Le cime di rapa (*Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris*) in agricoltura biologica: approcci omici mirati alla variazione nutritiva nel prodotto confezionato e nelle cimette fresche trattate con olio essenziale di lavanda.

Francesco Magnanimi[1,2], Giulio Testone[1], Anatoly P. Sobolev[1], Giovanna Serino[2], Lorenzo Pin[1], Giuseppe Scioli[1], Alice Pajoro[3], Giuseppe Arnesi[4], Zeineb Aturki[1], Donato Giannino[1]

[1] *Institute for Biological Systems, National Research Council (CNR), Rome*
[2] *Department of Biology and Biotechnology, Sapienza University of Rome*
[3] *Institute of Molecular Biology and Pathology, CNR, Rome*
[4] *Enza Zaden Italy, Tarquinia, Viterbo*

NUTRAGE
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Broccoli-rabe (*Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris*) in organic farming: omics targeted to nutritive variation in packaged product and in fresh florets treated with lavender essential oil.

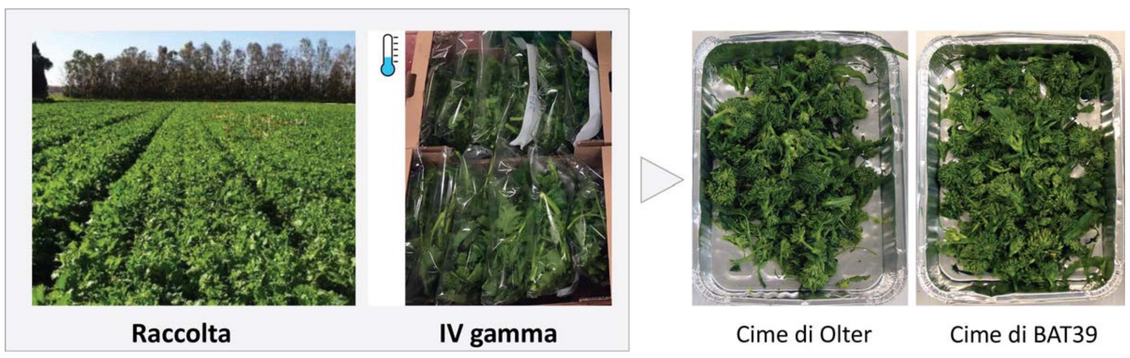
ABSTRACT

Le cime di rapa (friarielli) sono tradizionalmente consumate nell'Italia centro-meridionale e sono riconosciuti per il loro valore salutistico. È una coltura a basso input, coltivata all'aperto in cicli autunno-invernali, di cui si apprezza la «cimetta» (infiorescenza a corimbo) purché verde e dal sapore pungente. Di recente, il prodotto si è spostato dalla nicchia alla GDO come prodotto di IV gamma. In questo contesto, si compiono lavori di valorizzazione del prodotto in IVG e di ricerca di nuovi strumenti volti a ritardare l'apertura dei fiori (antesi) per evitare il tratto giallo indesiderato, e prolungare la conservazione. Sono stati allestiti due studi modello. Uno consiste nell'analisi di foglie e fiori dei genotipi "Bat" e "Olter" come prodotti di IVG rispetto a quelli del raccolto. L'altro si è concentrato su fiori di 'Bat' trattati con olio essenziale di lavanda (LEO), efficace nel ritardare l'antesi, rispetto ai controlli. I profili di circa 30 composti idrosolubili ottenuti con un approccio NMR sono stati confrontati con le reti geniche sottostanti derivate dalle analisi RNA-seq.
Per quanto riguarda la valorizzazione del prodotto, i composti includevano aminoacidi (AA), carboidrati, acidi organici e altri; il genotipo aveva un effetto minimo, il tipo di organo influiva su diversi metaboliti (ad esempio, i fiori avevano livelli di AA più elevati rispetto alle foglie), mentre lo stato aveva l'impatto più forte su tutti i gruppi, causando livelli più elevati di AA specifici e contenuti più bassi di carboidrati. Le analisi mirate all'aminoacido GABA hanno permesso di costruire una rete geni-metaboliti alla base del suo accumulo nei fiori confezionati.
Riguardo alle cimette trattate con LEO, queste presentavano livelli più bassi di vari AA, come Ile, Val, Thr, Ala, Pro, Asp e di fruttosio e glucosio, mentre i livelli di glucosinolato erano più alti rispetto ai controlli. Le variazioni dei contenuti degli AA erano coerenti con i modelli di espressione dei geni chiave che regolano il metabolismo degli AA. Le analisi omiche integrate saranno estese per costruire una rete che potenzialmente regola l'apertura dei fiori.

Subtask 2.1.1

Individuazione delle migliori matrici vegetali a elevato contenuto di composti bioattivi, metaboliti ad alto valore salutistico e funzionale.

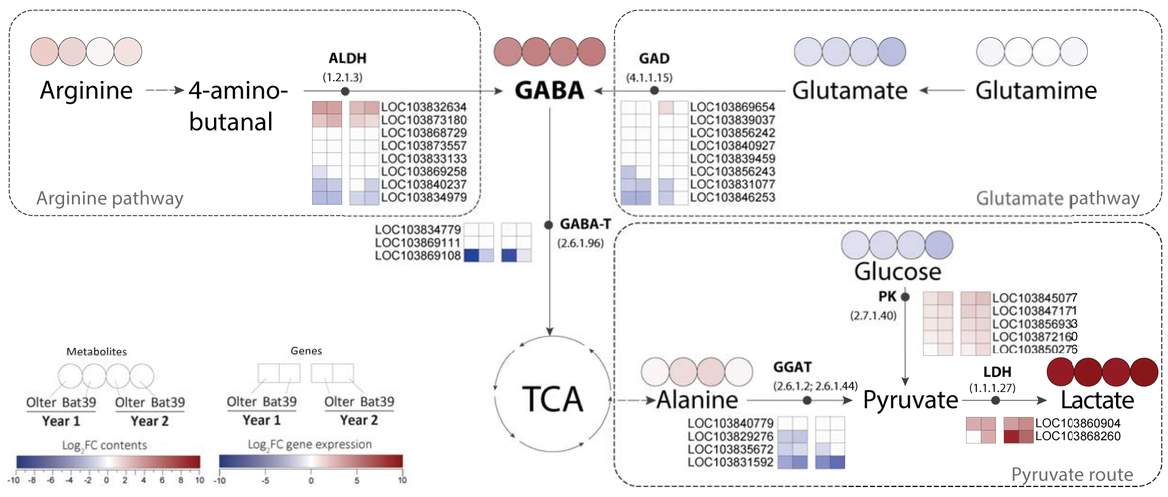
1) Modello di studio



2) Variazione del contenuto dei metaboliti idrosolubili nelle cime fresche e in IV gamma

	Ciclo 1						Ciclo 2					
	BAT39			Olter			BAT39			Olter		
Composto	**H**	**P**	**PvsH**	**H**	**P**	**PvsH**	**H**	**P**	**PvsH**	**H**	**P**	**PvsH**
Ile	0.13	0.65	388% ▲	0.18	0.55	212% ▲	0.16	185%	185% ▲	0.11	0.38	236% ▲
Val	0.29	1.42	390% ▲	0.39	1.29	229% ▲	0.4	134%	134% ▲	0.27	0.8	196% ▲
Thr	0.41	0.84	105% ▲	0.52	0.74	43%	0.27	115%	115% ▲	0.2	0.53	166% ▲
Ala	0.82	1.98	141% ▲	0.94	1.16	23%	1.31	19%	19%	0.3	0.86	187% ▲
Arg	0.96	2.59	169% ▲	0.83	1.81	118% ▲	0.72	104%	104% ▲	1.37	1.69	23%
Pro	4.61	4.51	-2%	4.99	4.14	-17%	1.9	19%	19%	1.49	1.63	9%
Gln	13.46	13.92	3%	17.32	13.59	-22%	13.11	-24%	-24%	9.63	9.55	-1%
Glu	6.49	2.86	-56% ▼	7.56	3.64	-52% ▼	3.61	-78%	-78% ▼	2.22	0.99	-56% ▼
Asp	3.08	0.7	-77% ▼	3.75	1.06	-72% ▼	2.06	-86%	-86% ▼	2.03	0.52	-74% ▼
Asn	1.18	3.18	170% ▲	1.78	2.77	56%	1.36	34%	34%	1.2	1.85	54% ▲
Phe	0.06	0.68	1133% ▲	0.07	0.57	770% ▲	0.07	550%	550% ▲	0.05	0.38	630% ▲
His	0.69	0.69	0%	0.72	0.7	-2%	0.64	10%	10%	0.73	0.74	2%
GABA	0.23	8.11	3478% ▲	0.23	5.58	2309% ▲	0.13	3745%	3745% ▲	0.09	2.78	2837% ▲
TOT.AA	**32.41**	**42.13**	**30%**	**39.26**	**37.59**	**-4%**	**25.73**	**2%**	**2%**	**19.69**	**22.69**	**15%**
SA	0.12	0.91	664% ▲	0.19	0.82	329% ▲	0.1	411%	411% ▲	0.1	0.68	618% ▲
CA	7.82	9.8	25%	11.05	10.56	-4%	6.03	14%	14%	5.71	5.76	1%
MA	5.19	2.93	-43% ▼	6.73	2.98	-56% ▼	3.86	-41%	-41% ▼	2.81	1.67	-40% ▼
AKG	0.49	1.33	171% ▲	0.65	1.15	76%	0.29	179%	179% ▲	0.34	0.75	124% ▲
TOT.TCA	**13.61**	**14.97**	**10%**	**18.63**	**15.51**	**-17%**	**10.28**	**2%**	**2%**	**8.94**	**0.38**	**-96%**
GLC	6.95	1.79	-74% ▼	12.61	4.44	-65% ▼	8.05	-56%	-56% ▼	4.04	1.96	-52% ▼
FRU	11.53	2.57	-78% ▼	13.67	2.77	-80% ▼	9.49	-55%	-55% ▼	4.28	2.31	-46%
SUC	13.56	0.81	-94% ▼	13.24	1.37	-90% ▼	7.22	-77%	-77% ▼	3.9	1.64	-58% ▼
TOT.CAR	**32.03**	**5.17**	**-84%**	**39.52**	**8.58**	**-78%**	**24.77**	**-62%**	**-62%**	**12.23**	**5.91**	**-52%**
LA	0.00	1.55	154800% ▲	0.00	0.78	77533% ▲	0.01	18171%	18171% ▲	0.01	0.86	15950% ▲
QCT	0.28	0.81	186% ▲	0.16	0.42	171% ▲	0.54	150%	150% ▲	0.58	0.78	34%
ETA	0.61	0.78	27%	0.78	0.71	-9%	0.63	2%	2%	0.53	0.53	1%
CHO	1.99	2.44	23%	2.51	2.32	-8%	2.06	-4%	-4%	1.84	1.64	-11%
MET	3.02	2.45	-19%	3.92	3.89	-1%	4.92	-19%	-19%	5.42	3.47	-36%

3) Rete genico-metabolica che regola l'accumulo di GABA e acido lattico in cime di IV gamma



RISULTATI

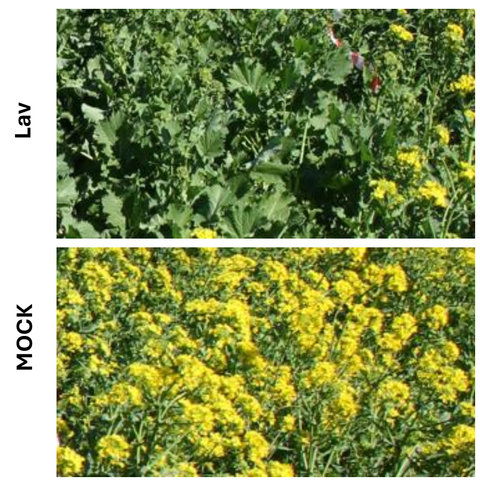
1) A seguito di due cicli colturali di due genotipi (Olter e BAT39) realizzati in pieno campo (novembre - febbraio) e regime biologico, sono state campionate le foglie (dati non presentati) e le cimette del prodotto appena raccolto, conservato come fresco (dati non presentati) e conservato in IV gamma (al 4° giorno dal confezionamento). I campioni sono stati sottoposti ad analisi di variazioni metaboliche con tecnologia NMR e di espressione genica con RNA-seq. In questo poster si riportano i principali risultati relativi alle cimette.
2) L'analisi statistica ANOVA (qui non riportata), ha mostrato che il tipo di organo (foglia vs cima) e lo status (fresco vs IV gamma) erano i fattori di maggiore impatto sulla variabilità del contenuto di aminoacidi, carboidrati, acidi organici. In tabella si riporta l'effetto dello status sulle cimette come variazione percentuale rispetto al fresco per i due genotipi e i due cicli con i trend di decremento e incremento (frecce blu e rosse). Focalizzando sull'aminoacido non proteico GABA, noto per diverse funzioni benefiche sulla salute, si osserva che il confezionato ne accumula fino a 30 volte in più rispetto al fresco, stimolando l'indagine sulla variazione di espressione dei geni coinvolti nelle vie metaboliche del GABA.
3) Mettendo in relazione la variazione dell'espressione di oltre 150 geni (in figura solo un numero ridotto) e del contenuto dei metaboliti quantificati è stato possibile costruire una rete di relazioni che spiega l'accumulo del GABA nei prodotti confezionati a seguito della repressione (quadrati blu) sia di geni della sintesi (GABA-T) che della degradazione del GABA (GGAT), con un possibile contributo di sintesi dei geni dalla via dell'Arginina (quadrati rossi, aumento di espressione).

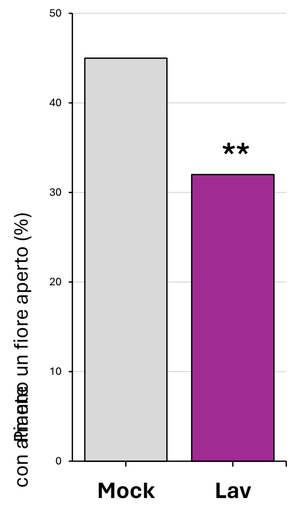
Subtask 2.1.2

Sviluppo di nuove tecnologie agronomiche per la biofortificazione dei prodotti freschi

4) Modello di studio

Trattamenti: **Mock** → Acqua + Tween80 (0.3%)
Lav → Mock **+ olio essenziale di *Lavandula officinalis* (1 ml/L)**





5) Contenuto dei metaboliti idrosolubili nelle cime trattate

	MOCK	Lav	Signif
Ile	0.35±0.02 a	0.28±0.01 b	**
Val	0.75±0.01 a	0.64±0.01 b	***
Thr	0.66±0.03 a	0.59±0.02 b	*
Ala	3.38±0.05 a	3.14±0.07 b	**
Arg	2.02±0.15	1.97±0.13	n.s.
Pro	3.97±0.58 a	2.28±0.03 b	**
Glu	4.69±0.16	4.4±0.11	n.s.
Gln	19.17±1.85	16.22±0.02	n.s.
Asp	4.15±0.19 a	3.71±0.14 b	*
Asn	2.52±0.23	2.56±0.02	n.s.
Lys	0.24±0.02 a	0.17±0.01 b	**
Phe	0.23±0.01	0.22±0.01	n.s.
His	1.1±0.09	1.08±0.03	n.s.
GABA	0.36±0.02	0.34±0.04	n.s.
TOT-AA	43.57±2.82 a	37.6±0.3 b	*

Circa gli aminoacidi (AA), il contenuto di Ile, Val, Thr, Ala, Pro, Asp e Lys è diminuito.

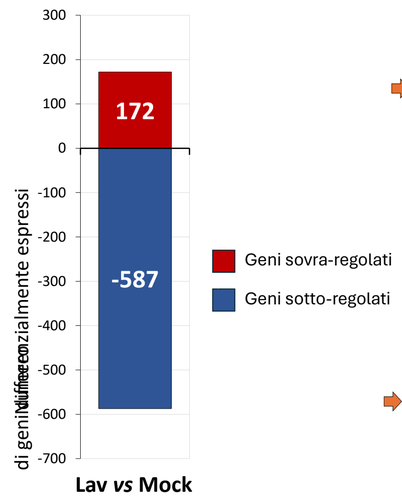
	MOCK	Lav	Signif
CA	5.04±0.45 a	3.84±0.21 b	*
SA	0.17±0.01 a	0.16±0.01 b	*
MA	8.4±0.9 a	6.35±0.05 b	*
AscA	1.94±0.77	1.56±0.6	n.s.
aKGlu	0.44±0.01 a	0.39±0 b	**
TOT-OA	15.98±2.09 a	12.29±0.44 b	*
Fru	18.82±0.64 a	14.61±0.29 b	***
Gluc	12.3±1.16 a	8.71±0.05 b	**
Suc	9.71±0.46 b	11.03±0.18 a	**
TOT- CAR	40.83±2.21 a	34.35±0.16 b	**
GLBRN	4.32±0.32 b	5.37±0.08 a	**
GLNAP	2.22±0.16 b	2.63±0.12 a	*
TOT-GLS	6.54±0.48 b	8.00±0.2 a	**

Per i carboidrati, i contenuti di FRU e GLC sono diminuiti.

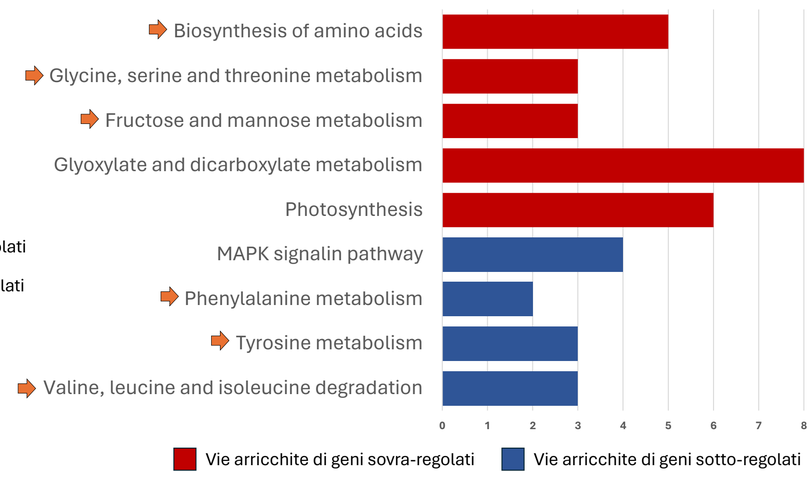
Il contenuto di glucosinolati (GLS) è aumentato.

6) Analisi di espressione differenziale in cime (Lav *vs* Mock)

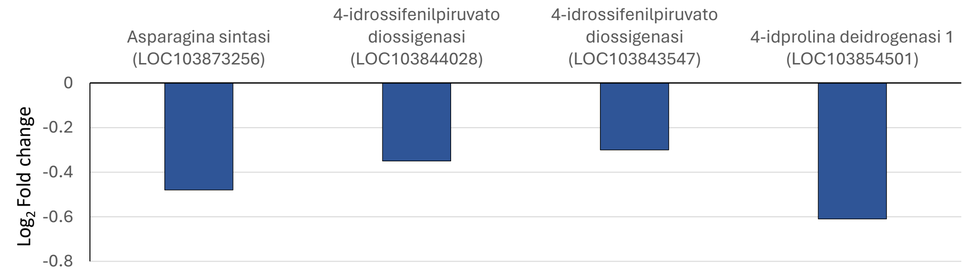
a) Numero di geni differenzialmente espressi (DEGS)



b) Vie KEGG arricchite di DEGs



c) Espressione dei geni correlati al metabolismo degli aminoacidi



RISULTATI

4) Esperimenti in serra e in campo (ripetuti per diversi cicli colturali e diversi genotipi) hanno mostrato che la somministrazione di olio essenziale di lavanda interferisce con l'apertura dei fiori, ritardandola rispetto ai controlli. In figura un esempio di trattamento con olio essenziale di lavanda a composizione certificata sul genotipo BAT39. Le cimette sono state campionate dopo il secondo trattamento e sottoposte ad analisi di variazioni metaboliche con tecnologia NMR e di espressione genica con RNA-seq.
5) L'analisi statistica sui metaboliti conferma che il trattamento ha impatto sul contenuto di aminoacidi, zuccheri e glucosinolati (metaboliti secondari che determinano il gusto pungente del prodotto) con un trend di diminuzione per le prime due classi e di aumento per la terza. I tempi di carenza dal raccolto garantiscono che il sapore delle cimette trattate non sia diverso dai controlli (basato su preliminari saggi gustativi, in corso).
6) L'analisi dell'espressione genica ha consentito di evidenziare che il trattamento altera 759 geni di cui il 77% è represso e il restante indotto (a), tra questi geni molti partecipano alle vie metaboliche (b) degli zuccheri e degli aminoacidi (frecce). In particolare, la sotto-regolazione di 4 geni coinvolti nel metabolismo deli aminoacidi nelle cimette trattate con oli è consistente con il decremento di asparagina e prolina.

CONCLUSIONI

- Il processamento delle cime da fresco a IV gamma causa una consistente perdita di carboidrati glicemici, variazioni non rilevanti del contenuto di aminoacidi tranne che per alcuni collegati allo stress (anossia e/o riduzione di ossigeno per la respirazione) e con valore salutistico (es. GABA).
- Il trattamento delle cime con olio essenziale di lavanda può ritardare l'antesi, anche se in modo contenuto (ca. -15%), alterando il contenuto di aminoacidi, da poco noti per regolare l'antesi.