









# L'Agrobiodiversità pugliese: una risorsa da tutelare

**Prof.ssa Cinzia Montemurro** 

cinzia.montemurro@uniba.it

www.fruttiantichipuglia.it



### 1. L'agrobiodiversità olivicola

- Overview delle attività
- Principali obbiettivi
- Metodologia
- \* Risultati

#### 2. La caratterizzazione molecolare

- Metodologia
- \* Risultati

## **COS'È LA BIODIVERSITÀ?**

La diversità biologica o BIODIVERSITA' è la varietà degli organismi del pianeta.

Questa varietà include:

- a) la diversità del loro aspetto morfologico,
- b) la loro diversità genetica
- c) le differenti aggregazioni o comunità che gli organismi possono comporre.



## **COS'È LA BIODIVERSITÀ?**

#### Dove troviamo la massima biodiversità?

Il 70% delle specie di tutto il mondo si trova in solo 12 stati Presso l'Hindu Kush-Himalaya sono presenti circa 25.000 specie (10%).

Le regioni tropicali supportano 2/3 delle 250.000 specie di piante stimate.

La maggiore biodiversità registrata ad oggi è 1200 specie in 52 ha di territorio nel Lambir Hills National Park, Sarawak (Malaysian Borneo)

Source: World Resources Institute, Earth Trends (Ref 5) \* A vascular plant is one whose tissues conduct fluids



Vascular plant species*							
Country	Number						
Australia	15,638						
Brazil	56,215						
China	8,200						
Colombia	32,200						
Congo, Democratic Republic	11,007						
Costa Rica	12,119						
Ecuador	19,362						
India	18,664						
Indonesia	29,375						
Madagascar	9,505						
Mexico	26,071						
Peru	17,144						

Source: World Resources
Institute, Earth Trends (Ref 5)

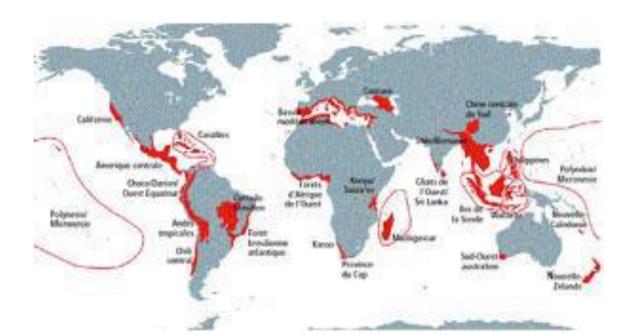
\* A presculptantale is pone whose

#### **COS'È LA BIODIVERSITÀ?**

#### COSA SONO GLI HOTSPOT DELLA BIODIVERSITÀ?

Un hotspot della biodiversità è una zona ricca di specie sulla quale incombe una seria minaccia alla sua esistenza Concetto sviluppato da Norman Myers dell'Università di Oxford (UK) per individuare delle aree prioritarie di conservazione.

# I "punti caldi" della biodiversità non sono solo in aree tropicali



#### L'IMPORTANZA DELLA BIODIVERSITA'

Il germoplasma è conservato per tutelare la biodiversità e combattere l'erosione genetica, ma anche per utilizzarlo in programmi di ricerca che hanno contribuito notevolmente allo sviluppo dell'agricoltura moderna, della medicina e delle biotecnologie.

Nel 1953 un frumento selvatico della Turchia (*Triticum turgidum ssp. dicoccoides* Korn) fornì i geni per superare la ruggine fogliare che distrusse oltre un terzo dei campi di frumento nello stato del Montana.

Negli anni'70 la ruggine del caffè che si diffuse in America latina, minacciando seriamente le già precarie economie di quei Paesi fu ostacolata dai geni di resistenza individuati in una varietà di caffè dell'Etiopia, denominata Geisha.

Nel 1970 un'altra malattia, l'elmintosporiosi, si diffuse nel "corn belt" americano, alla velocità di oltre 150 Km al giorno, distruggendo oltre un sesto della produzione maidicola degli USA e la metà di quella degli stati del Sud; i geni che determinano la resistenza furono reperiti in una specie ancestrale del mais, *Zea diploperennis* L..



#### PRINCIPALI MINACCE ALLA BIODIVERSITÀ VEGETALE

- Aumento della popolazione umana
- Aumento dell'estensione dei suoli agricoli
- Cambiamento d'uso dei suoli
- Incremento della CO2
- Produzione di specie reattive dell'azoto
- Agricoltura
- Cambiamenti climatici e riscaldamento globale

#### PREDICTIVE MODELS OF CLIMATE WARMING ON ALPINE PLANT SPECIES

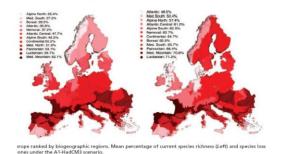
Climate change threats to plant diversity in Europe

variantes imanes "", samira carocter", neigues a. Acapo, ", neigues a. Special Calcular ("Textes of Chapter Calcular Cal

Edited by Harold A. Mooney, Stanford University, Stanford, CA. and approved April 26, 2005 (received for review December 31, 2004)

Immagine centrale: anno 2080 previsione di estinzione.

Prealpi italiane e Appennino: circa 60% estinte e sostituite da altre entita`



1.0 Relative effect of drivers 0.8 0.6 0.2 Land-use Change Change Biolice & Hange Circle asing 2

The main factors, or 'drivers', affecting biodiversity

Thuiller, 2007 – Nature

#### **COSA FARE?**

- Ricercare la biodiversità vegetale
- Conservare il germoplasma vegetale
- Caratterizzare il germoplasma vegetale

#### LE REGIONI BIOGEOGRAFICHE

Comunità Europea → sei Regioni Biogeografiche

Per ognuna delle sei regioni biogeografiche la Commissione Europea ha redatto elenchi di SIC

Italia suddivisa in tre regioni biogeografiche: Alpina, Continentale e Mediterranea.



#### **COSA FARE?**

- Ricercare la biodiversità vegetale
- Conservare il germoplasma vegetale
- Caratterizzare il germoplasma vegetale





#### Conservazione in situ

La conservazione può essere praticata in situ, quando è possibile conservare il germoplasma nel suo habitat naturale, non solo nel suo habitat originario ma anche in giardini e campi sperimentali, o altre strutture realizzate appositamente dall'uomo che riproducano l'habitat di partenza della specie.

#### Conservazione ex situ

La conservazione *ex situ* si riferisce sia a collezioni di germoplasma vivente site in luoghi e con habitat diversi da quelli d'origine, sia a raccolte di semi e colture in vitro di tessuti che a collezioni di polline, tessuti meristematici, embrioni e semi crioconservati.

#### **COSA FARE?**

- Ricercare la biodiversità vegetale
- Conservare il germoplasma vegetale
- Caratterizzare il germoplasma vegetale



#### LA BIODIVERSITA' MOLECOLARE

L'individualità di ogni organismo vivente è racchiusa nel suo patrimonio genetico, costituito dal DNA.

In particolare, l'informazione genetica specifica di ogni organismo è costituita dalla sequenza delle 4 basi azotate (A, C, G, T).

La sequenza delle basi nel genoma è quasi identica nell'ambito della stessa specie (>95%). Le piccole differenze intra-specifiche sono quelle che consentono di differenziare un individuo dall'altro.







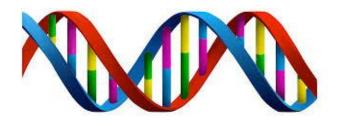




#### ...Perché il DNA????

Molecola stabile e non modificabile; resistente alle alte temperature, alle trasformazioni industriali, presente in tutte le cellule.

Analizzabile con metodi automatici, non influenzata dall'ambiente, analisi altamente riproducibili.





Overview delle attività

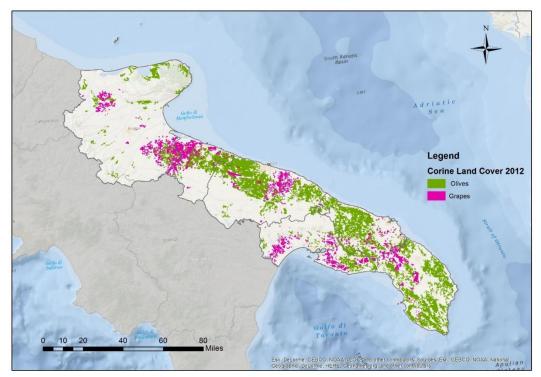








Overview delle attività







Colture di olivo in Italia: 1,077,477 Ha

Olivo in Puglia: 373,284 (Ha)

www.istat.it





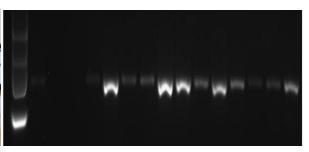
Overview delle attività

Il progetto **REGEROP**: «Recupero del germoplasma olivicolo pugliese», segue un approccio multidisciplinare attraverso I coordinamento di **otto** differenti attività

- 1. Indagini storiche e bibliografiche
- 2. Ricerca del germoplasma
- 3. Conservazione Ex situ
- 4. Caratterizzazione morfologica, tecnologica e genetica
- 5. Indagine dello stato sanitario delle piante recuperate
- Costituzione del Data-base
- 7. Schede elaiografiche
- 8. Conservazione In situ









Principali obiettivi

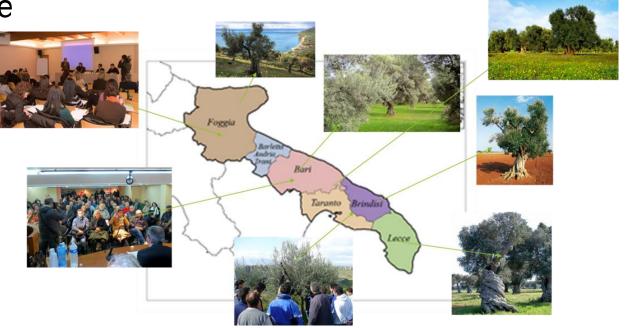
ATTIVITA	INDICATOR E	DESCRIZIONE	OBIETTIV O
01	Risultato	No. di documenti	300
02	Risultato	No. di piante geotaggate	500
03	Impatto	Incremento del germoplasma di olivo pugliese	10 (Ha)
04	Risultato	No. di genotipi caratterizzati	100
05	Risultato	No. di fonti primarie	40
06	Impatto	Rilascio del Database	1
07	Risultato	No. di schede elaiografiche	100
08	Risultato	No. di collezioni private e pubbliche	5



Metodologia

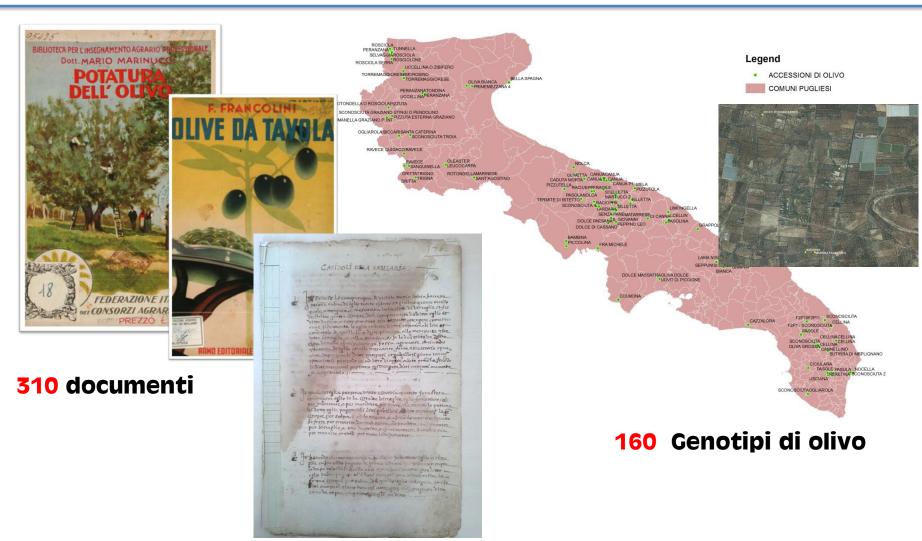
La metodologia seguita nel progetto **REGEROP** mette insieme differenti tecniche e competenze messe a disposizione da soggetti diversi:

- 3 Centri di Ricerca
- 5 Organizzazioni professionali
- 4 Compagnie private
- 4 Aziende
- 2 Comuni





Risultati



Il libro Rosso «La sanzaria» 1582-1583 bc



#### Risultati



OLIVA PIZZUTA (MONOPOLI)



LEUCOCARPA(FOGGIA)



PRIMA MEZZANA (S. GIOVANNI ROTONDO)



OLIVA SANNICANDRESE (CASSANO)







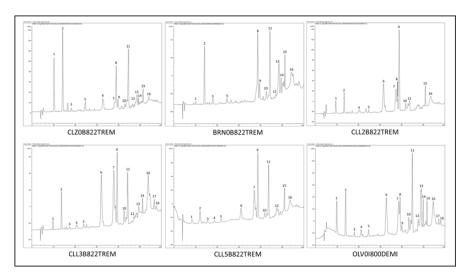


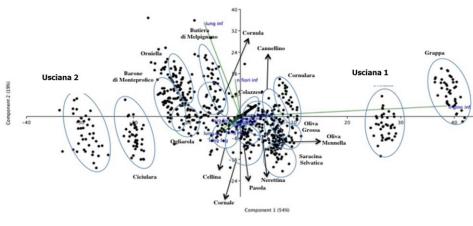


Più di 12 ettari coltivati con germoplasma autoctono di olivo



#### Risultati







#### Colozzese

DCA3	DCA13	DCA15	DCA17	DCA18	GAPU71B	GAPU101	EMO90	EMOL
237	128	242	140	170	120	184	186	200
242	128	242	140	170	120	200	192	200



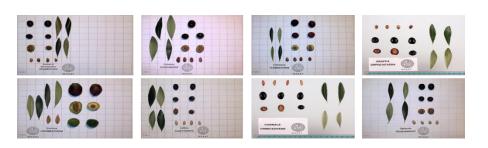
#### Ornella

DCA3	DCA5	DCA13	DCA15	DCA17	DCA18	GAPU71B	GAPU101	EM090
238	204	120	253	110	156	124	184	186
254	208	120	253	110	156	138	184	186



#### Cornola

DCA3	DCA5	DCA9	DCA13	DCA15	DCA17	DCA18	GAPU71B	GAPU101	EM090	EMOL
238	202	162	116	242	113	170	120	184	186	200
244	206	182	127	242	140	170	126	192	192	200



Caratterizzazione genetica, morfologica e tecnologica di 160 genotipi di olivo



Risultati









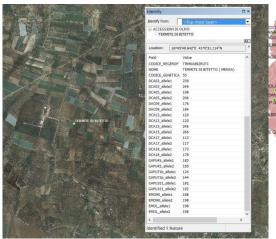
83 nuovi genotipi risanati



**59** nuove fonti primarie

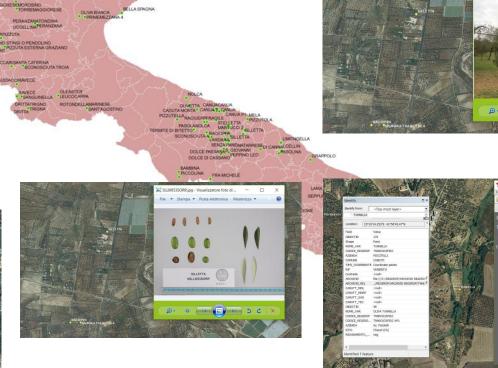


#### Risultati





13.3



1 database con geotag, foto, e caratterizzazione di ogni genotipo



## Risultati















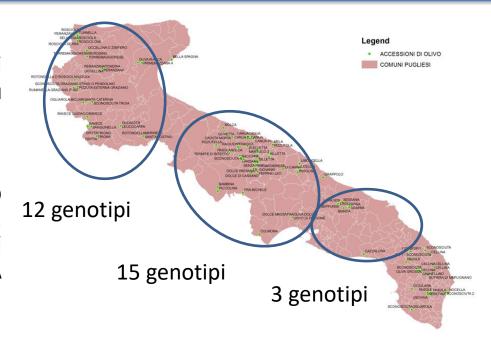
8 nuove collezioni di germoplasma di olivo



# La caratterizzazione molecolare metodologia

Sono stati selezionati 30 alberi di olivo collezionati in aziende private a rischio di erosione genetica.

Confronto con 26 varietà di olivo certificate diffuse in Italia e in Puglia, disponibili presso il campo di premoltiplicazione di olivo del CRSFA a Palagiano (TA).

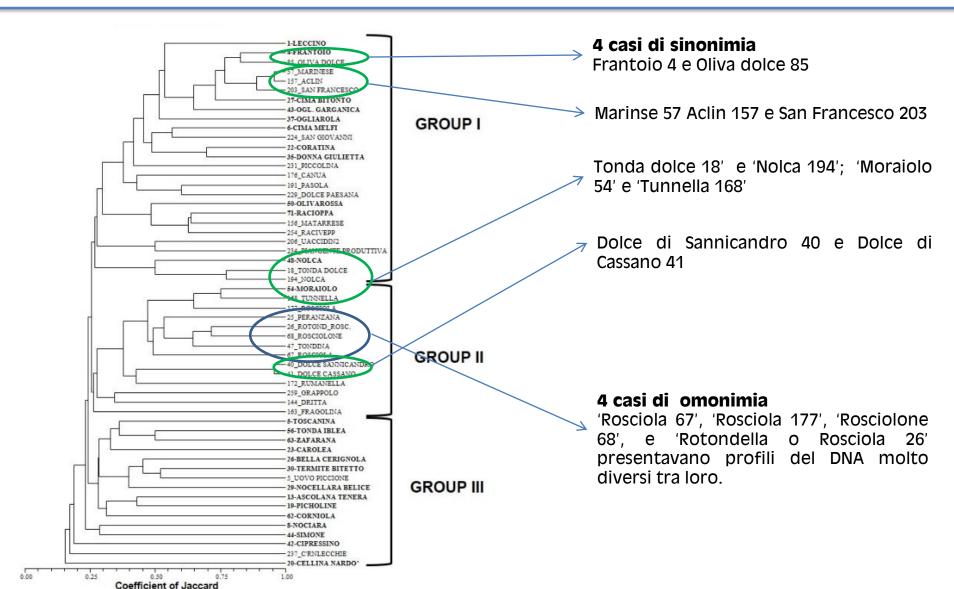


12 marcatori del DNA sono stati analizzati: DCA3, DCA5, DCA9, DCA13, DCA15, DCA17, DCA18, (Sefc et al., 2000), EMO-90, EMO-1 (De La Rosa et al., 2002), GAPLI/15

EMO-90, EMO-L (De La Rosa et al., 2002), GAPU45, GAPU71B, GAPU101, (Carriero et al., 2002).

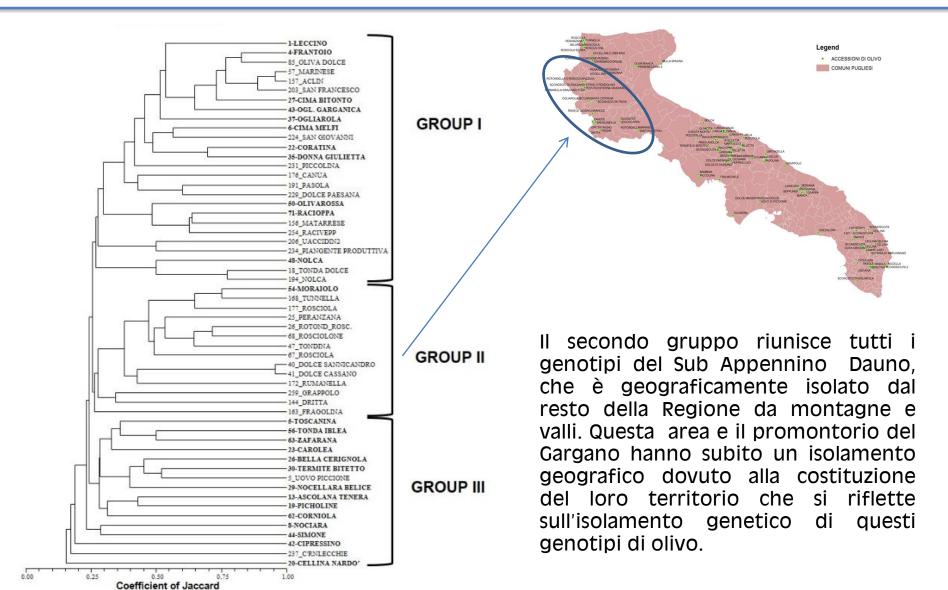


#### La caratterizzazione molecolare Risultati

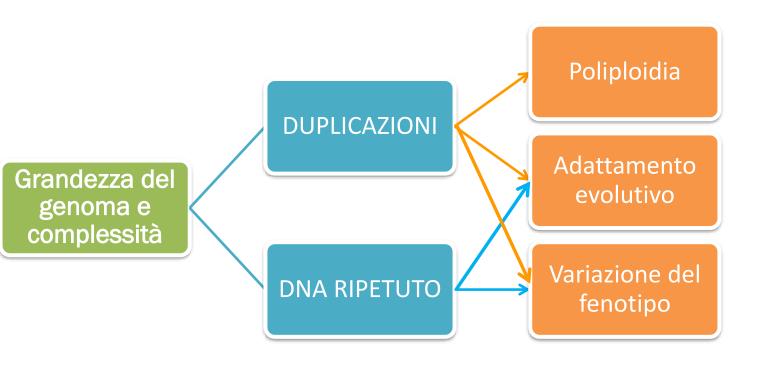




#### La caratterizzazione molecolare Risultati



# Il genoma delle piante coltivate:



#### Il Next Generation Sequencing (NGS) per lo studio della Biodiversità

La rivoluzione NGS rende oggi possibile intraprendere analisi genomiche su una dimensione di scala fino a poco tempo fa inimmaginabile. Gli strumenti (next-generation sequencing) consentono di determinare la sequenza del DNA con elevatissima efficienza e costi estremamente contenuti.



VS



Sequenziamento Sanger: Marcatori SSR Basso numero di sequenze



**NGS Illumina** 



Sequenziamento Sanger

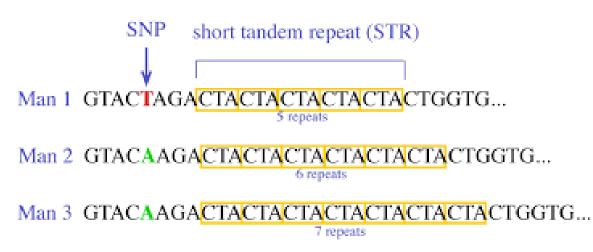


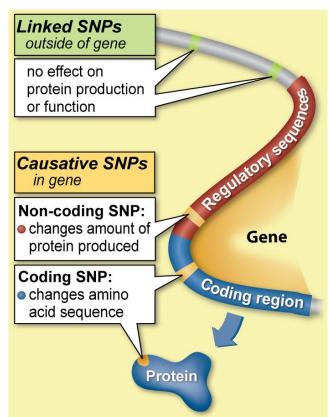
VS

NGS Illumina Marcatori SNP Sequenziamento del genoma GBS



# I marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphism) generati con i sequenziatori NGS









#### A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species

Robert J. Elshire<sup>1</sup>, Jeffrey C. Glaubitz<sup>1</sup>, Qi Sun<sup>2</sup>, Jesse A. Poland<sup>3</sup>, Ken Kawamoto<sup>1</sup>, Edward S. Buckler<sup>1,4</sup>, Sharon E. Mitchell<sup>1</sup>\*



# Riduzione della complessità genomica mediante l'uso degli enzimi di restrizione

#### Pro:



- √ economicità
- ✓ Elevato numero di SNP sul genoma
- ✓ Piattaforme di sequenziamento NGS in multiplex
- ✓ Barcoding del singolo campione
- ✓ Non richiede conoscenze preliminari genoma

#### Schema di lavoro dell'analisi GBS

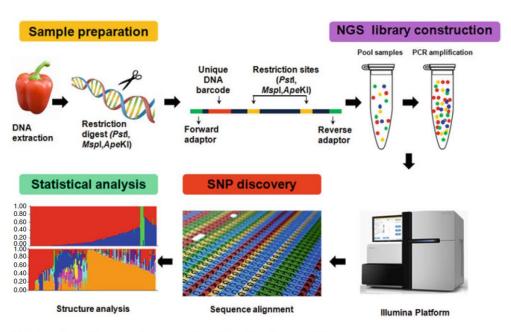


Fig. 1 Schematic steps of a genotyping by sequencing experiment



cv. Farga



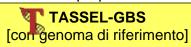


#### Schema di lavoro dell'analisi GBS in Olivo



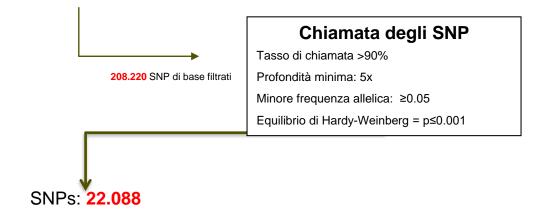
94 varietà italiane campionate presso il CREA OFA di Mirto Crosia (CS)





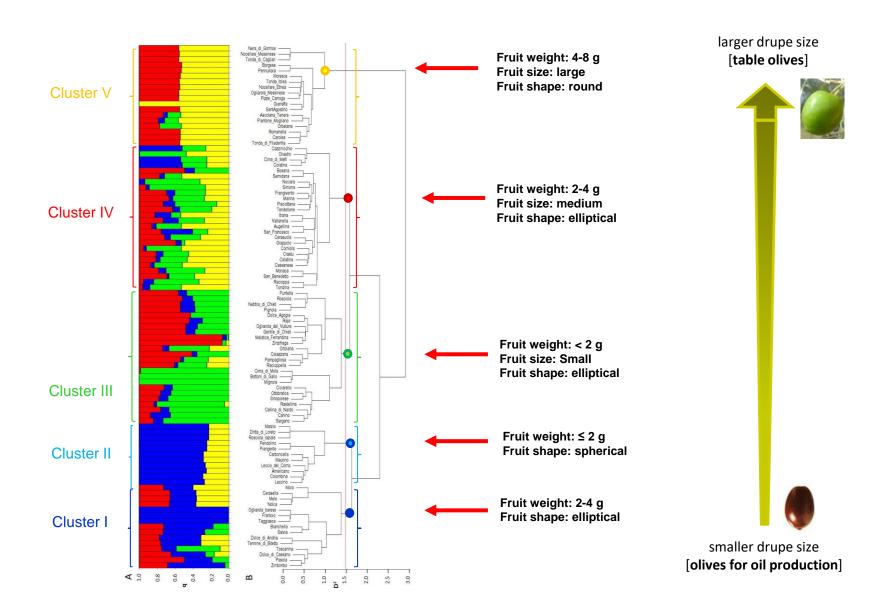
~ 247 M reads – media di 2.6 M reads per campione 1.4 M Tags dopo il merging

- 54 % allineato ad una posizione unica
- 16 % allineato a una posizione multipla
- 30 % non risulta allineato

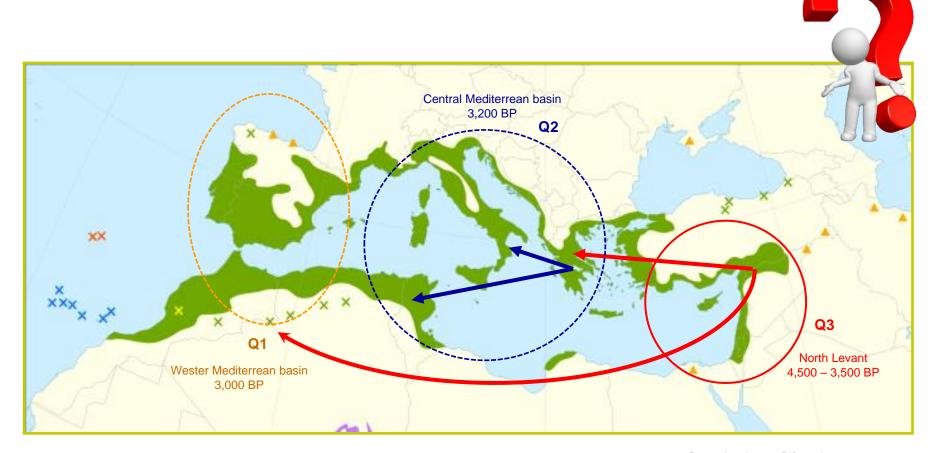


# Raggruppamento basato su caratteri morfologici ad elevata ereditabilità

#### **Modelling population structure**



## Origine e diffusione dell'olivo: un possibile scenario

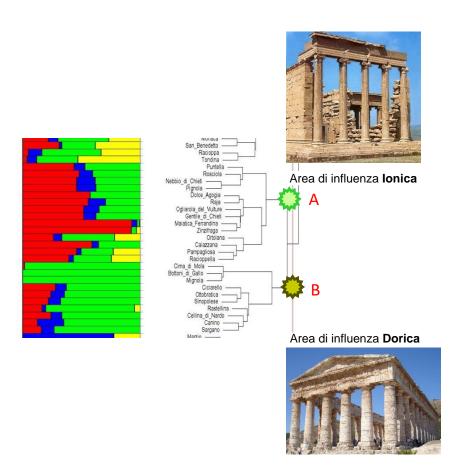


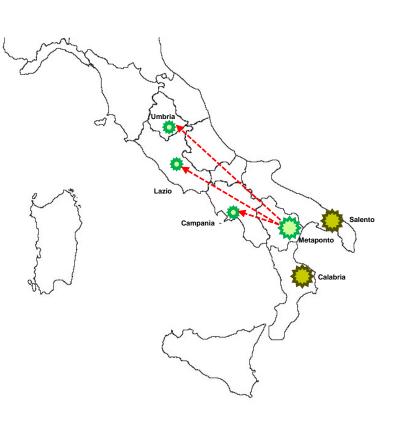
#### La probabile origine delle cultivar di olivo italiane



Q2

#### Ancestore comune dalla Magno-Grecia



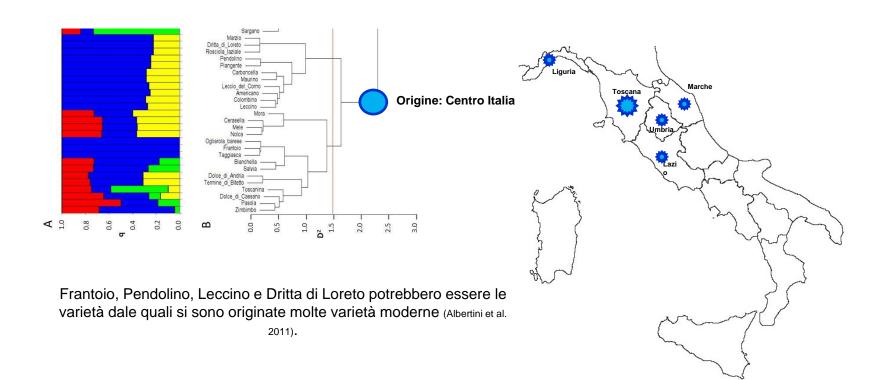


#### La probabile origine delle cultivar di olivo italiane

# II gene pool

**Q2?** 

Ancestore comune del Centro Italia (territorio Etrusco)

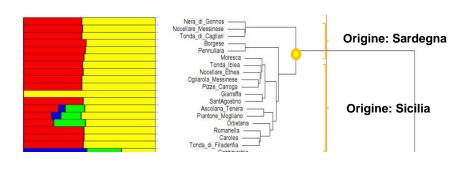


#### La probabile origine delle cultivar di olivo italiane

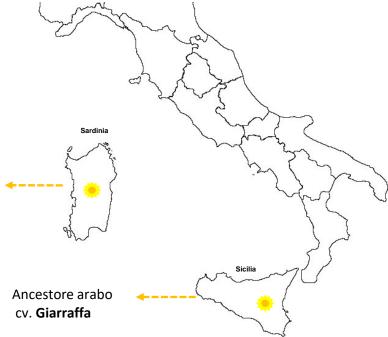
#### III gene pool



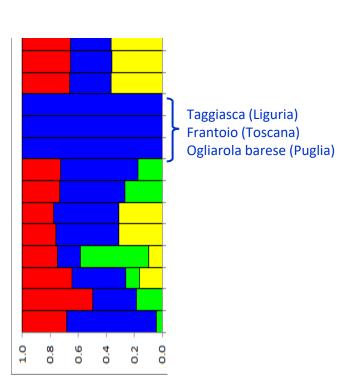
#### Cultivar di origine Arabo-Catalana



La **Nera di Gonnos**, conosciuta anche come Maiorca può rappresentare l'ancestor catalano. Ci sono testimonianza storiche e culturali della relzione tra Spagna e Sardegna.



#### Sinonimie eccellenti



#### Taggiasca



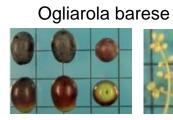














#### Frantoio











In tre anni sono stati raccolti molti più dati di quelli previsti, a conferma della grande importanza che ha la biodiversità olivicola della Regione Puglia.

Il lavoro è proseguito con la valutazione di nuovi genotipi di olivo in un secondo progetto finanziato dalla Regione Puglia.

L'approccio multidisciplinare di REGEROP mira a mettere insieme diversi tipi di informazioni per avere una visione completa delle risorse genetiche di olivo presenti sul territorio regionale.

Tutti i dati raccolti e consegnati alla Regione, sono stati pubblicati su riviste scientifiche con impact factor.



