Poletti P., Lacertosa G., Raus R., (2002). Monitoraggio dello stato nutrizionale dell'olivo. *L'informatore Agrario* 44/2002, 39-51.
- Toledo A., Burlingame B., (2006). Biodiversity and nutrition: a common path toward global food security and sustainable development. *Journal of food composition and analysis*, 19:477-483.
- Tracy B. F., Frank D. A., (1998). Herbivore influence on soil microbial biomass and nitrogen mineralization in a northern grassland ecosystem: Yellowstone National Park. *Ecologia*, 114:556-562.
- Trincherà A., Pinzari F., Benedetti A., (1998 a). Valutazione dell'impatto del pascolamento di cinghiali (*Sus scrofa* L.) sulla fertilità del suolo in area mediterranea. Atti del Convegno Annuale della Società Italiana della Scienza del Suolo, Roma, 2-5 Giugno 1997, 295-303.

- Trincher a., Pinzari F., Benedetti A., Sequi P., (1999). Use of biochemical indexes and changes in organic matter dynamics in a Mediterranean environment: a comparison between soils under arable and set-aside management. *Organic Geochemistry*, 30:453-459.
- Troumbis A. Y., Dimitrakopoulos P. G., Siamantziouras A. S., Memtas D., (2000). Hidden diversity and productivity patterns in mixed Mediterranean grasslands. *Oikos*, 90:549-559.
- Tura D., Failla O., Bassi D., Pedò S., Serraiocco A., (2009). Environmental and seasonal influence on virgin olive (*Olea europaea* L.) oil volatiles in northern Italy. *Scientia Horticulturae*, 122:385-392.
- Tura D., Gigliotti C., Pedò S., Failla O., Bassi D., Serraiocco A., (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea* L.) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*, 112:108-119.
- Turner R., Etienne N., Alonso M. G., de Pascual-Teresa S., Miniñane, A. M., Weinberg, P. D., (2005). Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 75:61-70.
- Ünal K., Nergiz C., (2003). The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas y Aceites*, 54(1):71-76.
- USDA, 1951. *Soil survey manual*. USDA Handbook No.18. U.S. Gov. Print Office. WASHINGTON, D.C.
- Van Elsas J. D., Wolters A. C., (1995). Polymerase chain reaction (PCR) analysis of soil microbial DNA. *Molecular Microbial Ecology Manual* ed. Akkermans, A.D.L., 2:1-10. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Van Hees P. A. W., Vinogradoff S. I., Edwards A. C., Godbold D. L. and Jones D. L., (2003). Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: effects on soil solution concentrations and biodegradation rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 35:1025-1026.
- Vandermeer J., Perfecto I., (1995). Breakfast of biodiversity: the truth about rainforest destruction. *Food First Books*, Oakland, 185.
- Vile D., Garner E., Shipley B., Laurent G., Navas M. L., Roumet C., Lavorel S., Diaz S., Hodgson J. G., Lloret F., Midgley G. F., Poorter H., Rutherford M. C., Wilson P. J., Wright I. J., (2005). Specific Leaf Area and Dry Matter Content Estimate Thickness in Laminar Leaves. *Annals of Botany*, 96:1129-1136.
- Vinha A. F., Ferreres F., Silva B. M., Valentão P., Goncalves A., Pereira J. A., Oliveira M. B., Seabra R. M., Andrade P.B., (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89:561-568.
- Violle C., Navas M. L., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I., Garnier E., (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*, 116:882-892.

- Visioli F., Galli C., (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Science*, 55:1965-1971.
- Wallander E, Albert V. A., (2000). Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. *American Journal of Botany*, 12:1827-41.
- Wang C., Long R., (2008). Changes in soil organic carbon and microbial biomass carbon at different degradation successional stages of alpine meadows in the headwater region of three rivers in China. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 14:225-230.
- Wang J., Wang W., Gu J. D., (2014). Community structure and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria after conversion from soybean to rice paddy in albic soils of Northeast China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:2765-2778.
- Wardle D. A., Giller K. E., (1996). The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. *Soil Biology Biochemistry*, 28:1549-1554.
- Watanabe T., Hosen Y., Agbisit R., Llorca L., Katayanagi N., Asakawa S., Kimura M., (2013). Changes in community structure of methanogenic archaea brought about by water-saving practice in paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 58:235-243.
- Weihner E., van der Werf A., Thompson K., Roderick M., Garnier E., Eriksson O., (1999). Challenging Theophrastus: a common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science*, 10 (5):609-620.
- Westoby M., Falster D. S., Moles A. T., Vesk P. A., Wright I. J., (2002). Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33:125-159.
- Wirhner S., Schütz M., Page-Dumroese D. S., Busse M. D., Kirchner J. W., Risch A. C., (2012). Do changes in soil properties after rooting by wild boars (*Sus scrofa*) affect understory vegetation in Swiss hardwood forests? *Canadian Journal For Research*, 42:585-592.
- Wright I. J., Cannon K., (2001). Relationship between leaf life span and structural defences in a low nutrient, sclerophyll flora. *Functional Ecology*, 15:351-359.
- Wright I. J., Westoby M., (2002). Leaves at low versus high rainfall: coordination of structure, lifespan and physiology. *New Phytologist*, 155:403-416.
- Wright I. J., Westoby M., Reich P. B., (2002). Convergence towards higher leaf mass per area in dry and nutrient poor habitats has different consequences for leaf life span. *Journal of Ecology*, 90:534-543.
- Xie Y., Witting R., (2004). The impact of grazing intensity on soil characteristics of *Stipa grandis* and *Stipa bungeana* steppe in northern China. *Acta Oecologica*, 25:197-204.
- Xie B., Wang X. R., Ding Z. H., Yang Y. P., (2003). Critical impact assessment of organic agriculture. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 16 (3):297-311.

Yeats G., Darrah P. R., (1991). Microbial changes in a model rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 23:963-971.

Yong-Zhong S., Yu-Lin L., Jian-Yuan C., Wen-Zhi Z., (2005). Influences of continuous grazing and livestock exclusion on soil properties in a degraded sandy grassland, Inner Mongolia, northern China. *Catena*, 59:267-278.

Zamora R., Alaiz M. e Hidalgo F.J., (2001). Influence of Cultivar and Fruit Ripening on Olive (*Olea europaea*)-Fruit Protein Content, Composition, and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4267-4270.

Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2):316-322.

Zornoza R., Mataix-Solera J., Guerrero C, Arcenegui V., Mataix-Beneyto J., Gómez I., (2008). Validating the effectiveness and sensitivity of two soil quality indices based on natural forest soils under Mediterranean conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 2079-2087.