



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

**RISPOSTA AL FREDDO IN OLIVO E PESCO
PLATICARPA
RESPONSE TO COLD IN OLIVE AND PLATICARPA
PEACH TREES**

TESI sperimentale

Studente:
MATTEO PULITA

Relatore:
PROF. ENRICO MARIA LODOLINI

Correlatore:
DOTT. MATTEO ZUCCHINI

Ancona, 02/10/2024

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Ai miei nonni, Dario e Luigi,
che oggi non siete qua con me ma avete
saputo indirizzare il mio percorso.

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE	5
ELENCO DELLE FIGURE	7
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	11
CAPITOLO 1 “FISIOLOGIA E STRUTTURA GENERALE DELLA PIANTA”	12
1.1 Struttura della pianta	12
1.1.1 Chioma.....	12
1.1.2 Scheletro	12
1.1.3 Foglie.....	13
1.1.4 Radici.....	13
1.2 Diverse tipologie di foglie	14
1.2.1 Specie sempreverdi.....	14
1.2.2 Specie caducifoglie.....	14
1.2.3 Differenze	14
CAPITOLO 2 “MOLECOLE DI ACQUA E PROCESSO DI CONGELAMENTO” .	15
2.1 Generalità sulla molecola di acqua.....	15
2.2 Ciclo dell’acqua	15
2.3 Struttura della molecola di acqua.....	16
2.4 Struttura del ghiaccio.....	16
2.5 Congelamento dell’acqua e acqua sopraffusa.....	17
CAPITOLO 3 “STRESS AMBIENTALI”	19
3.1 Stress da basse temperature	19
3.2 Il gelo.....	19
3.2.1 Effetti del gelo sulle piante	20
3.2.2 Metodi per contrastare le basse temperature e il gelo.....	21
3.2.3 Proteine antigelo.....	24
CAPITOLO 4 “MACROMOLECOLE NELLE PIANTE”	25
4.1 Carboidrati.....	25

4.1.1 Saccarosio	25
4.1.2 Sorbitolo	26
4.1.3 Mannitolo.....	26
4.1.4 Raffinosio	26
CAPITOLO 5 “MATERIALI E METODI”	28
5.1 Materiali e metodi per l’olivo	28
5.1.1 Prelievo in campo.....	28
5.1.2 Fasi preliminari di laboratorio.....	29
5.1.3 Trattamenti.....	29
5.1.4 Prelievo dei campioni	31
5.1.4 Valutazione dei danni	32
5.2 Materiali e metodi per il pesco.....	38
5.2.1 Prelievo in campo.....	38
5.2.2 Fasi preliminari di laboratorio.....	38
5.2.3 Trattamenti.....	38
5.2.4 Prelievo dei campioni	40
5.2.5 Valutazione dei danni	41
CAPITOLO 6 “RISULTATI E DISCUSSIONI”	44
6.1 Dati rilevati su olivo nelle fasi preliminari di laboratorio	44
6.2 Risultati olivo.....	45
6.2.1 Danni visivi.....	45
6.2.2 Valutazione danni con Conducibilità Elettrica.....	45
6.3 Discussione finale dei risultati per l’olivo	57
6.4 Discussione dati trattamenti pesco	58
6.5.1 Danni visivi.....	58
6.5.2 Valutazione dei danni con il metodo della Conducibilità Elettrica	58
6.6 Discussione finale dei risultati nel pesco.....	62
CONCLUSIONI	63
BIBLIOGRAFIA.....	64

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Media (6 misurazioni) dei parametri misurati tramite Lcpro T	29
Tabella 2: Peso fresco delle foglie (media di 12 foglie per ogni CV) e del ramo (media 4 porzioni di ramo per ogni CV) di olivo e relativo quantitativo di acqua in foglie e rami freschi.....	44
Tabella 3: Pesi secchi di foglie (media di 12 foglie per ogni CV) e rami (media d 4 porzioni di ramo per ogni CV).....	44
Tabella 4: % di acqua in foglie (media di 12 foglie per ogni CV) e rami (media di 4 porzioni di ramo per ogni CV).....	44
Tabella 5: REL foglia Arbequina: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.	46
Tabella 6: REL ramo Arbequina: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.	47
Tabella 7: REL foglia Piantone di Falerone: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	48
Tabella 8: REL ramo Piantone di Falerone: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	48
Tabella 9: REL foglia Piantone di Mogliano: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	49
Tabella 10: REL ramo Piantone di Mogliano: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	50
Tabella 11: REL foglia Rosciola C.E.: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	51
Tabella 12: REL ramo Rosciola C.E.: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	51
Tabella 13: REL foglie a -5°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	52

Tabella 14: REL foglia -10°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	53
Tabella 15: REL foglia -80°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	54
Tabella 16: REL ramo -5°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard	55
Tabella 17: REL ramo -10°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	55
Tabella 18: REL ramo -80°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.....	56
Tabella 19: REL foglia Luisella: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard	59
Tabella 20: REL ramo Luisella: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.	59
Tabella 21: REL foglia Canoppe: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard	60
Tabella 22: REL ramo Canoppe: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard	61

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Angolo di legame tra gli atomi di H e O (Pecci, 2011)	16
Figura 2: Disposizione molecole di acqua libera (sx) e acqua solida (dx) (en.differbetween.com, 2024)	17
Figura 3: Diagramma di fase dell'acqua (Wikipedia)	17
Figura 4: Struttura del mannitolo (sx) e sorbitolo (dx) (Wikipedia)	26
Figura 5: Struttura del raffinose (Wikipedia)	27
Figura 6: Andamento della temperatura nel trattamento 1 (-5°C).....	30
Figura 7: Andamento della temperatura nel trattamento 2 (-10°C).....	31
Figura 8: 96 campioni dell'olivo in vasetti numerati.....	32
Figura 9: Grado 3-2-1 delle foglie per la valutazione visiva dei danni (da Valverde et al., 2024).	33
Figura 10: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Mogliano (dx) sottoposte al trattamento 1 (-5°C).....	34
Figura 11: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al trattamento 1 (-5°C). ..	34
Figura 12: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Mogliano (dx) sottoposte al trattamento 2 (-10°C).....	35
Figura 13: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al trattamento 2 (-10°C). ..	35
Figura 14: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Mogliano (dx) sottoposte al controllo -80°C.	36
Figura 15: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al controllo -80°C.....	36
Figura 16: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Mogliano (dx) sottoposte al controllo T° ambiente.	37
Figura 17: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al controllo T° ambiente. ..	37
Figura 18: Andamento della temperatura nel trattamento 1 (-2°C).....	39
Figura 19: Andamento della temperatura del trattamento 2 (-5°C).....	39
Figura 20: Andamento della temperatura del trattamento 3 (-10°C).....	40
Figura 21: 80 campioni di pesco in vasetti numerati	41

Figura 22: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento 1 (-2°C).	42
Figura 23: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento 2 (-5°C).	42
Figura 24: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento 3 (-10°C).	42
Figura 25: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento di controllo -80°C.	43
Figura 26: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento di controllo a temperatura ambiente.	43
Figura 27: Grafico REL foglia: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	46
Figura 28: Grafico REL ramo: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	47
Figura 29: Grafico REL foglia: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	48
Figura 30: Grafico REL ramo: A-B-C-D indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	49
Figura 31: Grafico REL foglia: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	50
Figura 32: Grafico REL ramo: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	50
Figura 33: Grafico REL foglia: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	51
Figura 34: Grafico REL ramo: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	52

Figura 35: Grafico REL foglia -5°C: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	53
Figura 36: Grafico REL foglia -10°C: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	54
Figura 37: Grafico REL foglia -80°: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	54
Figura 38: Grafico REL ramo -5°C: A-B indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	55
Figura 39: Grafico REL ramo -10°C: A-B indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	56
Figura 40: Grafico REL ramo -80°C: A-B indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	57
Figura 41: Arrossamenti degli apici fogliari	58
Figura 42: Grafico REL foglia Luisella: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	59
Figura 43: Grafico REL ramo Luisella: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	60
Figura 44: Grafico REL foglia Canoppe: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	61
Figura 45: Grafico REL ramo Canoppe: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.	62

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi ha l'obiettivo di fornire informazioni riguardo alle principali differenze nella risposta al freddo fra specie caducifoglie e specie sempreverdi, ponendo l'attenzione su come reagiscono le foglie e i rami.

Per studiare le principali differenze, sono state prese come riferimento due specie di importanza agronomica ed economica del panorama frutticolo della zona del Mediterraneo: il pesco "*Prunus persica*" per le specie caducifoglie e l'olivo "*Olea europea*" per le specie sempre verdi.

Come riportato da Bassi et al. (2016) il pesco è una drupacea (il cui frutto è una drupa) appartenente alla famiglia delle *Rosaceae*. Di questa famiglia, nelle zone temperate (Italia compresa) il pesco è la specie più coltivata. La produzione peschicola copre 1,5 milioni di ettari per un totale di circa 18 milioni di tonnellate di produzione. Nel mondo, dopo melo e pero, è il primo albero da frutto di maggior importanza economica; la produzione è destinata per oltre il 90% al mercato del fresco, mentre la restante quota alimenta l'industria conserviera.

Possiamo invece affermare che l'olivo, "*Olea europea*", è una delle colture più antiche, diffuse e importanti del bacino del Mediterraneo (Rugini et al., 2005). Sono coltivati molti genotipi diversi, quindi per questo motivo c'è un alto grado di variazione morfologica e biologica. Attualmente, la coltivazione di *Olea europea* si è estesa oltre al Mediterraneo, allargando il proprio areale di coltivazione in Australia, Nuova Zelanda, Sud e Nord America, Sud Africa, ed alcune aree dell'Asia (Cina e Giappone).

Questo lavoro permetterà di mettere in evidenza il fenomeno del congelamento dell'acqua nelle piante e, in particolare nelle foglie e nei rami: si partirà analizzando i principali aspetti e strutture della pianta, per poi proseguire con lo studio della molecola dell'acqua e il suo comportamento in relazione ai diversi livelli termici. Infine, si farà un *excursus* su quelle macromolecole che intervengono nella resistenza al freddo e al gelo.

CAPITOLO 1

“FISIOLOGIA E STRUTTURA GENERALE DELLA PIANTA”

1.1 Struttura della pianta

Dovendo analizzare la risposta alle basse temperature delle piante, è doveroso fare un richiamo, seppur generale, sulla struttura e alle funzionalità delle piante arboree, sia quelle sempreverdi, come l'olivo, che quelle caducifoglie, come il pesco.

Entrambe le specie sopra citate sono strutturate in diverse strutture:

- Chioma
- Fusto
- Radici

Queste concorrono alla formazione di una pianta arborea adeguatamente e sufficientemente funzionale.

1.1.1 Chioma

Con le sue caratteristiche (forma, colore, ampiezza, ecc.) rappresenta il primo elemento distintivo delle diverse specie arboree; altro elemento di distinzione è la persistenza o meno delle foglie, che ci permette, quindi, di dividere le piante rispettivamente in sempreverdi (olivo) e caducifoglie (pesco).

La chioma si compone di due elementi strutturali: lo scheletro, ovvero le branche, e le foglie.

1.1.2 Scheletro

Rappresentato dalle branche, le quali presentano diversi livelli di differenziazione: le principali si inseriscono sul tronco e sono quelle di dimensioni maggiori e con funzione portante per le altre; le secondarie sono quelle che si inseriscono sulle primarie; infine, le terziarie e le fruttifere che sono quelle che portano le strutture riproduttive della pianta (Barone, 2012).

1.1.3 Foglie

Le foglie sono strutture vegetali portate sui rami e germogli delle piante e svolgono importanti funzioni, tra cui fotosintesi, traspirazione, respirazione.

Altro importante ruolo è quello di formare delle riserve di fotosintetati/assimilati una volta avvenuta la raccolta dei frutti, che serviranno alla pianta nella successiva stagione vegeto-riproduttiva.

Possono avere forme, colori, dimensioni, margini differenti a seconda della specie.

Dal punto di vista strutturale, le foglie si compongono di: pagina superiore e inferiore, entrambe protette dall'epidermide (la superiore ha un ulteriore strato protettivo, la cuticola: strato a base di una cera chiamata cutina); mesofillo, frapposto fra le due pagine e diviso in due tipologie a palizzata (ricco di cloroplasti) e lacunoso (ricco di spazi intercellulari); e nervature, le quali nella pagina superiore sono formate da xilema e quindi deputate al trasporto di acqua e minerali provenienti dalle radici, mentre in quella inferiore, sono formate da floema e quindi servono per il trasporto dei prodotti della fotosintesi da punti di produzione ai punti di utilizzo e di accumulo.

1.1.4 Radici

Sono le strutture ipogee delle piante che si trovano immerse nel terreno. Le principali funzioni dell'apparato radicale sono: ancoraggio al terreno, metabolismo dei fotosintetati prodotti, assorbimento, trasporto e accumulo di acqua e nutrienti.

Ci soffermeremo su quest'ultimo aspetto, perchè ci anticipa la presenza di alcune sostanze chimiche che sono molto importanti per la protezione della pianta da eventuali danni causati da freddo e basse temperature.

Come prima cosa, bisogna dire che la maggior parte di acqua e nutrienti sono assorbiti dalle radici in struttura primaria in corrispondenza della zona pilifera, mentre una minor quota è assorbita da radici più vecchie (Fabbri, 2014). Questi nutrienti, nel tempo, vanno a formare delle riserve perché immagazzinati. I carboidrati vengono stoccati sotto forma di amido, in cellule sia radicali che delle strutture epigee; questo processo avviene in maniera intensa nel periodo immediatamente successivo alla raccolta dei frutti, ovvero quando cessano le competizioni fra radici e strutture vegetali fuori terra.

Quando la pianta andrà in ripresa vegetativa, avrà una richiesta massima di questi zuccheri e le radici, con le loro riserve, riescono a soddisfare questa richiesta, mettendo principalmente in azione un flusso zuccherino floematico e in minor quantità anche per via xilematica (Fabbri, 2012).

1.2 Diverse tipologie di foglie

1.2.1 Specie sempreverdi

Si è presa in esame la pianta di olivo, dove si possono riscontrare delle differenze nelle foglie rispetto alle specie caducifoglie.

Sotto l'epidermide si trovano sclereidi, ovvero delle cellule morte con parete fortemente lignificata, che conferiscono adeguata rigidità. Sulla superficie fogliare sono presenti gli stomi infossati (e presenti solo sulla pagina inferiore, coperti da una fitta coltre di peli stellati), la cui funzione è quella di far avvenire gli scambi gassosi con l'esterno e, come vedremo poi, anche quella di entrata di acqua.

Nell'olivo gli stomi hanno diametro maggiore di 12-16 micron, mentre il minore è di 6-10 micron; il contenuto idrico si aggira intorno al 50% (Barone, 2012).

Non è presente filloptosi autunnale ma il ricambio del fogliame si verifica con cicli poliennali ogni 2-3 anni circa.

1.2.2 Specie caducifoglie

Si è preso in esame il pesco, nel quale gli stomi non sono infossati, ma bensì protrusi verso l'esterno, il diametro maggiore di 19-29 micron e il minore di 7-11 micron, mentre il contenuto idrico si aggira attorno al 70% (Barone, 2012).

Il pesco, essendo una specie caducifoglia, presenta filloptosi autunnale ogni anno.

1.2.3 Differenze

La differenza nel contenuto idrico delle foglie di queste due specie può fornire già una prima sommaria spiegazione delle differenze nel danno da freddo.

Nelle fasi del ciclo annuale in cui in entrambe si ha la presenza di foglie, essendo presente meno acqua, l'olivo risulta meno soggetto a danni da freddo rispetto al pesco. Quando invece si fa riferimento alla fase di stasi vegetativa invernale, per la resistenza al freddo si prende in considerazione anche l'acclimatamento e altri meccanismi che verranno illustrati nei paragrafi successivi.

CAPITOLO 2

“MOLECOLE DI ACQUA E PROCESSO DI CONGELAMENTO”

2.1 Generalità sulla molecola di acqua

Per poter illustrare e spiegare in maniera esaustiva il fenomeno del congelamento dell'acqua e i suoi effetti nelle piante, è di fondamentale importanza conoscere la molecola dell'acqua.

L'acqua, secondo il premio Nobel del 1937 Albert Szent-Giörgyi (Momicchioli & Mirone, 2004), è la “matrice della vita”, la quale ha contribuito a modellare il nostro ambiente biologico, è il costituente di cellule vegetali e animali e rientra nei processi fisiologici, metereologici, agronomici, risultando quindi indispensabile per l'agricoltura.

L'acqua compie un suo ciclo all'interno dell'idrosfera, subisce vari cambiamenti di stato e viene accumulata nei punti di riserva quali oceani, laghi, mari, fiumi e falde sotterranee.

L'**idrosfera** si definisce come l'insieme delle acque presenti nel nostro pianeta e nei diversi stati di aggregazione.

2.2 Ciclo dell'acqua

Essendo un ciclo, per definizione non ha un inizio e una fine, ma ci sono dei processi fisici che permettono il movimento dell'acqua tra i vari compartimenti dell'idrosfera.

Di seguito una breve spiegazione di questi processi:

- **Evaporazione:** passaggio di stato dall'acqua liquida alla fase di vapore. Questa quota prende in considerazione anche la porzione di acqua liquida soggetta a traspirazione dalle piante: si parlerà, quindi, di evapotraspirazione.
- **Condensazione:** passaggio dallo stato gassoso a quello liquido.
- **Precipitazioni:** vapore acqueo che condensa e porta alla formazione di nuvole, al cui interno si verifica la formazione di precipitazioni quali neve, pioggia, grandine, ecc.
- Fenomeni di **infiltrazione** e **scorrimento:** si verificano all'interno e sulla superficie del terreno.

2.3 Struttura della molecola di acqua

Da un punto di vista puramente chimico, la molecola di acqua, H_2O , è formata da due atomi di idrogeno (H) e un atomo di ossigeno (O).

I due atomi di idrogeno hanno un elettrone ciascuno da mettere in comune nella molecola, mentre l'ossigeno possiede un doppietto di elettroni. Questi due elettroni serviranno all'H per saturare i suoi orbitali e quindi evitare la presenza di *lone pair* (elettroni singoli senza legami). (Pecci, 2011)

In questo modo questi due elettroni solitari andranno a formare un legame, di tipo covalente polare con l'elettrone spaiato, quindi disponibile, di ciascun atomo di idrogeno con angolo di legame tra i due atomi di H di 105° (precisamente $104,45^\circ$) per via della differenza di elettronegatività tra O e H. Questo legame prende il nome di **legame idrogeno**, è il responsabile della polarità della molecola e si istaura tra le varie molecole di acqua.

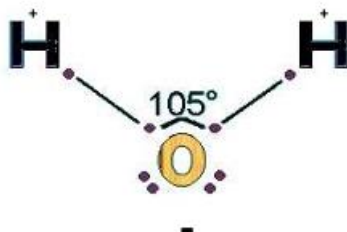


Figura 1: Angolo di legame tra gli atomi di H e O (Pecci, 2011)

Con l'aggregazione di tutte queste molecole, tramite ponti idrogeno, si avrà la comparsa di una macromolecola che può passare dallo stato solido, a quello di vapore, a quello liquido, a seconda delle condizioni chimico-fisiche che si riscontrano nell'ambiente.

2.4 Struttura del ghiaccio

Come menzionato in precedenza, l'acqua può passare dallo stato solido, al liquido e al gassoso e viceversa, a seconda di determinate condizioni chimico-fisiche.

Il primo aspetto degno di nota è la diversa struttura dell'acqua negli stati sopra citati: il ghiaccio (la fase solida) è rigido e ben definito, perché si formano molti legami H. Questo però porta alla formazione di molti vuoti di volume che da una parte portano ad un aumento delle dimensioni del solido appena formato ma, dall'altra parte, portano ad una riduzione di densità rispetto a quella posseduta dall'acqua liquida. Tutto il ghiaccio presente sulla Terra assume una particolare struttura cristallina con sistema esagonale **Ih** (h sta per esagonale, mentre I sta per "ice" che in inglese significa appunto ghiaccio) (Pecci, 2011).

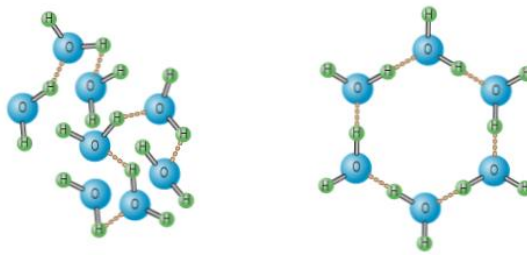


Figura 2: Disposizione molecole di acqua libera (sx) e acqua solida (dx) (en.differbetween.com, 2024)

A temperature più basse e a pressioni maggiori di 2 kbar il ghiaccio si presenta in molte altre fasi cristalline. Nessuna altra molecola manifesta in natura una simile varietà di forme. Il diagramma di fase del ghiaccio mostra le condizioni di stabilità delle fasi ghiaccio.

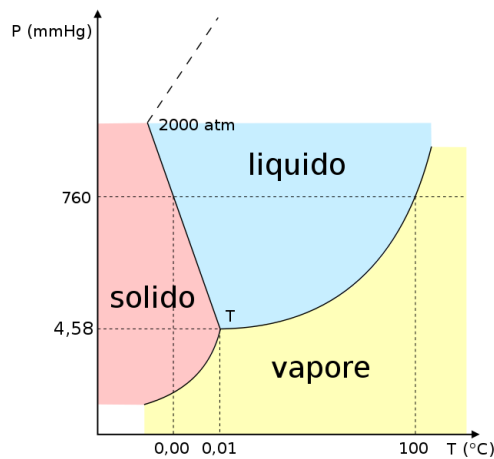


Figura 3: Diagramma di fase dell'acqua (Wikipedia)

Quando, invece, l'acqua non si trova né in fase solida né in fase gassosa, significa che è in fase liquida. In questa situazione c'è sempre la presenza di legami H fra le molecole che si dispongono a formare un tetraedro, ma non è rispettata alcuna simmetria e, quindi, le molecole possono formare e rompere legami in maniera continua, portando ad una riduzione di volume ma allo stesso tempo un aumento di densità.

2.5 Congelamento dell'acqua e acqua sopraffusa

A questo punto, si può spiegare come avviene il congelamento dell'acqua e quindi, come si passa dallo stato liquido a quello solido.

Come prima cosa si deve fissare il punto di congelamento di questa molecola: prendendo in considerazione la temperatura in gradi Celsius, questo sarà fissato a 0°C , i quali corrispondono a 273,15 gradi Kelvin.

Prendendo questi valori, si potrebbe affermare con apparente facilità e semplicità che l'acqua, qualsiasi essa sia, congela a 0°C . Tuttavia, vi sono diversi casi in cui l'acqua congela a differenti temperature.

A volte la temperatura dell'acqua scende sotto al punto di congelamento, anche di molti gradi, senza che si formi il ghiaccio. In questo caso si parla di acqua liquida sottoraffreddata (o sopraffusa).

Per congelare, l'acqua, oltre che di un abbassamento della temperatura (che rallenti sufficientemente le molecole, portandole a formare la struttura cristallina tetraedrica), ha bisogno di un "innesco", o di un "centro di nucleazione" (o "agente nucleante"), cioè un qualcosa che permette di iniziare la formazione della struttura di un cristallo di ghiaccio, ad esempio un granello di polvere, una bolla d'aria o qualche altro materiale. Il motivo si spiega facendo riferimento all'energia necessaria perché un pezzettino di ghiaccio di un dato raggio possa cominciare ad ingrandirsi: se il raggio iniziale è inferiore ad un certo valore critico, l'accrescimento richiede molta energia, e quindi di solito è poco probabile.

Se all'inizio il ghiaccio si forma su un agente nucleante, l'accrescimento è facilitato poiché il raggio può essere già maggiore del valore critico. Se invece scarseggiano o mancano del tutto quei difetti o impurità che sono considerati dei centri per la nucleazione dei cristalli del ghiaccio, l'acqua può essere sottoraffreddata fino a -40°C senza che si congeli. Si tratta di una situazione termodinamicamente instabile: è sufficiente una piccola perturbazione esterna – agitazione meccanica, contatto con altri materiali, decremento di pressione – perché l'acqua diventi istantaneamente ghiaccio (Giordano, 2022)

CAPITOLO 3 “STRESS AMBIENTALI”

3.1 Stress da basse temperature

Di seguito si vanno ad analizzare i principali stress ambientali a cui è soggetta la pianta, nei quali entra in gioco la molecola di acqua sopra citata, riponendo maggior attenzione sulle basse temperature.

Queste possono essere temperature che scendono sotto lo zero termico o che non lo oltrepassano, ma che comunque sono da considerare basse (Dichio, 2014).

Nel primo caso, questi livelli di temperatura portano alla formazione di ghiaccio negli spazi intercellulari (tra le cellule) e nei vasi, il che comporta un abbassamento del potenziale idrico extracellulare con ulteriore richiamo di acqua e conseguente formazione di altro ghiaccio, fino ad arrivare a plasmolisi (rottura della membrana cellulare). Provoca una progressiva disidratazione delle cellule e possibile formazione di ghiaccio anche all'interno della cellula (Dichio, 2014).

Molteplici studi hanno evidenziato che un meccanismo di difesa per fronteggiare questa condizione di stress è un aumento considerevole di osmoliti cellulari. Con questo termine si intendono gli zuccheri e gli alcol zuccheri che verranno descritti nel capitolo successivo. Questi svolgono un ruolo fondamentale perché possono fungere da crioprotettori che permettono di mantenere l'integrità delle membrane, delle pareti cellulari e di prevenire la disidratazione cellulare.

Inoltre, un importante ruolo contro il gelo è svolto da Sali e proteine, le quali verranno trattate nei paragrafi seguenti.

3.2 Il gelo

La formazione del gelo è uno dei più importanti fenomeni correlati alle basse temperature ed è uno dei principali agenti causali degli stress abiotici per le piante. Esso si forma nel momento in cui le piante sono sottoposte a temperature basse sotto lo zero, definite anche gelide.

Negli ultimi anni, il gelo sta ricoprendo un ruolo cruciale in ambito agricolo, in quanto sta causando una notevole riduzione di raccolto a trecentosessanta gradi, per via del cambiamento climatico che sta avendo delle manifestazioni e ripercussioni sempre più evidenti.

Proprio a causa di esso, nel nostro continente si sta verificando un aumento dei giorni di gelo (Román-Figueroa et al., 2021) che bisogna, però, essere in grado di fronteggiare nelle giuste maniere per evitare danni irreversibili, sia per la salute della pianta che a livello economico-produttivo.

Facendo riferimento ad alcuni autori che hanno trattato precedentemente questo argomento, prima di parlare del gelo e dei suoi effetti bisogna fare una distinzione fra gelo e congelamento.

Román-Figueroa et al. (2021) affermano che per **gelo** si intende il fenomeno atmosferico che coinvolge temperatura dell'aria molto basse e il fenomeno che indica la formazione di ghiaccio sulla superficie delle foglie.

Per **congelamento** si indica il fenomeno fisico che porta ad un cambiamento di fase dell'acqua non sulla superficie della pianta, ma bensì all'interno di essa. Quindi, si parla di gelo se si intende la patina bianca di cristalli di ghiaccio che si evidenzia sulla superficie fogliare, mentre se si usa il termine congelamento si vuole indicare il passaggio dell'acqua da liquida a solida all'interno delle foglie.

L'acqua che congela e che causa maggiori danni è quella che subisce una migrazione dall'interno all'esterno della cellula perchè viene sottoposta all'azione delle temperature gelide che ne causa la trasformazione in ghiaccio, portando ad una completa disidratazione cellulare e causando anche danni strutturali alla cellula.

3.2.1 Effetti del gelo sulle piante

Bisogna distinguere le piante in: **sensibili** e **tolleranti**: le prime evitano o ritardano la formazione di ghiaccio (ad esempio con il sopra raffreddamento), mentre le seconde sono quelle che riescono a sopravvivere anche in presenza di ghiaccio, cioè quando quest'ultimo si è formato ma la pianta è adeguatamente acclimatata.

Il gelo che si forma si va a localizzare negli spazi extracellulari. Bisogna ricordare, però che, l'acqua, in assenza di agenti nucleanti, anche sotto lo zero può non congelare sopra raffreddandosi.

Nel momento in cui l'acqua extracellulare congela, si evidenzia un cambiamento di fase, da liquida a solida. Questo comporta alterazioni nella fluidità della membrana perché alcuni lipidi vanno in stato di gel con conseguente riduzione della selettività; quindi, la membrana andrà a perdere quella sua funzione tipica di controllo e di selezione dei soluti in entrata e in uscita dalla cellula che si traduce in una maggior permeabilità, fino alla completa lisi cellulare. Inoltre, ci potrebbe essere un'inibizione della fotosintesi.

In questo caso, si andrà ad avere una ridotta produzione di zuccheri che, con il passare del tempo, andrà a costituire una limitata quota di riserve responsabili della resistenza al freddo.

Nel momento in cui la cellula va incontro a congelamento, si formano cristalli di ghiaccio e quindi inizia la disidratazione cellulare e si verificano danni/lesioni alla membrana (Román-Figueroa et al., 2021).

Ovviamente, i danni e gli effetti dovuti alla formazione del gelo sono riconducibili a diversi fattori: dopo una gelata, la velocità con la quale gli organi riacquistano calore è importante nel determinare il danno finale (più brusco è il riscaldamento, maggiori sono i danni), così come forti rischi derivano dal verificarsi, a distanza di giorni, di eventi consecutivi in cui la temperatura scende sotto lo zero. L'effetto sinergico, del susseguirsi in tempi brevi di abbassamenti termici è difficilmente prevedibile poiché dipende dallo stadio fenologico, dall'entità del danno precedente e dalle temperature che caratterizzano i successivi fenomeni. Anche la durata dell'evento influenza l'entità del danno: minime termiche anche rilevanti, ma di breve durata hanno effetti solitamente minori rispetto ad abbassamenti termici di pochi gradi sotto zero che però hanno una maggior durata. In tal caso, i danni rilevabili sembrano frutto di un effetto negativo sinergico fra le minime termiche assolute e il numero di ore con temperatura inferiore a 0°C (Zinoni et al., 2005).

Nei paragrafi seguenti verranno riportati dei meccanismi che la pianta mette in atto per far fronte a questo stress abiotico.

3.2.2 Metodi per contrastare le basse temperature e il gelo

Le piante possono fronteggiare questo pericolo in diversi modi:

- ***Acclimatamento al freddo***

Questo fenomeno prevede una serie di cambiamenti fisiologici nella pianta che sono considerati preliminari per generare resistenza al gelo. Per questo motivo, la pianta deve cercare di metterli in atto prima che arrivino le temperature gelide.

L'acclimatamento è un fenomeno riconducibile ai primi periodi di riposo vegetativo, quando ancora le temperature non sono freddissime ma al tempo stesso la pianta si deve preparare per essere in grado di saperle fronteggiare nell'immediato futuro.

L'acclimatamento si verifica in presenza di temperature basse ma non gelide. I carboidrati sono i principali responsabili perché fungono da crioprotettori. Questo fenomeno avviene in due fasi successive: la prima, detta primaria, si verifica quando le temperature sono basse ma non gelide e si ha accumulo di zuccheri come fase preparatoria per il successivo step, ovvero la seconda fase, detta secondaria. Questa si ha quando le temperature scendono sotto lo zero per un breve periodo e preferibilmente di notte; in questo modo l'acclimatamento è avvenuta e la pianta riesce a tollerare freddo e formazione di ghiaccio (Román-Figueroa et al., 2021).

Questa è una risposta che risulta essere efficace nel caso in cui l'abbassamento delle temperature sia graduale e non repentino e permettono di ottenere un abbassamento della soglia di congelamento della pianta e in generale degli organi vegetali.

Nel caso in cui gli abbassamenti dovessero essere troppo veloci prima che si sia verificata l'acclimatamento, si avrà congelamento dei tessuti, ovvero formazione di ghiaccio all'interno della pianta, morte cellulare per danni meccanici causati dai cristalli di ghiaccio che si sono formati, ecc.

Quando invece, le temperature sono gelide, quindi sotto lo zero, la formazione di ghiaccio è fortemente favorita. Di conseguenza, per cercare di avere un'adeguata resistenza, la pianta può mettere in gioco diversi meccanismi riconducibili a evitamento del congelamento e tolleranza al congelamento, oltre che ad una corretta funzionalità delle proteine antigelo.

Comunque sia, è bene ricordare che in inverno le temperature possono raggiungere minime termiche importanti, ma la pianta, essendo acclimatata, sarà soggetta a danni poco considerevoli.

Questi saranno maggiori nel momento in cui queste basse temperature arrivano alla ripresa vegetativa, con cellule fortemente idratate, con organi vegetali rigonfi e in ripresa metabolica, quando quindi la pianta si è risvegliata, si è de-acclimatata ed è più sensibile a queste basse temperature.

Di seguito sono riportati i principali i meccanismi che la pianta mette in gioco per fronteggiare in maniera diretta le temperature che oltrepassano lo zero.

- ***Evitamento del congelamento***

Permette di ritardare la formazione del gelo intercellulare e di bloccare quello che già si è formato. I processi che contribuiscono all'evitamento sono principalmente 3 come affermato da (Román-Figueroa et al., 2021):

- 1) Presenza di altri fluidi all'interno della pianta possono abbassare il punto di congelamento
- 2) Sopraraffreddamento dell'acqua
- 3) Presenza di proteine antigelo: vengono assorbite dai cristalli di ghiaccio ed evitano la migrazione di acqua dall'interno all'esterno della cellula. Inoltre, evitano la ricristallizzazione (questo aspetto verrà approfondito nel paragrafo successivo).

- ***Tolleranza al congelamento***

La pianta la mette in atto per cercare di sopravvivere anche in presenza di gelo; quindi, in questo caso parleremo di piante tolleranti e non sensibili.

Questo gelo si forma nell'apoplasto (via di passaggio dell'acqua tra le pareti cellulari di diverse cellule).

La tolleranza al congelamento, sempre secondo (Román-Figueroa et al., 2021), viene messa in atto dalla pianta con la trasformazione di alcuni lipidi e proteine nelle membrane per aumentarne la stabilità e l'integrità, permettendo una maggior resistenza nel caso in cui si dovesse formare del ghiaccio. Normalmente, i lipidi di membrana cambiano e si registra un alto contenuto di acidi grassi insaturi sotto stress a bassa temperatura. D'altra parte, si verifica un accumulo di soluti a bassa massa molecolare, come zuccheri solubili, polioli, amminoacidi e altri agenti crioprotettivi che verranno illustrati nel capitolo successivo; i loro livelli aumentano all'interno delle cellule, il che riduce la disidratazione della cellula dovuta alla migrazione dell'acqua verso gli spazi extracellulari.

Oltre a questi meccanismi, un ruolo importante per la protezione dal gelo è svolto dai **nutrienti**:

questi sono importanti per cercare di contrastare il freddo e i suoi danni e, sono riconducibili a Na, Ca e K. Di questi, l'azoto ha un ruolo marginale nella protezione. Al contrario, chi invece gioca un ruolo fondamentale è il potassio K.

Il **potassio** è un componente importante del meccanismo di chiusura idrodinamica degli stomi. Quindi, un livello adeguato di potassio è necessario per regolare la conduttanza stomatica e la fissazione della CO₂, tra gli altri processi cellulari, i quali sono influenzati anche da basse temperature. La carenza di potassio limiterebbe la chiusura stomatica e quindi promuoverebbe la traspirazione dell'acqua; ciò favorirebbe la disidratazione cellulare.

Inoltre, il punto di congelamento aumenta perché la quantità di soluto all'interno della cellula diminuisce. Di conseguenza, l'integrazione di potassio potrebbe migliorare la tolleranza alle basse temperature perché un'elevata quantità di soluto riduce la temperatura di congelamento dell'acqua. Tuttavia, la funzione del potassio è intracellulare, quindi il suo ruolo, piuttosto che ridurre il punto di congelamento, consiste nel prevenire la disidratazione cellulare perché aiuta a mantenere l'aggiustamento osmotico. Inoltre, il potassio può anche migliorare la fluidità e la stabilità della membrana.

Anche il **calcio** svolge un ruolo importante nel fornire alle piante tolleranza alle basse temperature, sebbene il suo meccanismo d'azione rimanga poco chiaro. In ogni caso, l'aumento della quantità di Ca applicato induce la chiusura degli stomi che evita la disidratazione delle foglie e rinforza le membrane cellulari perché il Ca si lega ai lipidi e alle proteine nelle membrane, evitando la fuoriuscita di soluti (Román-Figueroa et al., 2021).

In conclusione, un buono, se non ottimale, stato nutritivo delle piante può favorire una maggior resistenza sia al freddo che alla formazione di ghiaccio.

3.2.3 *Proteine antigelo*

Sono il meccanismo principale per evitare la propagazione del ghiaccio. Sono proteine che vanno a legare il ghiaccio e vengono assorbite dai cristalli per prevenire la disidratazione e quindi ridurre l'impatto del danno.

Le proteine antigelo (AFPs - Antifreeze Proteins) e le glicoproteine antigelo (AFGPs - Antifreeze Glycoproteins) raggruppano diverse tipologie di molecole che sono diverse per quanto riguarda la struttura, ma hanno la stessa funzione: inibire la crescita del ghiaccio e la ricristallizzazione.

Per ricristallizzazione si intende il fenomeno di rottura del ghiaccio a seguito di scongelamento che provoca danni meccanici ai tessuti (Román-Figueroa et al., 2021).

Per questa loro caratteristica, vengono sintetizzate da tutti quegli organismi che vivono a stretto contatto con un clima freddo: pesci, batteri, lieviti, piante e insetti. Le AFPs agiscono direttamente sul processo di cristallizzazione, impedendo alle molecole d'acqua di legarsi al cristallo di ghiaccio in via di formazione. Infatti, il processo di nucleazione richiede maggiore energia quando il germe cristallino è ricoperto dalle AFPs. In questo modo, tutte le AFPs abbassano la temperatura di congelamento dell'acqua senza influenzare la temperatura di fusione del ghiaccio (isteresi termica). (Scaglione, 2016).

CAPITOLO 4

“MACROMOLECOLE NELLE PIANTE”

In natura, esistono le cosiddette macromolecole, le quali sono elementi fondamentali per formare tutte le strutture cellulari e per permettere la vita delle piante e organismi in generale.

Di seguito si entrerà nel dettaglio di quelle molecole organiche accennate in precedenza e che fungono da crioprotettori nelle piante.

4.1 Carboidrati

I carboidrati vengono prodotti dalle piante tramite fotosintesi clorofilliana e sono fondamentali per respirazione, crescita e costituzione delle riserve nella pianta, le quali sono di fondamentale importanza per contrastare le basse temperature.

Si possono dividere i carboidrati in **strutturali** e **non strutturali**: i primi sono i costituenti della cellula e, in particolare, della parete cellulare, mentre i secondi, suddivisibili in solubili e insolubili (amido), intervengono nel metabolismo.

I solubili sono i responsabili anche di funzioni energetiche, di trasporto e di risposta a stress termici come le basse temperature.

I carboidrati sono prodotti tramite la fotosintesi e per questo sono trasportati per via floematica.

Nelle specie appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae*, di cui fa parte il pesco, come carboidrati principali si riscontrano **saccarosio** e **sorbitolo**, mentre nell'olivo i rappresentati principali sono **mannitolo**, **saccarosio**, e **oligosaccaridi affini al raffinose** (Gucci & Masia, 2014).

4.1.1 Saccarosio

Composto da una molecola di α -D-glucosio e una molecola di β -D-fruttosio, il saccarosio è legato da un legame glicosidico tra il carbonio 1 anomero del glucosio e il carbonio 2 anomero del fruttosio.

La condensazione delle due unità monomeriche, con l'eliminazione di una molecola d'acqua, forma il legame 1,2-glicosidico che costituisce il disaccaride. Zucchero la cui sintesi inizia dal fruttosio-6-fosfato (F-6-P) e continua grazie all'azione di due enzimi principali: saccarosio-

fosfato sintasi (SPS) e la saccarosio-fosfatasi. Il primo enzima aumenta la sua attività con l'aumentare delle dimensioni delle foglie; quindi, eventuali danni dovuti al freddo eccessivo o in generale un qualsiasi danneggiamento della struttura della foglia, comporterebbe una ridotta presenza di questo carboidrato nella pianta di pesco.

4.1.2 Sorbitolo

Insieme al saccarosio è uno dei due carboidrati di riferimento per la famiglia delle *Rosaceae* e quindi del pesco. E' un alcol zucchero a 6 atomi di carbonio che deriva dal glucosio che ha subito riduzione del gruppo aldeidico in gruppo alcolico; la cui sintesi avviene nel citosol e in competizione con quella del saccarosio: questo significa che, nella foglia matura, man mano che aumenta la produzione del sorbitolo, di conseguenza si riduce la quota di saccarosio.

4.1.3 Mannitolo

Il mannitolo è un isomero del sorbitolo, quindi un alcol zucchero, ma diverso da esso: le due molecole differiscono solo nell'orientamento del gruppo ossidrilico sul carbonio 2.

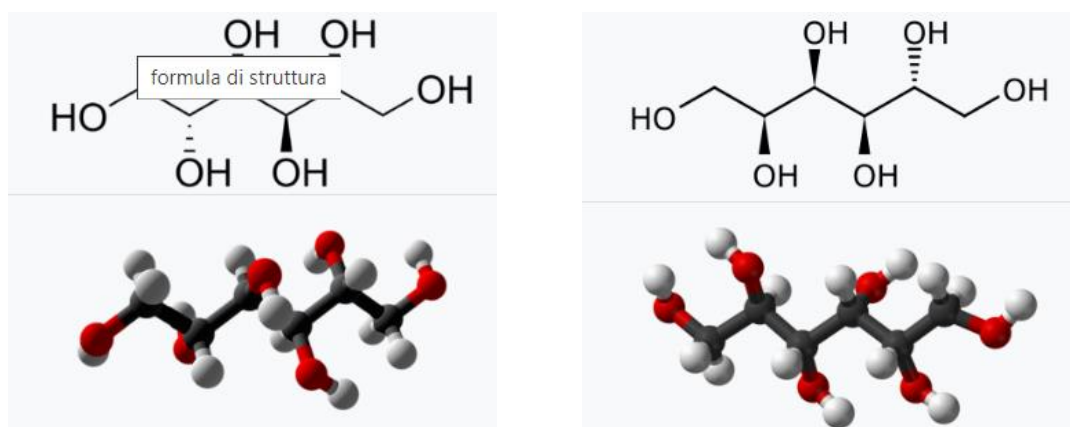


Figura 4: Struttura del mannitolo (sx) e sorbitolo (dx) (Wikipedia)

4.1.4 Raffinosio

Il **raffinosio** è un trisaccaride α -galattoside, chiamato anche oligosaccaride della serie del raffinosio (RFO). Il raffinosio, può essere immaginato come una unità formata da saccarosio alla quale è condensata una unità dell' α -anomero del galattosio sull'idrossimetile (C-6) dell'unità di glucosio.

Il raffinoso è idrolizzato a **D**-galattosio e saccarosio dall'enzima α -galattosidasi (da non confondere con le β -galattosidasi, come la lattasi), un enzima non presente nel tratto digestivo degli esseri umani, che quindi non possono digerire il raffinoso e gli altri RFO.

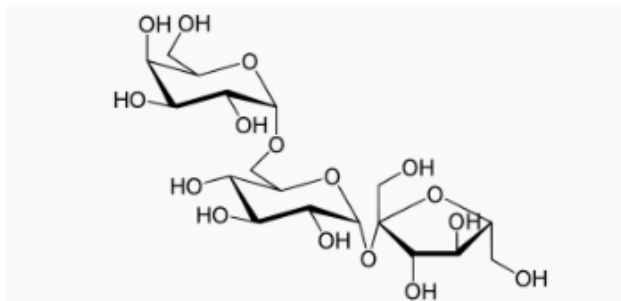


Figura 5: Struttura del raffinoso (Wikipedia)

CAPITOLO 5 “MATERIALI E METODI”

5.1 Materiali e metodi per l'olivo

Per l'olivo sono state considerate quattro cultivar per analizzare i loro diversi livelli di resistenza al freddo:

- Arbequina
- Piantone di Mogliano
- Piantone di Falerone
- Rosciola Colli Esini

5.1.1 Prelievo in campo

Per ogni varietà sono stati prelevati quattro rami di massimo due anni di età, da un singolo albero coltivato nell'azienda agraria dell'Università: Azienda Agraria Didattico-Sperimentale “Pasquale Rosati”, nell'oliveto ad alta intensità (4m x 2m), piantato nel 2012.

Prima del prelievo dei campioni, sono stati effettuati alcuni rilievi preliminari per valutare lo stato fisiologico della pianta.

Tali rilievi sono stati effettuati tramite la **Lcpro T**, strumentazione che permette di misurare il livello di fotosintesi a livello di singola foglia; è uno strumento dotato di un display in cui vengono riportati i valori presi direttamente dalla foglia della pianta. Infatti, è presente un analizzatore in cui si inserisce la foglia presa in esame, si aspetta qualche secondo per la stabilizzazione dei valori e poi si registra la misurazione.

Tramite questo strumento, oltre alla fotosintesi, sono stati misurati altri parametri fisiologici, come ad esempio Ci; E; gs e A, su 3 foglie per albero per ogni CV e ripetendo la prova per 2 volte (Tab. 1).

Questi parametri indicano:

- **Ci**, CO₂ sottostomatica, ovvero quella che si trova nella camera sottostomatica della foglia, ma che non è stata ancora organicata;
- **E**, traspirazione; prende in considerazione la quota di acqua che sta traspirando dalla foglia

- **Gs**, conduttanza stomatica; indica quanto sono aperti gli stomi
- **A**, assimilazione netta della CO₂; valore che consiste nella differenza di CO₂ che entra ed esce dalla foglia; la quota che esce, quando la foglia esegue la fotosintesi, sarà sempre minore rispetto a quella che entra. Si ha questo fenomeno perché con la fotosintesi, la foglia cattura la luce solare e la converte in energia chimica per trasformare i composti inorganici (acqua e CO₂) in composti organici altamente energetici (zuccheri).

Inoltre, si è misurato il potenziale idrico del ramo utilizzando una camera a pressione portatile per conoscere lo stato di idratazione dei tessuti.

Una volta eseguite queste misurazioni, sono stati prelevati foglie e rami, opportunamente divisi per varietà, che sono serviti in seguito in laboratorio.

	Ci ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	E ($\text{H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$)	gs ($\text{mmol H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$)	A ($\text{CO}_2 \text{m}^2\text{s}^{-1}$)
Arbequina	206,196	1,130	0,035	3,875
P. di Mogliano	193,655	1,536	0,036	3,405
Rosciola ce	254,851	1,704	0,034	2,144
P. di Falerone	168,976	1,225	0,024	2,586

Tabella 1: Media (6 misurazioni) dei parametri misurati tramite Lcpro T

5.1.2 Fasi preliminari di laboratorio

Prima dei trattamenti e delle analisi dei danni, sono stati calcolati i pesi freschi e secchi di foglie e rami, attraverso il prelievo di una porzione di ramo e tre foglie per ogni ramo di una stessa CV.

Sono stati preparati i freezer in cui sono stati effettuati i trattamenti di congelamento; quindi, sono stati portati alla temperatura voluta.

Successivamente sono stati preparati i recipienti per contenere i campioni, questi sono stati puliti con acqua deionizzata per evitare qualsiasi contaminazione esterna e poi sono stati numerati per avere una corrispondenza univoca tra campione e numero di contenitore.

5.1.3 Trattamenti

I rami prelevati sono stati sottoposti a diversi livelli di temperatura.

Trattamento 1 (-5°C)

Un ramo per ogni CV è stato sottoposto, per un tempo di 30 minuti ad una temperatura di -5°C.

Nella realtà dei fatti, la temperatura impostata non era proprio di -5°C ma inclusa in un range dai -4°C ai -6°C (Fig. 6), nel dettaglio, prendendo il tempo ogni 10 secondi, la temperatura media è stata di $-5,6^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Una volta messo il ramo nel freezer si è abbassata la temperatura partendo da 8°C in modo da far diminuire la temperatura nell'ambiente circostante e non posizionare il ramo alle temperature di congelamento all'istante (Fig. 6); si è scelto questa metodologia per cercare di ambientare, anche se per pochi minuti, il ramo alla condizione di freddo.

Appena raggiunta la temperatura di trattamento, sono stati misurati i 30 minuti e, una volta trascorso tale tempo, i campioni sono stati rimossi dal freezer.

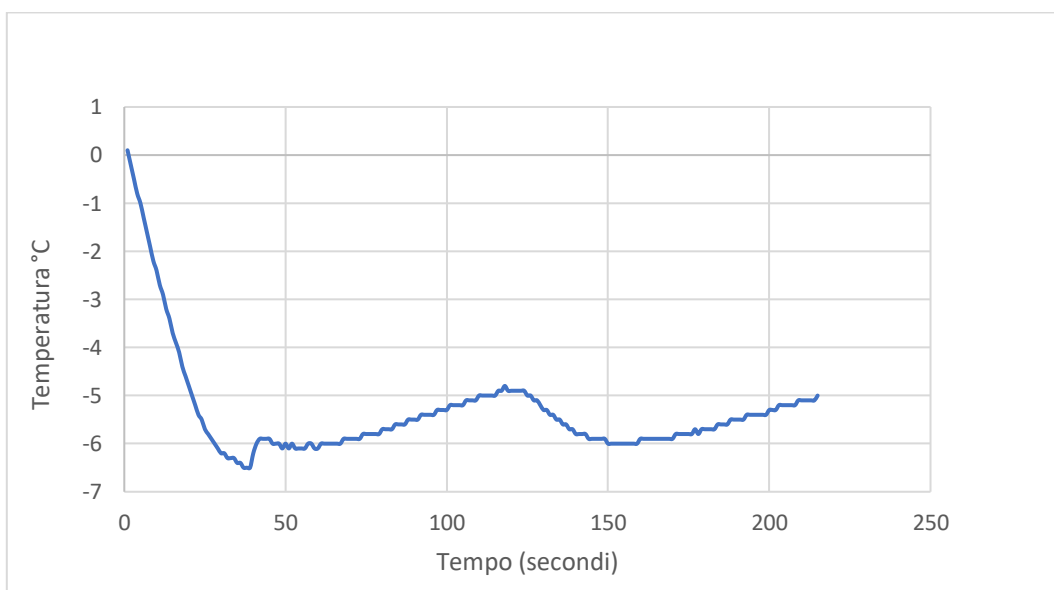


Figura 6: Andamento della temperatura nel trattamento 1 (-5°C).

Trattamento 2 (-10°C)

Il procedimento è lo stesso del precedente, quindi, un ramo per ogni varietà è stato messo in freezer, ma ad una temperatura di -10°C . Anche in questo trattamento si è posizionato il ramo nel freezer ad una temperatura di 8°C , per poi farla diminuire gradualmente fino al raggiungimento della temperatura voluta, per cercare di ambientare il ramo al freddo.

Questo è il secondo livello termico a cui si è andati a valutare gli eventuali danni da freddo.

Anche in questo caso la temperatura non è stata di -10°C fissi, ma il trattamento è stato fatto ad una temperatura media di $-10,4^{\circ}\text{C} \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7).

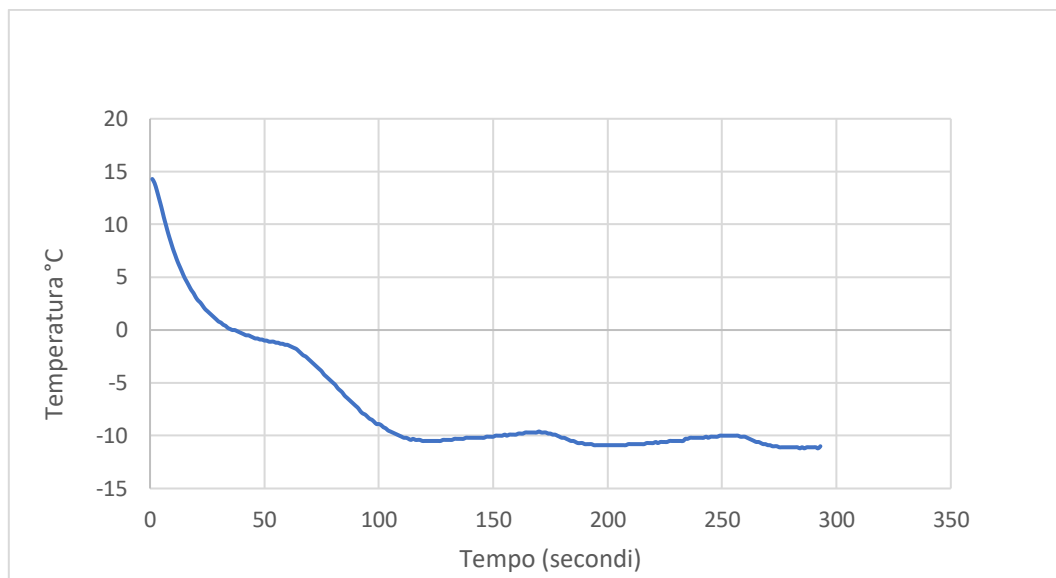


Figura 7: Andamento della temperatura nel trattamento 2 (-10°C).

Controllo (T° ambiente e -80°C)

Due controlli sono stati utilizzati: uno a temperatura ambiente e l'altro di danno massimo (-80°C).

Per ognuno sono stati presi quattro rami, uno per CV; quelli del controllo a T° ambiente non sono stati sottoposti a nessuna temperatura di trattamento, quelli a -80°C, invece, sono stati depositati in freezer a suddetta temperatura per un periodo di tempo di 45 minuti.

Da questo momento in poi, tutte le fasi sperimentali sono state eseguite seguendo il protocollo proposto da Valverde et al. (2024).

5.1.4 Prelievo dei campioni

Una volta estratti i rami dai freezer, da essi sono stati prelevati i campioni sia di foglie che di legno e depositati all'interno dei recipienti precedentemente preparati (Fig. 8).

Per ogni trattamento (-5°C e -10°C) e per i controlli sono stati prelevati porzioni di foglia e di ramo.

Foglie

Su ogni ramo sono state selezionate 3 foglie e da ogni foglia sono stati ricavati 3 dischetti di circa 5 mm di diametro evitando la nervatura centrale e che corrispondono ad un campione.

Quindi, in totale sono stati presi 48 campioni di foglie: 3 campioni di foglie per ogni CV, che sono 4, quindi $3 \times 4 = 12$ campioni di foglie ogni trattamento e controllo (temperatura ambiente, -5°C , -10°C e -80°C), ottenendo così $12 \times 4 = 48$ campioni.

Ogni campione poi è stato diluito con 20 ml di acqua deionizzata, sempre per evitare contaminazioni esterne e poste per una notte in continua agitazione alla temperatura di 10°C per prevenire la proliferazione di microrganismi all'interno della soluzione di acqua e campione.

Ramo

Sono state prelevate delle micro-porzioni di ramo in corrispondenza degli internodi per evitare la presenza di gemme.

Anche in questo caso sono state prelevate tre porzioni di rametti per ogni CV, quindi come per le foglie, sono stati utilizzati 48 campioni in totale.

Le porzioni di ramo, di 2,5 cm di lunghezza ognuna, sono state suddivise in 5 piccoli frammenti di dimensioni il più possibile omogenee.

Come per i campioni precedenti sono stati aggiunti 20 ml di acqua deionizzata e poi posti in agitatore per una notte alla temperatura di 10°C .



Figura 8: 96 campioni dell'olivo in vasetti numerati

5.1.4 Valutazione dei danni

I danni sono stati esaminati sia in maniera visiva che con determinazione digitale della **conducibilità elettrica** (electrolyte leakage), tramite l'utilizzo del conducimetro Condu70.

Valutazione dei danni visiva

Sono state prelevate 15 foglie per ogni CV e per ogni trattamento e controllo: T° ambiente (Figg. 16-17) e -80°C (Figg. 13-14); poi a -5°C (Figg. 10-11), -10°C (Figg. 12-13) e -80°C (Fig. 14-15).

Una volta prelevate e disposte su un piano sono stati assegnati, secondo un indice visivo da 1 a 3, dei valori a ciascuna foglia. Il valore 3 è stato assegnato alle foglie verdi non colpite, il valore 2 per le foglie imbrunite e quindi morte e l'1 per le foglie che presentavano delle maculature perché risultano essere colpite ma non morte completamente, definite anche esse affette (Fig. 9).

I valori sono stati affidati confrontando le foglie prelevate con le foglie di riferimento (Fig. 9).

Inoltre, è stata assegnata una percentuale di danno, sempre tramite valutazione visiva in base all'incidenza del danno rilevabile sulla foglia.

L'incidenza è stata determinata prendendo in considerazione la % di superficie fogliare chiaramente danneggiata.



Figura 9: Grado 3-2-1 delle foglie per la valutazione visiva dei danni (da Valverde et al., 2024).



Figura 10: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Magliano (dx) sottoposte al trattamento 1 (-5°C).



Figura 11: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al trattamento 1 (-5°C).



Figura 12: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Mogliano (dx) sottoposte al trattamento 2 (-10°C).



Figura 13: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al trattamento 2 (-10°C).



Figura 14: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Mogliano (dx) sottoposte al controllo -80°C.

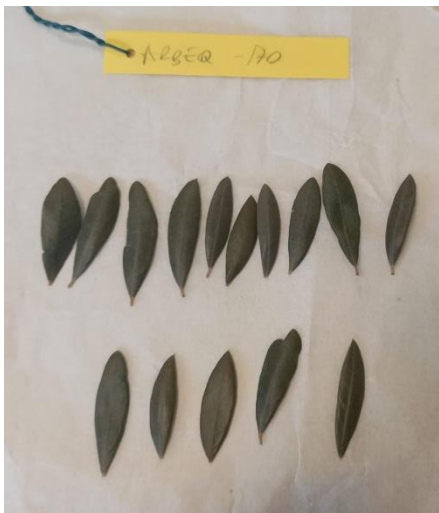


Figura 15: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al controllo -80°C.



Figura 16: Rosciola Colli Esini (sx) e Piantone di Mogliano (dx) sottoposte al controllo T° ambiente.



Figura 17: Piantone di Falerone (sx) e Arbequina (dx) sottoposte al controllo T° ambiente.

Valutazione tramite conducibilità elettrica

I 96 campioni (dischi di foglie e porzioni di ramo in soluzione acquosa) sono stati analizzati mediante conducimetro per determinare la conducibilità elettrica.

Questo strumento permette di misurare la concentrazione di elettroliti nella soluzione di acqua e campione, questi derivano dalla rottura delle cellule dei campioni.

Sono state eseguite due misurazioni di conducibilità, la prima (C₁) una volta rimossi i campioni dall'agitatore e la seconda (C₂) una volta fatti bollire in acqua per 30 minuti circa.

La bollitura è stata effettuata per essere certi di avere il 100% di danno, quindi la rottura di tutte le cellule. Detto questo, ci si aspetterà una C₂ molto più alta, in quanto l'essudato cellulare che fuoriesce con la rottura di tutte le cellule in fase di bollitura è molto maggiore di quello che esce in C₁.

Una volta misurata la C₂ abbiamo calcolato la REL, ovvero la conducibilità elettrica relativa (in inglese Relative Electrolytic Leakage) utilizzando la seguente formula:

$$REL = \frac{C_1}{C_2}$$

Questa conducibilità ci permette di visualizzare le differenze di risposta al freddo su due livelli, sia intra-varietale (foglie della stessa varietà sottoposte a temperature diverse) che extra-varietale (confronto tra varietà diverse).

5.2 Materiali e metodi per il pesco

Per il pesco sono state prese in esame due varietà, una tardiva, la Canoppe e una precoce, la Luisella.

Anche in questo caso, come per l'olivo, dopo il prelievo in campo, sono stati effettuati dei trattamenti di freddo (-2°C, -5° e -10°C) confrontati con due controlli ((temperatura ambiente e -80°C).

5.2.1 Prelievo in campo

In azienda sono stati prelevati dei rami di un anno di età delle due varietà sopra citate e in numero tale da poter garantire la realizzazione di tutti i campioni.

5.2.2 Fasi preliminari di laboratorio

Prima di eseguire i trattamenti ed effettuare le analisi dei danni, sono stati determinati i pesi freschi e secchi di foglie e rami.

Successivamente, i freezer sono stati portati alla temperatura di trattamento.

Dopo di che, sono stati preparati i recipienti per i campioni, anche in questo caso puliti con acqua deionizzata per evitare qualsiasi contaminazione esterna e successivamente numerati per avere un campione associato ad un numero in maniera univoca.

5.2.3 Trattamenti

Per il pesco, essendo una specie tendenzialmente più sensibile al freddo nel periodo pre-autunnale, è stato effettuato un trattamento intermedio tra il controllo a temperatura e il trattamento a -5°C.

Controllo (T° ambiente e -80°C)

Per il controllo sono stati presi due livelli di temperatura differenti: T° ambiente e -80°C.

Queste corrispondono rispettivamente al danno 0 e al 100% di danno; quindi saranno utilizzate solo come metro di comparazione per la valutazione dei danni tramite determinazione della conducibilità elettrica.

Trattamento 1 (-2°C)

La temperatura di trattamento è stata di -2°C. Il suo raggiungimento è stato graduale e con rilevazione termica ogni 10 secondi; quindi la temperatura media è stata di $-2,15^{\circ}\text{C} \pm 0,071^{\circ}\text{C}$; da questo punto si sono cronometrati 30 minuti (Fig. 17).

La gradualità è stata necessaria per ricreare ciò che accade in natura, perché le piante non si trovano subito a -2°C ma ci arrivano gradualmente.

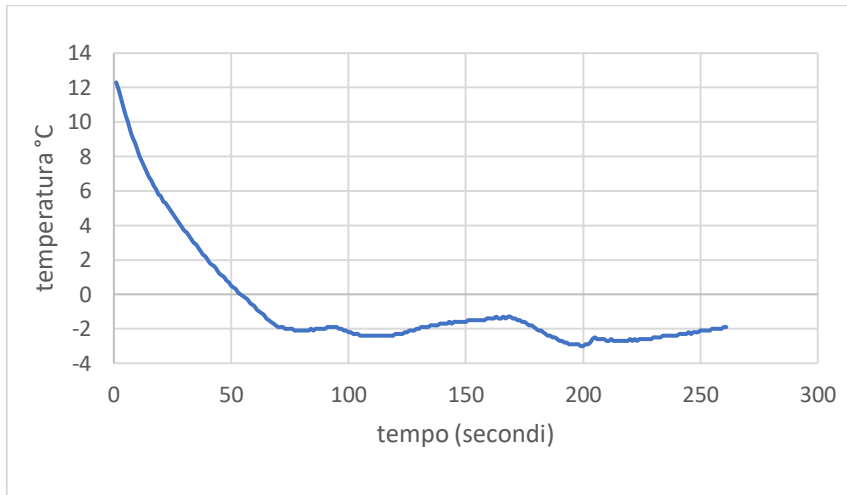


Figura 18: Andamento della temperatura nel trattamento 1 (-2°C).

Trattamento 2 (-5°C)

Questo è il secondo trattamento termico, anche in questo caso i 30 minuti sono stati cronometrati dal momento in cui sono stati raggiunti i -5°C.

Da questo deriva che la temperatura media a cui sono stati sottoposti i rami è stata di $-5,6^{\circ}\text{C} \pm 0,64^{\circ}\text{C}$ (Fig. 18).

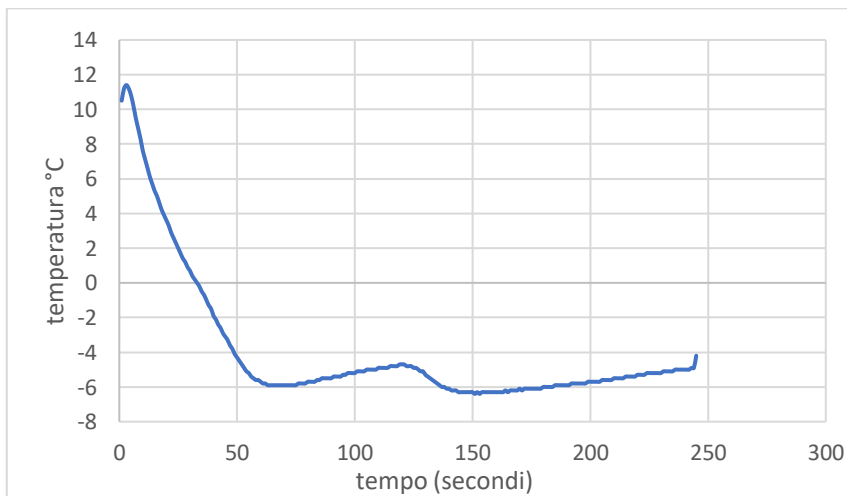


Figura 19: Andamento della temperatura del trattamento 2 (-5°C).

Trattamento 3 (-10°C)

Terzo livello di temperatura a cui sono stati sottoposti i rami di pesco delle due varietà prese in considerazione; in questo caso la temperatura media è stata di $-10,2^{\circ}\text{C} \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ (Fig. 19).

Come per i trattamenti precedenti, i rami sono stati tenuti nel freezer alla temperatura di trattamento per 30 minuti.

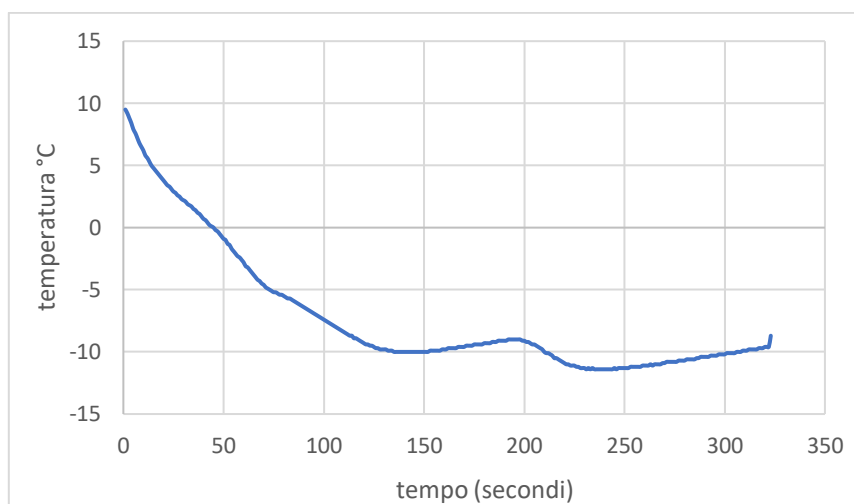


Figura 20: Andamento della temperatura del trattamento 3 (-10°C).

Da questo momento in poi, tutte le fasi sperimentali sono state eseguite seguendo il protocollo proposto da Valverde et al. (2024).

5.2.4 Prelievo dei campioni

Sono stati presi i campioni di foglie e le micro-porzioni di rami da entrambe le CV e poi sono state messe all'interno dei recipienti (vasetti) opportunamente puliti con acqua deionizzata (20 ml) e numerati.

Foglia

Sono state prese quattro foglie per CV da ogni trattamento, in tutte le foglie sono stati prelevati tre dischetti di 5 mm per costituire il campione.

In totale, per le foglie sono stati realizzati 40 campioni: 4 foglie per ogni trattamento e controllo che sono 5, quindi $4 \times 5 = 20$ campioni di foglie $\times 2$ CV = 40 campioni.

In ogni campione sono stati aggiunti 20 ml di acqua deionizzata e poi sono stati posti in agitatore per una notte ad una temperatura di 10°C per evitare la proliferazione di batteri al loro interno.

Ramo

Sono state prelevate delle porzioni di internodi di 2,5 cm in cui sono stati ottenute 5 mini-porzioni omogenee che rappresentano un campione.

Anche per i frammenti di rami sono stati realizzati 40 campioni (4 porzioni × 5 trattamenti= 20 campioni × 2 CV= 40 campioni).

Le micro-porzioni sono state poste in vasetti e poi diluiti con 20 ml di acqua deionizzata e lasciati in agitazione continua per l'intera notte a 10°C.

In definitiva, sono stati realizzati 80 campioni totali.

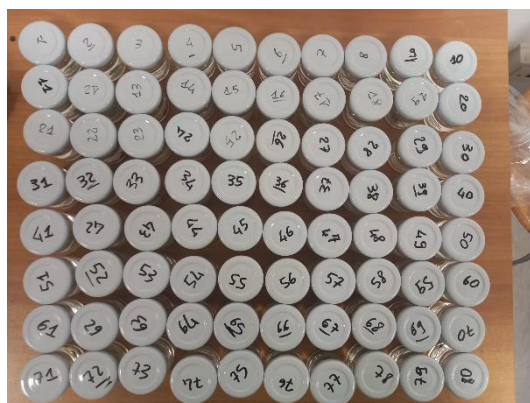


Figura 21: 80 campioni di pesce in vasetti numerati

5.2.5 Valutazione dei danni

I danni sono stati valutati attraverso due metodologie: analisi visiva e determinazione della **conducibilità elettrica** tramite conducimetro digitale Condu70.

Valutazione visiva dei danni

Sono state prelevate 10 foglie per ogni trattamento (Figg. 21-25) e poi messe a confronto visivo con 3 foglie di riferimento di grado 3,2,1: 3 per le foglie completamente verdi e non danneggiate; 2 per le foglie completamente imbrunite e 1 per quelle foglie che sono definite affette/colpite, quindi presentano maculature, arrossamenti ecc. (Fig. 9).

Questa valutazione non è stata eseguita per le foglie di controllo: temperatura ambiente (Fig.25) e -80°C (Fig. 24).



Figura 22: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento 1 (-2°C).



Figura 23: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento 2 (-5°C).



Figura 24: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento 3 (-10°C).



Figura 25: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento di controllo -80°C.



Figura 26: Canoppe (sx) e Luisella (dx) sottoposte al trattamento di controllo a temperatura ambiente.

Valutazione danni tramite conducibilità elettrica

Questa valutazione è stata eseguita tramite il conducimetro, che permette di determinare la conducibilità elettrica dei campioni presi in esame (dischetti di foglie e porzioni di ramo).

Lo strumento permette di determinare la quantità di elettroliti presenti nella soluzione che si sono liberati a seguito dei danni da freddo, dovuti a lisi cellulare con conseguente perdita di protoplasma.

La determinazione è stata effettuata due volte, quindi è stata misurata una C_1 e una C_2 , la prima in pre-bollitura, mentre la seconda in post-bollitura. La bollitura è stata eseguita per 30 minuti per raggiungere il 100% di danno.

Una volta determinati i valori è stata applicata la seguente formula

$$REL = \frac{C_1}{C_2}$$

per definire la Relative Electrolyte Leakage (REL).

CAPITOLO 6

“RISULTATI E DISCUSSIONI”

6.1 Dati rilevati su olivo nelle fasi preliminari di laboratorio

In laboratorio, come prima cosa, tramite essiccazione in stufa si è determinato il contenuto d'acqua dei campioni (Tabb. 2-4).

	Peso fresco foglia (g)	Peso fresco ramo (g)	Quantitativo di acqua foglia (g)	Quantitativo di acqua ramo (g)
Arbequina	0,14316	0,03392	0,06734	0,01394
P. di Mogliano	0,11424	0,04738	0,047375	0,020752
Rosciola ce	0,03392	0,0326	0,06022	0,01338
P di Falerone	0,13122	0,0637	0,0595	0,02832

Tabella 2: Peso fresco delle foglie (media di 12 foglie per ogni CV) e del ramo (media 4 porzioni di ramo per ogni CV) di olivo e relativo quantitativo di acqua in foglie e rami freschi.

	Peso secco foglia (g)	Peso secco ramo (g)
Arbequina	0,076	0,020
P. di Mogliano	0,067	0,027
Rosciola ce	0,078	0,019
P di Falerone	0,072	0,035

Tabella 3: Pesi secchi di foglie (media di 12 foglie per ogni CV) e rami (media di 4 porzioni di ramo per ogni CV).

	% acqua foglia	% acqua ramo
Arbequina	46,81	40,84
P. di Mogliano	41,32	43,95
Rosciola ce	43,46	41,02
P. di Falerone	45,31	43,94

Tabella 4: % di acqua in foglie (media di 12 foglie per ogni CV) e rami (media di 4 porzioni di ramo per ogni CV).

Dai dati si evidenzia che in tutte e quattro le CV di olivo prese in considerazione, il ramo ha un minor contenuto in acqua. Questo indica che in tale porzione, le cellule hanno la parete con un

maggior quantitativo di lignina e quindi, il ramo, dovrebbe essere meno sensibile al freddo rispetto alle foglie che corrispondono alla parte non legnosa della pianta e quindi hanno la parete meno lignificata.

6.2 Risultati olivo

6.2.1 Danni visivi

Danni determinati dai trattamenti indotti (-5°C e -10°C) e valutati tramite l'assegnazione visiva dei gradi 3,2,1 di 15 foglie per ogni varietà dei trattamenti -5 e -10°C.

Si è riscontrato che a livello di temperatura a -5°C tutte le foglie, di tutte e quattro le varietà, hanno un grado 3, quindi foglia verde, nervatura verde e % di danno pari a 0%.

Variazioni sono state registrate nelle foglie trattate a -10°C, in questo caso tutte le foglie hanno mostrato un grado di danno pari a 2, cioè foglia e nervatura centrale totalmente imbrunite e % di danno che si aggira tra il 100% e l'80%.

Quindi si può affermare che la valutazione visiva e colorimetrica delle foglie di olivo sono rilevanti solo alle temperature di -10 e -80°C.

6.2.2 Valutazione danni con Conducibilità Elettrica

La valutazione della conducibilità elettrica è stata effettuata sia prima che dopo la fase di bollitura.

Tutto questo è necessario per determinare il livello di resistenza delle diverse CV in base al trattamento eseguito e quindi capire quale delle quattro varietà risponde meglio al freddo in questo periodo dell'anno.

Valutazioni intra-varietale

Queste valutazioni prendono in esame i dati di una stessa CV in relazione ai diversi trattamenti; dai dati, ottenuti calcolando la media delle REL ad ogni livello di temperatura, si possono dare delle valutazioni per ogni CV.

Arbequina: per questa varietà, se si prende in considerazione la foglia, tramite le REL vediamo che tra il controllo e il trattamento a -5°C non sono state differenze significative; quindi, la foglia non ha subito danni. I danni sono stati invece visibili a -10°C e a -80°C , con differenze significative rispetto al controllo (Tab. 5, Fig.27).

ARBEQUINA FOGLIA				
Trattamento			Media	Std Dev
-80	A		0,7204	0,0153
-10	A		0,6998	0,0087
Controllo		B	0,3094	0,0525
-5		B	0,2331	0,0888

Tabella 5: REL foglia Arbequina: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

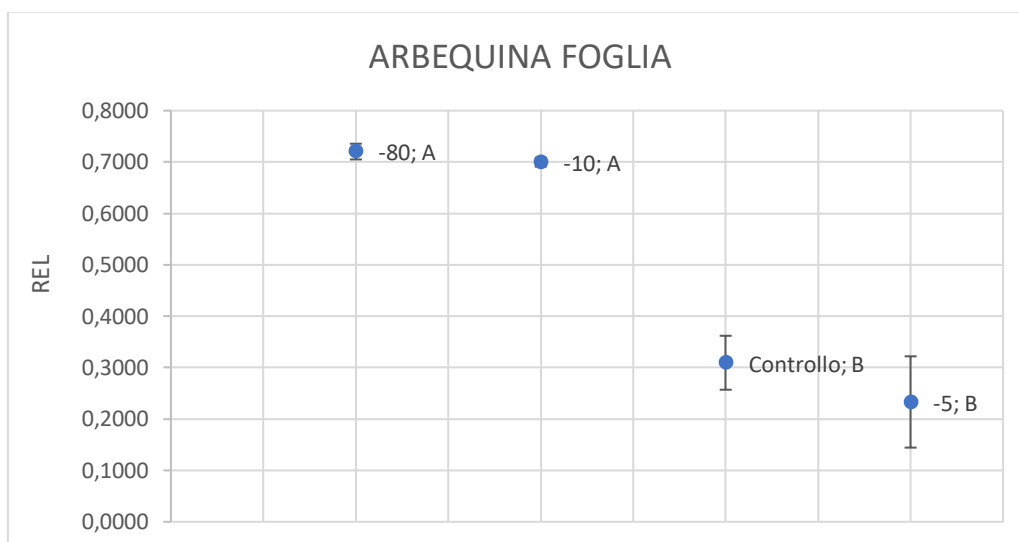


Figura 27: Grafico REL foglia: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

Per il ramo, invece, si può vedere che ci sono stati 3 livelli di risposta; tra controllo e -5°C non sono state riscontrate differenze significative. A -10°C e -80°C sono visibili due diversi livelli di risposta, questo ci indica che il frammento di ramo subisce un certo danno a -10°C e un danno ancora più grande a -80°C (Tab. 6, Fig. 28).

ARBEQUINA RAMO					
Trattamento				Media	Std Dev
-80	A			0,6464	0,0120
-10		B		0,4480	0,0071
-5			C	0,2233	0,0252
Controllo			C	0,2180	0,0080

Tabella 6: REL ramo Arbequina: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

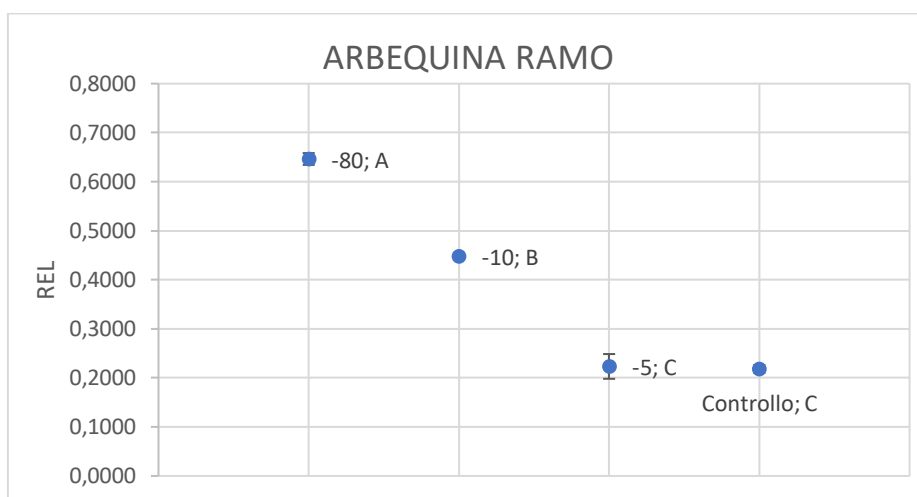


Figura 28: Grafico REL ramo: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

Dai risultati ottenuti si può affermare che il ramo ha una minor suscettibilità al freddo rispetto alla foglia. Questo può essere dovuto dal fatto che il ramo ha un minor contenuto idrico che gli permette di essere maggiormente tollerante al freddo e alle basse temperature.

Inoltre, si può dedurre che in Arbequina il limite termico a cui non si hanno danni è -10°C ; indicando che questa temperatura è la soglia alla quale poi si inizieranno ad evidenziare i danni.

Piantone di Falerone: per questa CV i dati hanno mostrato 3 diversi livelli di risposta al freddo per la foglia e 4 per il ramo.

Partendo dalla foglia, tra il controllo e il trattamento a -5°C non ci sono state differenze statisticamente significative e quindi i danni non sono stati visibili. Questo è diverso a -10°C dove i valori di REL sono diventati più sostanziali, per poi aumentare ancora a -80°C (Tab. 7, Fig. 29). Quindi la foglia del Piantone di Falerone inizia a subire danni da -5°C fino a -80°C .

P. di FALERONE FOGLIA					
Trattamento				Media	Std Dev
-80	A			0,7864	0,0545
-10		B		0,7196	0,0087
-5			C	0,2705	0,0404
Controllo			C	0,2588	0,0069

Tabella 7: REL foglia Piantone di Falerone: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

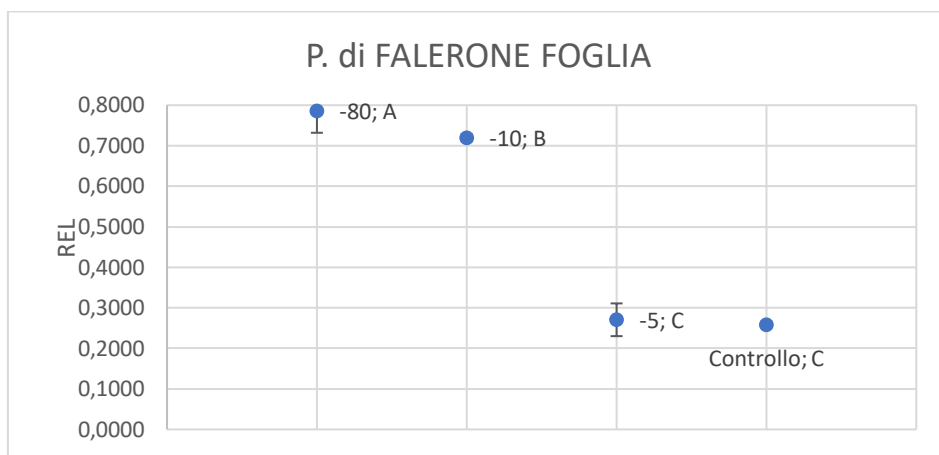


Figura 29: Grafico REL foglia: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

Per quanto riguarda il ramo si vedono 4 livelli di risposta (Tab. 8, Fig. 30), uno per ogni trattamento: il ramo di questa varietà ha subito danni da -5°C .

P. di FALERONE RAMO					
Trattamento				Media	Std Dev
-80	A			0,6143	0,0187
-10		B		0,3759	0,0055
Controllo			C	0,2138	0,0204
-5			D	0,1811	0,0041

Tabella 8: REL ramo Piantone di Falerone: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

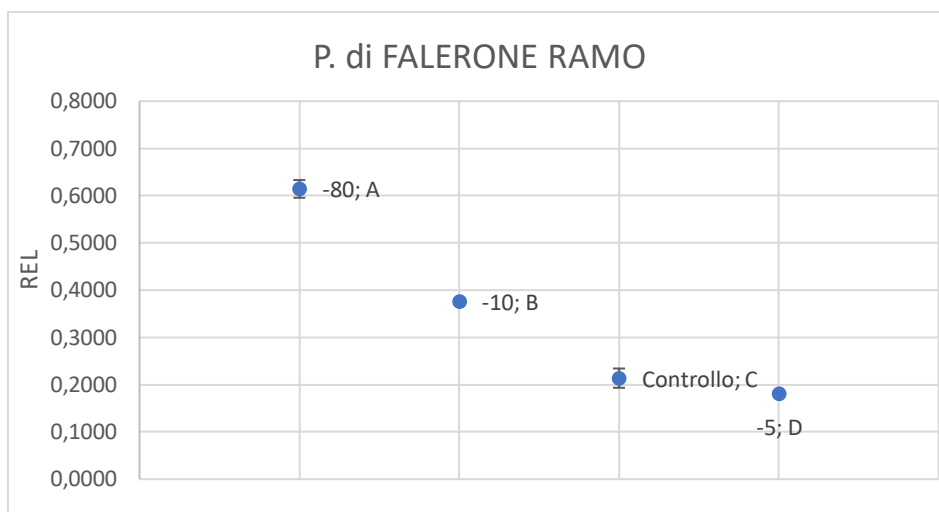


Figura 30: Grafico REL ramo: A-B-C-D indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

Piantone di Mogliano: per la foglia sono stati evidenziati 3 stadi di risposta (Tab. 9, Fig. 31) così suddivisi: tra -80°C e -10°C non ci sono state differenze significative di REL, quindi già quando si arriva a -10°C la foglia ha subito il danno massimo.

Gli altri due livelli sono a -5°C e controllo a temperatura ambiente, in questi due casi i danni iniziano a presentarsi ad una temperatura di -5°C per poi raggiungere il massimo da -10°C.

P. di MOGLIANO FOGLIA					
Trattamento				Media	Std Dev
-80	A			0,7387	0,0151
-10	A			0,7322	0,0251
Controllo		B		0,2775	0,0050
-5			C	0,2388	0,0271

Tabella 9: REL foglia Piantone di Mogliano: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

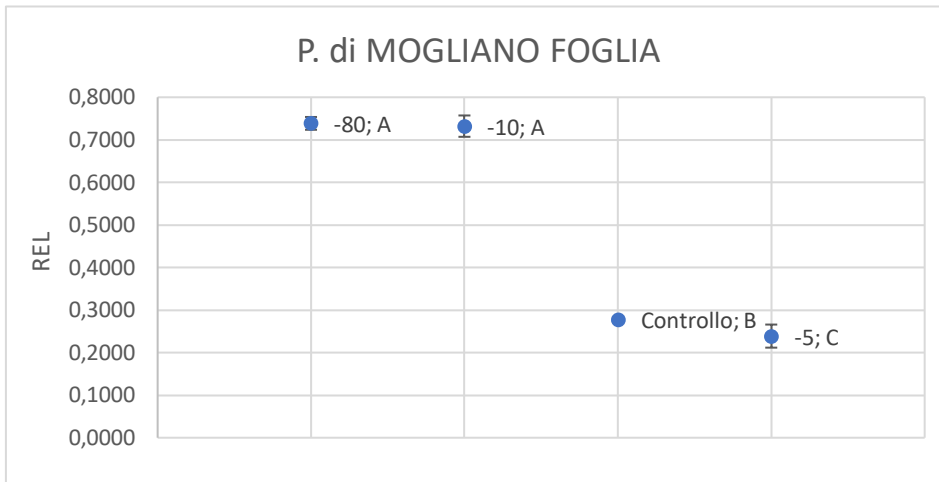


Figura 31: Grafico REL foglia: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

Il ramo come la foglia ha 3 livelli di risposta, ma la differenza è che tra il controllo e -5°C non ci sono differenze e quindi i danni non sono evidenziabili, mentre a -10 e -80°C si hanno due livelli di risposta differenti (Tab. 10, Fig. 32) che indicano la presenza di danni.

P. di MOGLIANO RAMO					
Treatmento				Media	Std Dev
-80	A			0,4957	0,0161
-10		B		0,4123	0,0103
Controllo			C	0,1933	0,0249
-5			C	0,1710	0,0246

Tabella 10: REL ramo Piantone di Mogliano: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

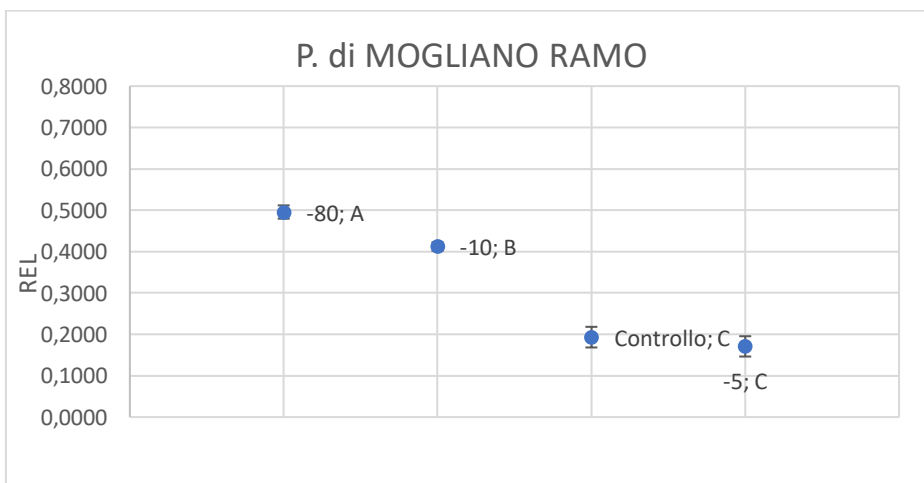


Figura 32: Grafico REL ramo: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

Per quanto riguarda il Piantone di Mogliano, si può affermare con chiarezza che il ramo è molto meno suscettibile al freddo rispetto alla foglia e che i danni iniziano a comparire al di sotto dei -10°C.

Rosciola Colli Esini: per la foglia si sono riscontrati 3 livelli di risposta (Tab. 11, Figura 33), uno stesso livello per controllo a temperatura ambiente e -5°C, mentre due differenti per -10°C e -80°C, quindi il livello termico di -10°C rappresenta la soglia alla quale si presentano i danni.

ROSCIOLA C.E. FOGLIA					
Trattamento				Media	Std Dev
-80	A			0,7101	0,0216
-10		B		0,6578	0,0096
Controllo			C	0,2641	0,0136
-5			C	0,2437	0,0058

Tabella 11: REL foglia Rosciola C.E.: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

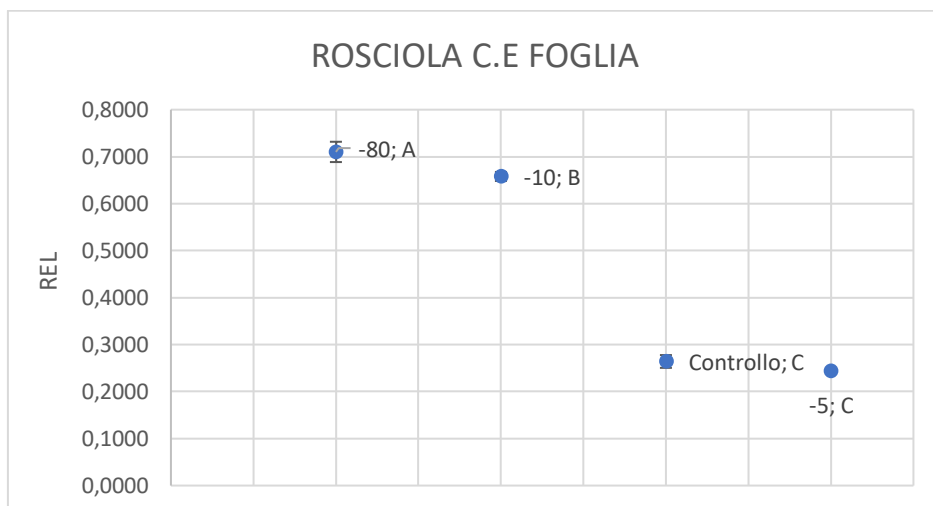


Figura 33: Grafico REL foglia: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

Per il ramo, si può fare lo stesso discorso della foglia, con 3 livelli di risposta, uno unico per controllo e -5°C e gli altri due per -10°C e -80°C (Tabella 12, Figura 34).

ROSCIOLA C.E RAMO					
Trattamento				Media	Std Dev
-80	A			0,5288	0,0381
-10		B		0,4103	0,0189
-5			C	0,2186	0,0504
Controllo			C	0,2061	0,0181

Tabella 12: REL ramo Rosciola C.E.: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

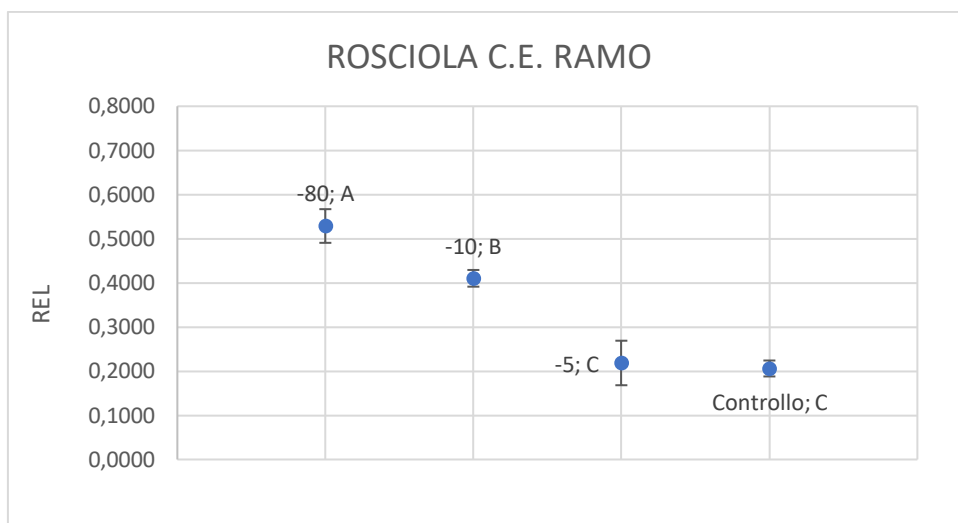


Figura 34: Grafico REL ramo: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

Valutazione tra varietà

L'analisi dei dati ha permesso anche di confrontare il livello di tolleranza delle foglie e delle porzioni di ramo nelle diverse varietà utilizzate all'interno di uno stesso trattamento di freddo.

- Trattamento 1 (-5°C) sulle foglie

Dai risultati (Tab. 13, Fig. 35) e comparando i valori ottenuti, si evince che non ci sono valori elevati di REL; quindi, i danni sulle foglie di tutte e quattro le CV non sono visibili.

Solo la varietà Piantone di Falerone è soggetta a dei valori leggermente maggiori.

FOGLIA -5°C			
CULTIVAR		Media	Std Dev
P. di Falerone	A	0,2705	0,0087
Arbequina	B	0,2331	0,0087
P. di Mogliano	B	0,2388	0,0251
Rosciola ce	B	0,2437	0,0096

Tabella 13: REL foglie a -5°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

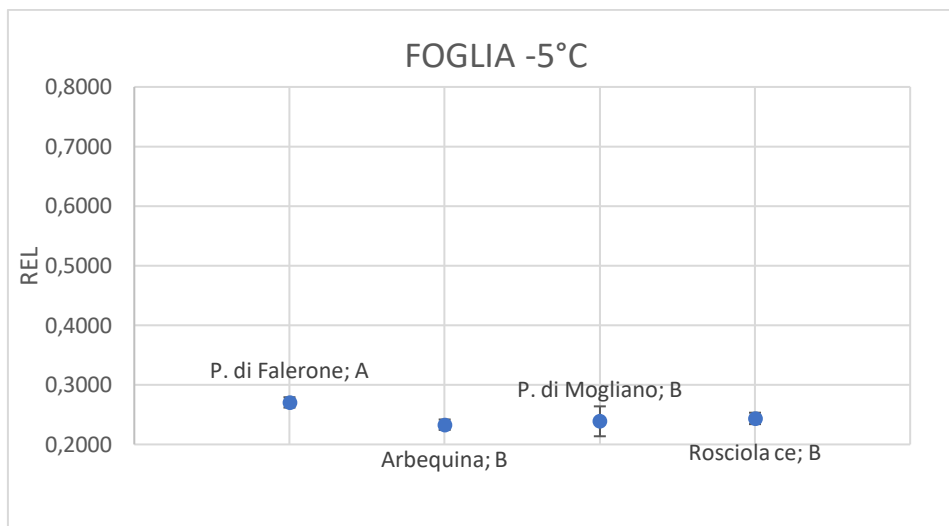


Figura 35: Grafico REL foglia -5°C: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

- **Trattamento 2 (-10°C) sulle foglie**

Le foglie delle CV prese in considerazione, hanno mostrato due sole risposte (Tab. 14, Fig. 36).

Il Piantone di Falerone, Piantone di Mogliano e Arbequina rispondono allo stesso modo, hanno delle REL maggiori e indica dei danni maggiori; allo stesso tempo Arbequina ha una risposta simile a Rosciola Colli Esini che però risulta essere la meno sensibile e quindi più resistente al freddo.

Alla temperatura di -10°C le varietà che hanno subito danno sono Piantone di Mogliano, Piantone di Falerone e Arbequina.

FOGLIA -10°C				
CULTIVAR			Media	Std Dev
P. di Mogliano	A		0,7322	0,0151
P. di Falerone	A		0,7196	0,0545
Arbequina	A	B	0,6998	0,0153
Rosciola ce		B	0,6578	0,0216

Tabella 14: REL foglia -10°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

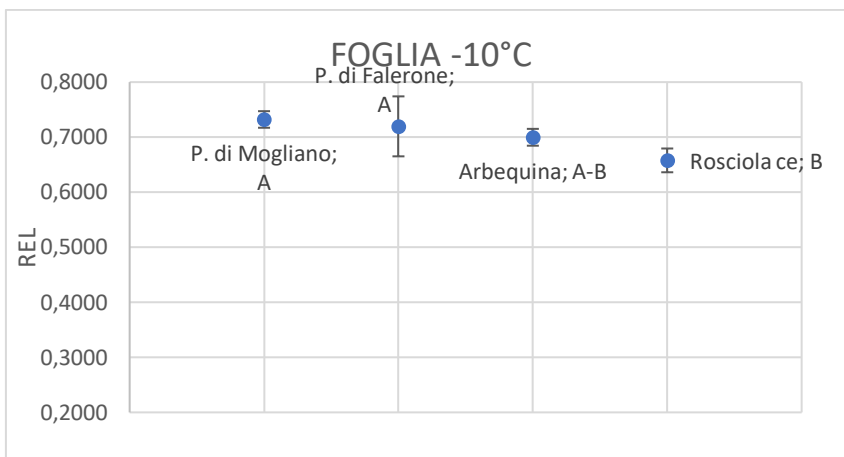


Figura 36: Grafico REL foglia -10°C: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

- Controllo -80°C sulle foglie

Per il livello di controllo -80°C tutte le CV hanno dei valori di REL molto elevati (Tab. 15, Fig. 37), e i danni sono molto elevati, soltanto le foglie di Piantone di Falerone si differenziano rispetto alle altre 3 CV, quindi hanno una sensibilità più alta rispetto alle altre tre varietà.

FOGLIA -80°C				
CULTIVAR			Mean	Std Dev
P. di Falerone	A		0,7864	0,0404
P. di Mogliano		B	0,7387	0,0050
Arbequina		B	0,7204	0,0525
Rosciola ce		B	0,7101	0,0136

Tabella 15: REL foglia -80°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

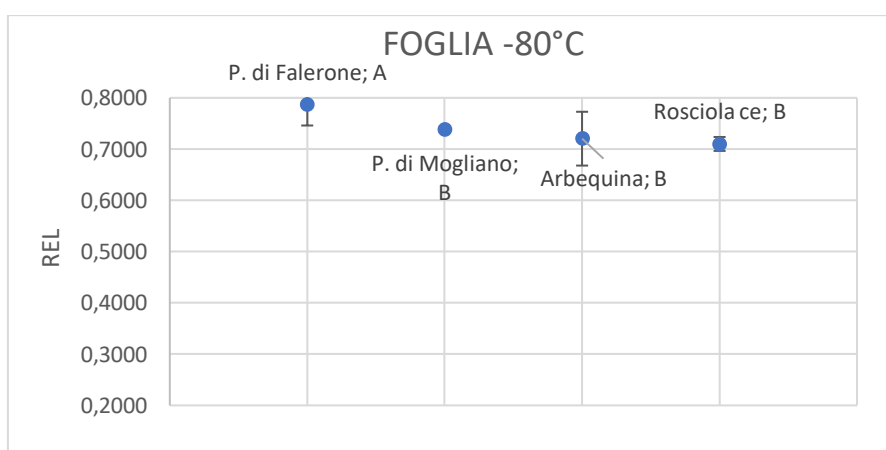


Figura 37: Grafico REL foglia -80°C: A-B indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

- Trattamento 1 (-5°C) sul ramo

Le porzioni di ramo a -5°C hanno dei valori di REL (Tab. 16) molto simili fra di loro quindi i danni sono assenti (Fig. 38).

Le risposte sono raggruppate in due livelli, Rosciola e Arbequina con valori leggermente più alti rispetto a Piantone di Falerone e di Mogliano, i quali hanno valori più bassi.

RAMO -5°C			
CULTIVAR		Media	Std Dev
Arbequina	A	0,2233	0,0071
Rosciola ce	A	0,2186	0,0055
P. di Falerone	B	0,1811	0,0103
p. di Mogliano	B	0,1710	0,0189

Tabella 16: REL ramo -5°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

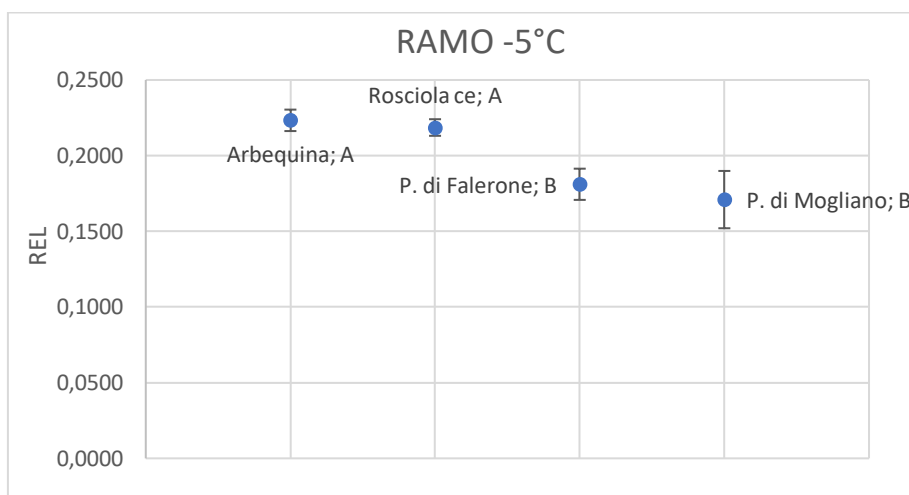


Figura 38: Grafico REL ramo -5°C: A-B indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

- Trattamento 2 (-10°C) sul ramo

I rami a -10°C hanno due risposte differenti (Tab. 17) con il Piantone di Falerone che risulta essere quello con danni minori e quindi leggermente più tollerante (Fig. 39).

In ogni caso, i danni sono presenti in tutte e quattro le CV. Questo indica che -10°C è la temperatura soglia per visualizzare i danni.

RAMO -10°C			
CULTIVAR		Media	Std Dev
Arbequina	A	0,4480	0,0120
P. di Mogliano	A B	0,4123	0,0187
Rosciola ce	A B	0,4103	0,0161
P. di Falerone	B	0,3759	0,0381

Tabella 17: REL ramo -10°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

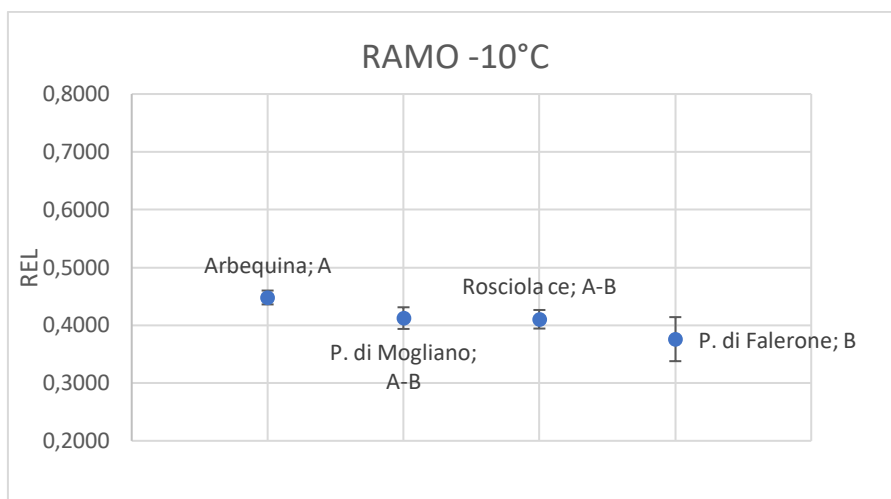


Figura 39: Grafico REL ramo -10°C: A-B indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

- Controllo -80°C sul ramo

A questo livello di temperatura si ha il livello massimo di danno, nonostante questo, si evidenziano delle differenze tra le 4 varietà (Tab. 18): Arbequina e Falerone sono quelle con danni maggiori rispetto alle altre due, Rosciola Colli Esini e Piantone di Mogliano che hanno certamente dei danni, ma minori rispetto alle due precedenti (Fig. 40).

RAMO -80°C			
CULTIVAR		Media	Std Dev
Arbequina	A	0,6464	0,0252
P. di Falerone	A	0,6143	0,0204
Rosciola ce	B	0,5288	0,0249
P. di Mogliano	B	0,4957	0,0504

Tabella 18: REL ramo -80°C: per ogni varietà si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

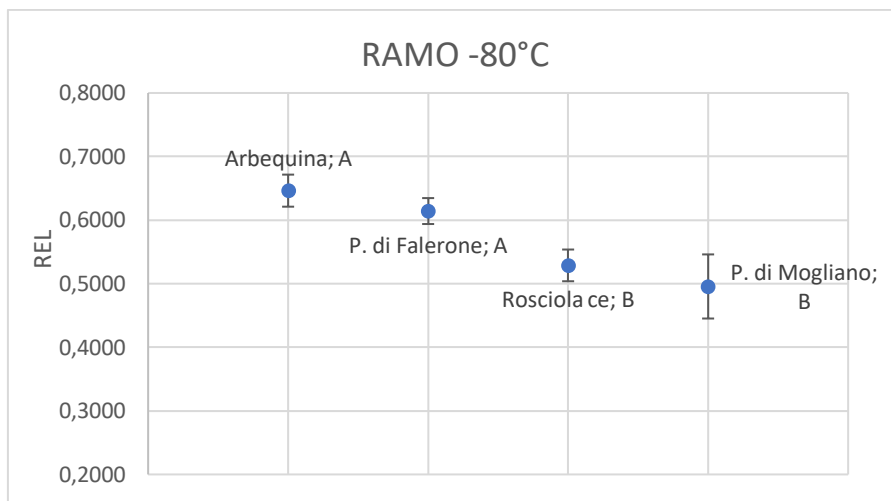


Figura 40: Grafico REL ramo -80°C: A-B indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value<0,05.

6.3 Discussione finale dei risultati per l'olivo

Dai risultati si possono dare alcune informazioni riguardanti la risposta al freddo e la resistenza delle CV prese in esame in relazione ai diversi livelli di trattamento di freddo imposto, -5°C; -10°C e i due controlli (temperatura ambiente e -80°C).

Per quanto riguardano le foglie, i danni maggiori in tutte e quattro le CV sono stati registrati in un range di temperatura che va da -80°C a -10°C.

Si può affermare questo perché dai dati e grafici realizzati in precedenza, si evidenzia che la temperatura soglia di danno è -10°C, con la temperatura di controllo e di -5° che sono livelli termici in cui le risposte e danni sono simili e quindi quasi nulli.

Per i frammenti di ramo si può dedurre che i danni a -5°C non sono presenti su nessuna CV, questi iniziano a -10°C per raggiungere il massimo, soprattutto su Piantone di Falerone e Arbequina alla temperatura di -80°C.

Questo è quello che accade durante la fase iniziale della maturazione dei frutti (settembre) a queste T°, non si esclude che nel corso dell'inverno i risultati possano cambiare sia in maniera positiva che negativa, perché in questo momento le piante non sono predisposte a fronteggiare situazioni di freddo, mentre in inverno si innescano tutti quei meccanismi, tra cui l'acclimatamento, che potrebbero confermare o alterare completamente i dati riportati in questo lavoro.

Molto probabilmente in quei trattamenti dove non si sono riscontrati i danni, nella pianta si sono attivati i meccanismi di difesa sopra descritti quali tolleranza al freddo ed evitamento del congelamento.

6.4 Discussione dati trattamenti pesco

6.5.1 Danni visivi

I risultati ottenuti per le foglie riguardo l'assegnazione di un danno secondo un indice visivo sono i seguenti:

per la CV "Canoppe" a -2°C tutte le foglie hanno un grado 3 con 0% di danno, questo ci indica che i danni non sono rilevanti;

a -5°C le foglie hanno mostrato sempre grado 3 ma con un 20% di danno in corrispondenza delle nervature che iniziano ad imbrunire; quindi, passando da una colorazione rossastra ad una bianca-panna;

a -10°C le foglie hanno mostrato un grado 2 con diversi livelli di danni, riconducibili a maculature e arrossamenti in corrispondenza dei margini fogliari, apice laminare e nervature che imbruniscono.

Per la CV "Luisella", si è osservato che a -2°C , a livello visivo, non erano presenti variazioni rilevanti;

a -5°C le foglie assumono grado 1 con arrossamenti nei margini fogliari e apice fogliare (Fig. 41);

a -10°C hanno mostrato un grado 1 ma con maculature distribuite più uniformemente.

Ovviamente non si riportano i risultati sul controllo e sul -80°C perché mostravano rispettivamente 0 e 100% di danni.



Figura 41: Arrossamenti degli apici fogliari

6.5.2 Valutazione dei danni con il metodo della Conducibilità Elettrica

Vediamo cosa succede in tutti i trattamenti, ad eccezione del controllo a temperatura ambiente e -80°C , questo perché a T° ambiente i danni sono assenti, mentre a -80°C sono massimi.

Nel caso del pesco, le valutazioni effettuate sono state solo a livello intra-varietale poiché non si sono osservate differenze di valori di REL statisticamente significative a livello extra-varietale.

Valutazione intra-varietale

- Trattamenti “Luisella”

La foglia ha mostrato 3 step di risposta (Tab. 19, Fig. 42); tra controllo e -2°C non si riscontravano valori di REL significativi, le prime risposte al freddo si sono evidenziate a -5°C per poi raggiungere il massimo già a partire da -10°C.

LUISELLA FOGLIA					
Trattamento				Media	Dev std
-80	A			0,5537	0,0071
-10	A			0,5379	0,0397
-5		B		0,3401	0,0779
-2			C	0,2233	0,0188
Controllo			C	0,2205	0,0270

Tabella 19: REL foglia Luisella: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

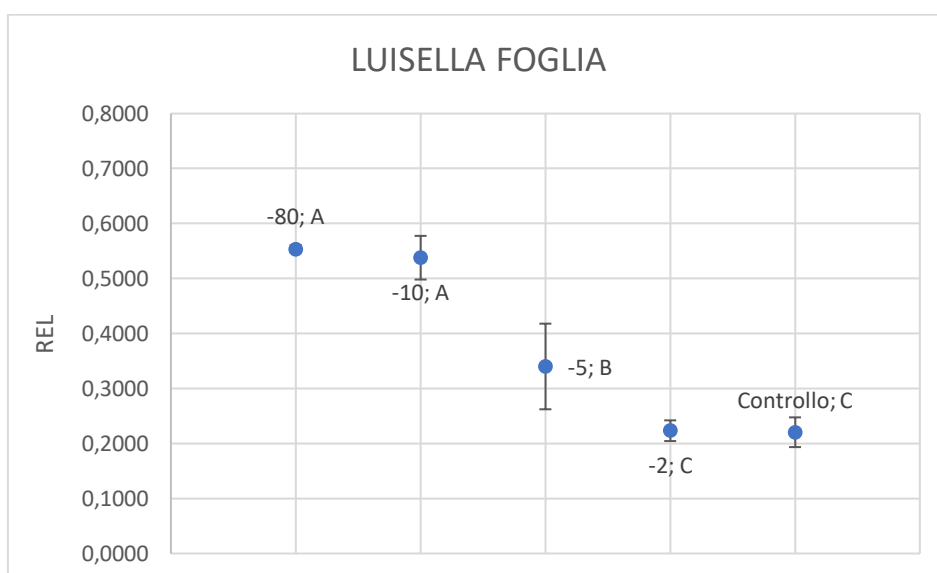


Figura 42: Grafico REL foglia Luisella: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value < 0,05.

Per il ramo, le soglie di danno sono state diverse; ci sono stati sempre 3 livelli di risposta, ma (Tab. 20, Fig. 43) i danni sono iniziati a -10°C e hanno raggiunto il massimo a -80°C.

LUISELLA RAMO					
Trattamento				Media	Dev std
-80	A			0,7774	0,0272
-10		B		0,6849	0,0380
-2			C	0,3304	0,0185
-5			C	0,3126	0,0324
Controllo			C	0,2915	0,0091

Tabella 20: REL ramo Luisella: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard.

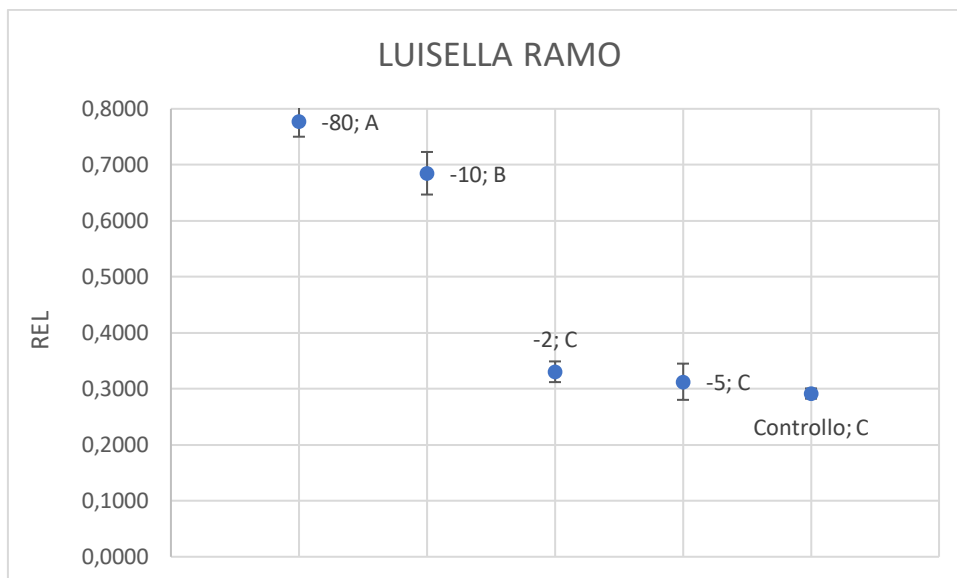


Figura 43: Grafico REL ramo Luisella: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

- Trattamenti “Canoppe”

Si possono fare due analisi differenti tra foglia e ramo:

la foglia ha avuto 3 risposte al danno (Tab. 21, Fig. 44) ripartite nel seguente modo: controllo a temperatura ambiente e -2°C non hanno differenze di REL significative e quindi nessun danno; a -5°C iniziano i danni che raggiungono il massimo già a -10°C .

CANOPPE FOGLIA				
Trattamento			Media	Dev std
-80	A		0,5648	0,0199
-10	A		0,5561	0,0176
-5		B	0,3806	0,0576
Controllo			0,2473	0,0121
-2			0,1945	0,0122

Tabella 21: REL foglia Canoppe: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

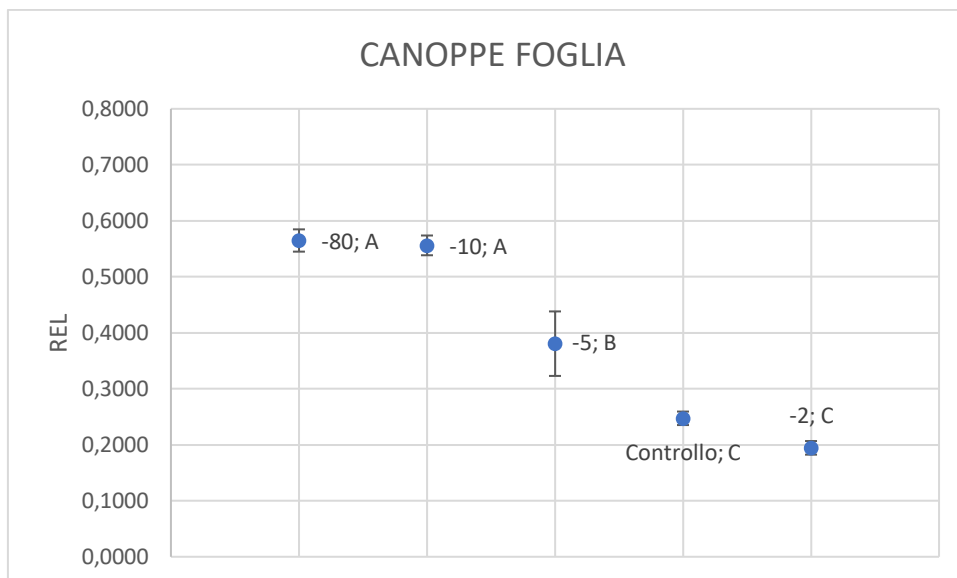


Figura 44: Grafico REL foglia Canoppe: A-B-C indicano i livelli di risposta della foglia, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student $P \text{ value} < 0,05$.

Per il ramo ci sono state sempre 3 tipi di risposte, ma ripartite diversamente (Tab. 22, Fig. 45), quindi tra controllo a temperatura ambiente, -2°C e -5°C non ci sono state differenze e i danni non erano visibili, questi si presentano a -10°C .

CANOPPE RAMO					
Treatmento				Media	Dev std
-80	A			0,7528	0,0403
-10		B		0,6421	0,0397
-5			C	0,3618	0,0444
-2			C	0,3194	0,0328
Controllo			C	0,3128	0,0569

Tabella 22: REL ramo Canoppe: per ogni trattamento si ha il livello di risposta (lettere), la REL media dei relativi campioni e la rispettiva deviazione standard

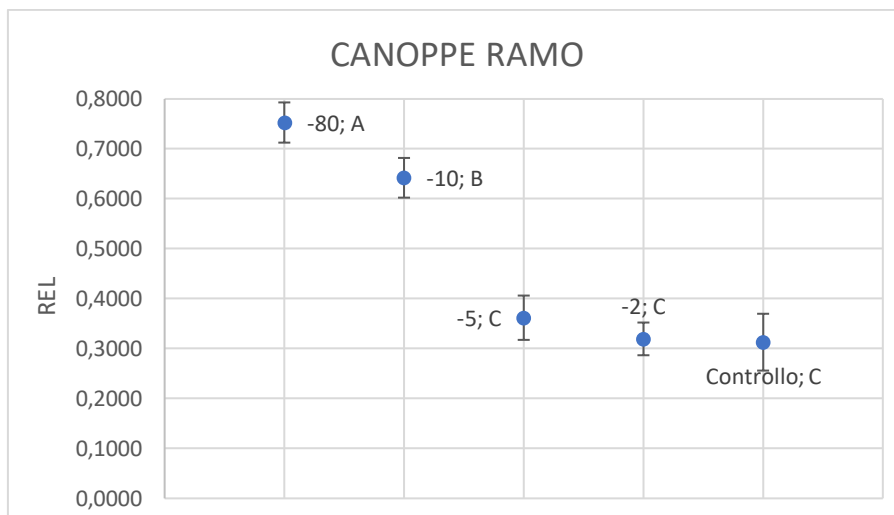


Figura 45: Grafico REL ramo Canoppe: A-B-C indicano i livelli di risposta del ramo, il punto indica la REL, le barre la deviazione standard, lettere diverse indicano medie statisticamente significativamente differenti, test T di Student P value < 0,05.

6.6 Discussione finale dei risultati nel pesco

Grazie ai dati raccolti si può concludere che in Luisella, ovvero la CV precoce, il ramo subisce danni nel range di temperatura che va da -5°C a -10°C , quindi in tutte le temperature maggiori, i danni non sono rilevabili. Questo è confermato anche dall'analisi visiva dei campioni, qua, come dette precedentemente, a -5°C iniziano gli arrossamenti, mentre a -10°C le foglie sono danneggiate.

Per le foglie, invece, il range di temperatura alla quale si iniziano a verificare i danni è tra -2°C e -5°C .

Per la CV tardiva, ovvero la Canoppe, il ramo ha un livello intermedio di temperatura alla quale iniziano a presentarsi i danni, questo è il -10°C , mentre a livelli superiori i danni non sono visibili; quindi la soglia da tenere in considerazione è tra -5°C e -10°C .

Per le foglie, il livello di danno è -5°C , quindi al di sopra di questa temperatura i danni non ci sono, mentre al di sotto, arrivano al massimo già a partire dai -10°C .

Molto probabilmente in quei trattamenti dove non si sono riscontrati i danni, nella pianta si sono attivati i meccanismi di difesa sopra descritti quali tolleranza al freddo ed evitamento del congelamento.

CONCLUSIONI

Obiettivo di questo lavoro era quello di dare informazioni adeguate a descrivere la resistenza al freddo delle due specie arboree prese in considerazione, olivo e pesco, una sempreverde e l'altra caducifoglia.

Queste analisi sono le preliminari ad una serie di valutazioni che verranno eseguite una volta al mese, per tutta la stagione invernale, per avere un'adeguata e consona raccolta dati che descriva l'intero andamento della risposta al freddo durante tutto il periodo di interesse.

Essendo i risultati di questo lavoro preliminari, fungeranno da base per le analisi successive.

Negli ultimi anni lo studio della resistenza al freddo di qualsiasi specie arborea è divenuto di fondamentale importanza, in quanto il clima è in continua evoluzione, i giorni di gelo tardivi stanno aumentando di numero, le stagioni di transizione quali autunno e primavera sono sempre meno definite rispetto alle altre. Quindi, analizzare, conoscere e sapere come funziona la tolleranza al freddo delle specie sono di ausilio per cercare di annullare o di ridurre al minimo i danni sia economici che produttivi.

Avere le conoscenze su questi aspetti è importante anche per sapere il momento o, meglio, il range di temperature in cui bisogna intervenire per la protezione delle piante e quali mezzi impiegare per raggiungere questo obiettivo.

Con questo lavoro si è cercato di dare quelle conoscenze in termini di livelli termici a cui i danni iniziano a manifestarsi e quindi in quali range di temperatura intervenire per evitare danni da freddo.

In questa fase, in cui probabilmente l'acclimatamento invernale non è ancora iniziato, nelle specie sempre verdi, come nel caso dell'olivo si è visto che temperature nel range di -5°C e -10°C non arrecano danni significativi, a differenza di quanto accaduto invece in una specie caducifoglie come il pesco.

Ovviamente, non sono sufficienti queste analisi preliminari per determinare l'acclimatamento delle piante arboree ma queste, insieme a successive prove eseguite a diversi stadi fenologici saranno sicuramente di fondamentale importanza per il raggiungimento di tale scopo.

BIBLIOGRAFIA

- Bassi, D., Mignani, I., Spinardi, A., & Tura, D. (2016). PEACH (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, 535–571. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00023-4>
- Momicchioli, F., & Mirone, P. (2004). *CnS-La Chimica nella Scuola L'ACQUA : PROPRIETÀ E STRUTTURA-I parte*.
- Román-Figueroa, C., Bravo, L., Paneque, M., Navia, R., & Cea, M. (2021). Chemical products for crop protection against freezing stress: A review. In *Journal of Agronomy and Crop Science* (Vol. 207, Issue 3, pp. 391–403). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jac.12489>
- Rugini, E., Mencuccini, M., Biasi, R., & Altamura, M. M. (2005). Olive (*Olea europaea* L.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 345–360. https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_27
- Zinoni, F., Antolini, G., Palara, U., Rossi, F., & Reggiori, G. (2005). Aspetti fisici ed ecofisiologici nella previsione e difesa delle piante da frutto dalle gelate tardive Physical and eco-physiological aspects in forecasting and crop protection of fruit trees from late frost. In *Review n. 2-Italus Hortus* (Vol. 12, Issue 4).
- AA.VV., 2012. *Arboricoltura generale*, Patrono Editore
- Pedro Valverde, Enrico Maria Lodolini, Veronica Giorgi, Maria Teresa Garcia-Lopez and Davide Neri “An easy methodology for frost tolerance assessment in olive cultivars” (2024).

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo percorso accademico mi sento di dover ringraziare alcune persone che hanno avuto un ruolo fondamentale al il raggiungimento di questo traguardo.

Come prima cosa ci tengo a ringraziare i miei genitori che mi hanno permesso di poter studiare e di portare a termine questo percorso, seppur con sacrifici e rinunce.

Ringrazio poi i ragazzi Samuele e Matteo e il Prof. Enrico Maria Lodolini che mi hanno seguito nella stesura di questa tesi.

Vorrei ringraziare Sara che mi ha supportato e sopportato in tutti questi anni, che ha ascoltato ogni mia paura, insicurezza e lamentela prima di ogni esame; La ringrazio di avermi spronato a prendere decisioni importanti che mi hanno permesso di non mollare quando invece stavo per farlo.

Ringrazio mia sorella Tamara per essere un modello e punto di riferimento per me, la ringrazio per ogni suo consiglio, per farmi vedere ogni situazione, problema da un'altra prospettiva (anche se poi faccio sempre di testa mia) cercando di farmi tirare fuori sempre il massimo da me stesso.

Ringrazio Nonna Lena, per essere un esempio di vita e per avere sempre la soluzione ad ogni mio problema.

Per finire ringrazio voi, amici e parenti, per essere qui oggi a partecipare ai festeggiamenti per il raggiungimento di questo importante obiettivo.

Grazie a tutti.

Matteo