Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: Valorizzazione di sottoprodotti della produzione dell'olio come biostimolanti di crescita e induttori di risposte immunitarie vegetali

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:
BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO

Responsabile scientifico: Lionetti Vincenzo
Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN
Numero di mensilità da svolgere in azienda: 6
Numero di mensilità da svolgere all'estero: 12 presso impegno ad identificare nei tempi previsti
Azienda: AGROLIO s.r.l. (Stabilimento S.P. 231 Km 55 + 120, 70031 - Andria - Puglia – Italia; TEL E FAX +39 0883 546074 P.Iva: IVA: 04529310726 - info@agrolio.com
Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10000 Euro
Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE "CHARLES DARWIN" con delibera del 20/09/2021

Progetto di ricerca:
La proposta progettuale combina lo sviluppo produttivo con la sostenibilità ambientale e l'innovazione tecnologica, come indicato nella Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente (SNSI – Industria intelligente e sostenibile, energia e ambiente) e si colloca nell'area di specializzazione progettuale Green Economy, settore ERC LS9_5 (Agricoltura correlata a produzione delle colture, biologia e coltivazione del suolo, biologia vegetale applicata).
Il progetto intende sviluppare una ricerca biotecnologica innovativa, di potenziale rilevanza industriale per lo sviluppo di una agricoltura sostenibile. Questa attività prevede una sinergia tra "Sapienza", Università di Roma, il frantoio "Agrolio", Andria (Bari), Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) del CNR, (Bari), il Centro Ricerche Sperimentazione e Formazione in Agricoltura (CRSFA) "Basile Caramia", Locorotondo (Bari) e il "Department of Plant and Environmental Sciences, Università di Copenaghen, Danimarca. In un'ottica di economia circolare, il progetto mira alla valorizzazione di sottoprodotti della produzione dell'olio favorendo da questi il recupero di frazioni polisaccaridiche e oligosaccaridiche, da reimpiegare nella stessa filiera agricola, come fitofarmaci e biostimolanti "verdi" a basso costo, per migliorare le difese naturali delle colture ed i loro parametri di crescita e produttività. La promozione di prodotti e processi produttivi green rispettosi dell'ambiente favoriranno la proliferazione di settori eco-innovativi basati su tecnologie green contribuendo alla sostenibilità economica ed ambientale.
I frantoi producono diversi sottoprodotti, quali foglie, sanse, nocciolino e acque di vegetazione, sino a ieri considerati una 'minaccia' per l'ambiente senza alcun interesse economico e onerosi da smaltire. Attualmente, questi scarti sono riutilizzati come ammendanti del terreno, combustibili o come additivi per mangimi. Nell'ultimo decennio, alcuni frantoi tra i quali anche "Agrolio", azienda coinvolta nel progetto, cominciano ad utilizzare la sansa vergine di oliva, denocciolata e arricchita da acqua di vegetazione come fonte di biomassa per bioreattori a biogas. Il frantoio, in questo modo, rimette in circolo i sottoprodotti recuperando energia utile per l'azienda e contribuendo a diminuire le emissioni di CO_2 nell'aria. Anche il biodigestore presenta uno scarto chiamato digestato, riversato nel terreno e sfruttato come fonte nutritiva per le piante riducendo la concimazione chimica. Tuttavia, la composizione precisa di questa biomassa di scarto non è ancora ben caratterizzata.
Attualmente, l'efficienza di conversione dei sottoprodotti della lavorazione dell'olio è ancora bassa, soprattutto a causa delle scarse conoscenze delle caratteristiche chimico-fisiche di queste biomasse, principalmente dovuta ad un

mancato dialogo tra centri di ricerca e aziende produttive. Grazie a questo progetto, verrà studiata nel dettaglio la composizione polisaccaridica e delle biomasse “sottoprodotti” della produzione dell’olio e la quantità e la qualità di elicitori di risposte di difesa da esse estraibili. Alcune biomasse tal quali o frazioni selezionate da esse verranno valutate per il loro possibile impiego su colture di forte interesse agronomico con forte impatto sulla loro capacità di resistere ad infezioni microbiche e sulla loro crescita e produttività. In questo modo il trattamento degli scarti oleari, oltre a ridurre problemi di tossicità ambientale e di smaltimento dei rifiuti, produce composti ad alto valore aggiunto utili per gli stessi produttori agricoli, in un modello di economia circolare e di agricoltura sostenibile.
La sicurezza alimentare e ambientale impone uno sforzo particolare nella ricerca di soluzioni per la lotta contro gli agenti patogeni, causa di perdite ingenti di raccolto e di contaminazioni alimentari da micotossine (Fisher et al., 2012). Per esempio, lo zearalenone, una aflatossina ad attività estrogenica non steroidea in grado di provocare infertilità, ninfomania, e in rari casi aborto, è stata identificata in diversi oli di oliva (Hidalgo-Ruiz et al., 2019). Focalizzandosi sull’olivo, tra le preoccupazioni maggiori per gli olivicoltori ci sono il batterio Xylella fastidiosa, l'agente della sindrome del declino rapido dell'olivo e Verticillium dhalie, l’agente della verticillosi, malattie devastanti che influiscono fortemente sulla resa delle olivee dell'olio d'oliva (López-Moral et al., 2021; Morelli et al., 2021). Inoltre, le malattie delle piante sono attualmente in larga parte combattute mediante pesticidi chimici, un serio rischio sia per l’inquinamento del suolo e delle falde acquifere che per la sicurezza alimentare e la salute umana. Tra i metodi ecosostenibili di controllo delle malattie emerge la possibilità di attivare precocemente la risposta immunitaria delle piante per contrastare l'infezione della pianta da parte di microrganismi (Mauch-Mani et al., 2017). Le Oligosaccarine di Parete Cellulare (OPC), sono composti naturali, non tossici e rispettosi dell'ambiente, in grado di attivare i meccanismi naturali di difesa della pianta (Lionetti and Metraux, 2014; Trouvelot et al., 2014). Gli OPC potrebbero essere già presenti dalle biomasse di scarto della produzione dell’olio oppure possono essere isolate in grande quantità per digestione parziale della componente polisaccaridica (Sciubba et al., 2020). L'uso di OPC ha il vantaggio di conferire alle piante una resistenza ad ampio spettro e, a differenza dell'uso dei pesticidi chimici, non favorisce la selezione di ceppi patogeni resistenti.
Pertanto, l’obiettivo principale del progetto è di valutare la possibilità di usare scarti della produzione dell’olio, o frazioni bioattive da essi derivate, come alternativa a basso costo e a basso impatto ambientale ai pesticidi chimici comunemente utilizzati nella lotta contro gli agenti patogeni e concimi usati nella stimolazione della crescita, anche in regime di lotta integrata o di agricoltura biologica. Tra gli obiettivi specifici del progetto sono inclusi: 1) La raccolta e il trattamento dei vari sottoprodotti al fine di ottenere frazioni arricchite in polisaccaridi 2) valutazione biochimica della composizione dei composti polisaccaridici; 3) Valutazione del potenziale di queste sostanze come induttore di resistenza contro i patogeni e come biofertilizzanti in sistemi vegetali modello e di interesse agronomico; 4) preparazione di un formulato da utilizzare sull’olivo, al fine di chiudere il cerchio eco-sostenibile.
Nella prima fase del progetto saranno raccolti e frazionati i vari sottoprodotti (principalmente foglie, sansa e digestato del bioreattore a biogas) ed effettuati tre campionamenti in tempi diversi, per poterne valutare la variabilità di composizione. Presso Sapienza “Università di Roma” verrà effettuata una dettagliata caratterizzazione dei polisaccaridi (cellulosa, pectine, e emicellulose) ed OPCs (oligogalatturonidi, cellodestrine e frammenti di xiloglucani) con attività potenzialmente elicitoria delle difese delle piante. Mediante un sistema Ultimate 3000 HPLC collegato a un Orbitrap XL Discovery dotato di una sorgente ESI e un sistema di cromatografia HPEAC-PAD (Lionetti, 2015).
Un'analisi microstrutturale della parete cellulare sarà eseguita utilizzando microarray di carboidrati in collaborazione con il Prof. William Willats, Università di Copenaghen, Danimarca (Kraun et al., 2017)
Nella seconda fase l’efficacia delle frazioni ottenute nella prima fase sarà testata come induttori di resistenza e come biostimolanti di crescita e produttività in condizioni controllate.
- Piante di A. thaliana e pomodoro saranno coltivate in camere di crescita presso Sapienza e sottoposte a irrigazione con sospensioni delle frazioni più interessanti individuate nella prima fase. I principali parametri di crescita e produttività delle piante trattate (biomassa fresca e secca, dimensione delle rosette, produzione in semi, produzione in frutti) saranno paragonati alle piante non trattate.
-L’impatto sulla resistenza verrà determinato con prove di infezione su foglie, utilizzando importanti patogeni come Botrytis cinerea e/o Pseudomonas syringae. L’efficacia delle frazioni verrà anche valutata trattando plantule con le

varie sospensioni e quantificando le principali risposte di difesa delle piante ad elicitori (Produzione di ROS mediante saggio luminometrico di ossidazione del luminolo, attivazione di MAP chinasi tramite immunoblot e Induzione di geni di difesa tramite Real Time PCR).

Nella terza fase sarà preparato un formulato “green” (Immugreen) arricchito in molecole con maggior efficacia nella biostimolazione della crescita e dell’immunità. Opportuni eccipienti saranno valutati per la formulazione di un prodotto commerciale finale. L’impatto di Immugreen verrà determinato sia sulla crescita che sulla resistenza dell’olivo a patogeni. Piante di olivo saranno cresciute in serra e irrigate con Immugreen e la crescita e produttività delle piante sarà paragonata alle piante non trattate. Grazie alla collaborazione con i laboratori di Pasquale Saldarelli (IPSP, CNR) ed Enza Dongiovanni (CRSFA) (che hanno l'Autorizzazione del Ministero a manipolare agenti patogeni e tessuti infetti) verranno effettuate prove di infezione con X. fastidiosa e V. dahliae. La comparsa e l’entità dei sintomi di patogeni naturali verrà osservata anche in campo, nelle piante irrigate con Immunogreen rispetto alla pianta non trattate.

Fisher MC et al (2012) Nature 484: 186–194
Hidalgo-Ruiz JL et al (2019) Food Chem 288: 22–28
Kraun SK et al (2017) Methods Mol Biol 1503: 147–165
Lionetti V (2015) FrontPlant Sci 6: 1–8
Lionetti V, Metraux JP (2014) FrontPlant Sci 5: 612.
López-Moral A et al (2021) Front Plant Sci 12: 662178
Mauch-Mani B et al (2017) Annual Review of Plant Biology 68: 485–512
Morelli M et al (2021) Microorganisms 9: 1771
Sciubba F et al (2020) Biology 9: 450
Trouvelot S et al (2014) Front Plant Sci 5:592

Titolo del progetto (inglese): Valorisation of bio-waste resulting from the olive oil extraction as plant growth biostimulants and inducers of plant immune responses

Progetto di ricerca (inglese):
This proposal combines productive development with environmental sustainability and technological innovation, as an indicator in the National Strategy of Intelligent Specialization (SNSI - Smart and sustainable industry, energy, and environment) and is placed in the Green Economy project specialization area, sector ERC LS9_5 (Agriculture related to crop production, soil biology and cultivation, applied plant biology).
The project aims at developing innovative biotechnological research, of potential industrial relevance, for the development of sustainable agriculture. This activity foresees a synergy between "Sapienza", University of Rome, “Agrolio” olive mill, Andria (Bari), the “Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante” (IPSP) of CNR, (Bari), the "Basile Caramia" Research Center and Training in Agriculture (CRSFA), Locorotondo (Bari) and the "Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Denmark. With a view to circular economy, the project aims to enhance the by-products of oil production by favouring the recovery of polysaccharide and oligosaccharide fractions, to be reused in the same agricultural chain, such as pesticides and biostimulants "green" at low cost, to improve the natural defenses of crops and their growth and productivity parameters. The promotion of green products and production processes that respect the environment will favour the promotion of eco-innovative sectors on green technologies contribute to economic and environmental sustainability.
The mills treated various by-products, such as leaves, pomace, pits, and vegetation waters, until yesterday considered a 'threat' to the environment without any economic interest and expensive to dispose of. Currently, these wastes are reused as soil improvers, fuels or as feed additives. In the last product, some oil mills, including the “Agrolio” company, involved in the project, are starting to use virgin olive pomace, pitted, and enriched with vegetation water as

a source of biomass for biogas bioreactors. In this way, the oil mill puts the by-products back into circulation, recovering useful energy for company and helping to reduce CO2 emissions in the air. The biodigester also produce a waste called digestate, which is poured into the soil and used as a nutrient source for plants by reducing chemical fertilization. However, the precise composition of this waste biomass is not yet well characterized.

Currently, the conversion efficiency of oil processing by-products is still low, mainly due to the poor knowledge of the chemical-physical characteristics of these biomasses, mainly due to a lack of dialogue between research centers and production companies. Thanks to this project, the polysaccharide composition and biomass "by-products" of oil production and the quantity and quality of elicitors of defense responses that can be extracted will be studied in detail. Some biomasses as such or selected fractions of them will be evaluated for their possible use on crops of strong agronomic interest (olive and tomato) with a strong impact on their ability to resist microbial infections and on their growth and productivity. In this way, the treatment of oil waste, in addition to reducing problems of environmental toxicity and waste disposal, produces compounds with high added value useful for the agricultural producers themselves, in a model of circular economy and sustainable agriculture.

Food and environmental safety requires a particular effort in the search for solutions to combat pathogens, which cause significant crop losses and food contamination by mycotoxins (Fisher et al., 2012). For example, zearalenone, a non-steroidal estrogenic aflatoxin capable of causing infertility, nymphomania, and in rare cases abortion, has been identified in several olive oils (Hidalgo-Ruiz et al., 2019). Focusing on the olive tree, among the biggest concerns for olive growers are the bacterium Xylella fastidiosa, the agent of olive quick decline syndrome, and the fungus Verticillium dahliae, the agent of erticillum wilt, devastating diseases that strongly affect the yield of olives and olive oil. (López-Moral et al., 2021; Morelli et al., 2021). To this problem, it should be added that plant diseases are currently largely combated by chemical pesticides, which represent a serious risk of soil and groundwater pollution, as well as a high risk to food safety and human health. Among the eco-sustainable methods of disease control emerges the possibility of activating the immune response of plants early to counteract the infection of the plant by microorganisms (Mauch-Mani et al., 2017). Cell Wall Oligosaccharins (CWOs) are natural, non-toxic, and environmentally friendly compounds capable of activating the natural defense mechanisms of the plant (Lionetti and Metraux, 2014; Trouvelot et al., 2014). The CWOs may already be present from waste biomass from oil production, or they can be isolated in large quantities by partial digestion of the polysaccharide component (Sciubba et al., 2020). The use of CWOs has the advantage of giving plants broad spectrum resistance and, unlike the use of chemical pesticides, it does not favor the selection of resistant pathogenic strains.

Therefore, the main objective of the project is to evaluate the possibility of using waste from oil production, or bioactive fractions derived from them, as a low cost and low environmental impact alternative to the chemical pesticides commonly used in the fight against pathogens and to the fertilizers used to stimulate growth, even in integrated pest management or organic farming.

The specific objectives of the project include: 1) The collection and treatment of the various by-products in order to obtain fractions enriched in polysaccharides 2) biochemical evaluation of the composition of the polysaccharide compounds; 3) Evaluation of the potential of these substances as inducer of resistance against pathogens and as biofertilizers in model plant systems and of agronomic interest; 4) preparation of a formulation to be used on the olive tree, in order to close the eco-sustainable circle.

In the first phase of the project, the various by-products of interest will be collected and divided (mainly leaves, pomace and digestate from the biogas bioreactor). At the “Agrolio” company, the waste production activities will be monitored, and three samplings will be carried out at different times, to evaluate the variability of composition. A detailed characterization of polysaccharides (cellulose, pectins and hemicelluloses) and CWOs (oligogalacturonides, cellodextrins and fragments of xyloglucans) will be carried out at Sapienza “University of Rome” with potentially eliciting activity of plant defenses using an Ultimate 3000 HPLC system connected to an Orbitrap XL Discovery equipped with an ESI source and an HPEAC-PAD chromatography system (Lionetti, 2015). A microstructural analysis of the cell wall will be performed using carbohydrate microarrays in collaboration with Prof. William Willats, University of Copenhagen, Denmark (Kraun et al., 2017).

In the second phase, the effectiveness of the fractions obtained in the first phase will be tested as resistance inducers and as growth and productivity biostimulants under controlled conditions.
- A. thaliana and tomato plants will be grown in growth chambers at Sapienza and subjected to irrigation with suspensions of the most interesting fractions identified in the first phase. The main growth and productivity parameters of the treated plants (fresh and dry biomass, rosette size, seed production, fruit production) will be compared to untreated plants.
- The impact on resistance will be determined with infection tests on leaves, using important pathogens such as Botrytis cinerea and / or Pseudomonas syringae. The efficacy of the fractions will also be evaluated by treating seedlings with the various suspensions and quantifying the main defense responses of plants to elicitors (ROS production by luminol oxidation assay, MAP kinase activation by immunoblot and induction of defense genes by Real Time PCR).

In the third phase, a "green" formulation (Immugreen) will be prepared, enriched in molecules with greater efficacy in the biostimulation of growth and immunity. Suitable excipients will be evaluated for the formulation of a final commercial product. The impact of Immugreen will be determined both on the growth and on the resistance of the olive tree to pathogens. Olive trees will be grown in greenhouses and irrigated with Immugreen and plant growth and productivity will be compared to untreated plants. Thanks to the collaboration with the laboratories of Pasquale Saldarelli (IPSP, CNR) and Enza Dongiovanni (CRSFA) (who have the authorization of the Ministry to handle pathogens and infected tissues), infection tests will be carried out with X. fastidiosa and V. dahliae. The appearance and extent of the symptoms of natural pathogens will also be observed in the field, in plants irrigated with Immunogreen compared to the untreated plant.

Fisher MC et al (2012) Nature 484: 186–194
Hidalgo-Ruiz JL et al (2019) Food Chem 288: 22–28
Kraun SK et al (2017) Methods Mol Biol 1503: 147–165
Lionetti V (2015) FrontPlant Sci 6: 1–8
Lionetti V, Metraux JP (2014) FrontPlant Sci 5: 612.
López-Moral A et al (2021) Front Plant Sci 12: 662178
Mauch-Mani B et al (2017) Annual Review of Plant Biology 68: 485–512
Morelli M et al (2021) Microorganisms 9: 1771
Sciubba F et al (2020) Biology 9: 450
Trouvelot S et al (2014) Front Plant Sci. 5:592