



Dottorato di Ricerca XXVIII Ciclo
PRODUTTIVITÀ DELLE PIANTE COLTIVATE IN
AMBIENTE MEDITERRANEO

“TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DELLE PRINCIPALI VARIETÀ DI OLIVO
(*OLEA EUROPAEA* L.) ED OLI EXTRAVERGINE DI OLIVA SICILIANI”

Tutor: Prof.ssa Alessandra Gentile

Co-tutor: Prof. Alberto Continella

Coordinatore: Prof.ssa Daniela Romano

Dott. Francesco Scollo

2015

SOMMARIO

<u>INTRODUZIONE GENERALE: OLIVO E OLIO</u>	1
1.1. BOTANICA E TASSONOMIA	1
1.1.1. ASPETTI BOTANICI	4
1.2. IMPORTANZA ECONOMICA	6
1.3. IL PANORAMA VARIETALE	9
1.3.1. CULTIVAR SICILIANE	9
1.3.2. CULTIVAR DELLA SICILIA OCCIDENTALE	10
1.3.3. CULTIVAR DELLA SICILIA SETTENTRIONALE	10
1.3.4. CULTIVAR DELLA SICILIA CENTRO – SUD - ORIENTALE	11
1.4. CARATTERISTICHE DELL'OLIO D'OLIVA	13
1.5. SICUREZZA E QUALITÀ DEI PRODOTTI AGROALIMENTARI	13
1.6. TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DEGLI OLI EXTRAVERGINI DI OLIVA	16
1.6.1. ESTRAZIONE DI DNA DA OLIO D'OLIVA	20
1.6.2. MARCATORI MOLECOLARI IMPIEGATI NELL'OLIO D'OLIVA	25
1.6.3. MARCATORI CITOPLASMATICI: PLASTIDIALI E MITOCONDRIALI	34
1.7. BIBLIOGRAFIA	40
<u>CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CULTIVAR DI OLIVO (<i>OLEA EUROPAEA</i> L.) SICILIANE ED ESTERE CON MARCATORI MICROSATELLITI (SSR)</u>	50
2.1. ABSTRACT	50
2.2. INTRODUZIONE	51
2.3. MATERIALI E METODI	52
2.3.1. MATERIALE VEGETALE E ESTRAZIONE DEL DNA	52
2.3.2. ANALISI SSR	55
2.3.3. ANALISI DEI DATI	56
2.4. RISULTATI	58
2.5. DISCUSSIONE	66
2.6. BIBLIOGRAFIA	68
<u>INDAGINE SULLA VARIABILITÀ MORFOLOGICA INTER ED INTRA CULTIVAR DEL GERMOPLASMA OLIVICOLO SICILIANO</u>	70
3.1. ABSTRACT	70
3.2. MATERIALI E METODI	74
3.2.1. PRELIEVO DEL MATERIALE VEGETALE E RILEVAZIONE DEI DESCRITTORI MORFOLOGICI	75
3.2.2. FASI FENOLOGICHE	76
3.2.3. RILEVAMENTI IN CAMPO	77
3.2.4. MISURAZIONI E VALUTAZIONI	77
3.2.5. ANALISI STATISTICA	78
3.3. RISULTATI	82
3.3.1. ANALISI DEI PARAMETRI MORFOLOGICI: QUALITATIVI E QUANTITATIVI	82
3.3.2. ANALISI DI CORRELAZIONE	83
3.3.3. ANALISI DEI PRINCIPAL COMPONENT (PCA) E DEI CLUSTER (CA)	84
3.4. CONCLUSIONI	107
3.5. BIBLIOGRAFIA	108
<u>CARATTERIZZAZIONE GENETICO MOLECOLARE DI GERMOPLASMA OLIVICOLO SICILIANO</u>	110
4.1. ABSTRACT	110

4.2. INTRODUZIONE	111
4.3. MATERIALI E METODI	113
4.3.1. PRELIEVO DEL MATERIALE VEGETALE E ESTRAZIONE DEL DNA	113
4.3.2. ANALISI HRM CON MARCATORI MOLECOLARI PLASTIDIALI E NUCLEARI	114
4.3.3. ANALISI STATISTICA E VARIABILITÀ GENETICA	114
4.4. RISULTATI E DISCUSSIONE	121
4.4.1. ANALISI HRM CON MARCATORI MOLECOLARI PLASTIDIALI E NUCLEARI	121
4.5. CONCLUSIONI	138
4.6. BIBLIOGRAFIA	139

QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA DI DNA ESTRATTO DA OLIO DI OLIVA MEDIANTE DDPCR (DROPLET DIGITAL PCR): CONFRONTO TRA PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE E METODOLOGIE DI AMPLIFICAZIONE **143**

5.1. ABSTRACT	143
5.2. INTRODUZIONE	144
5.3. MATERIALI E METODI	146
5.3.1. ESTRAZIONE DNA DA TESSUTO VEGETALE	146
5.3.2. CAMPIONAMENTO OLIO D'OLIVA	146
5.3.3. ESTRAZIONE DI DNA DA OLIO D'OLIVA	147
5.3.4. PRIMER OLIGONUCLEOTIDI	149
5.3.5. QUANTIFICAZIONE ASSOLUTO CON QRT-PCR	149
5.3.6. QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA MEDIANTE DDPCR	150
5.4. RISULTATI E DISCUSSIONI	152
5.4.1. CONFRONTO DI PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE	152
5.4.2. QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA DEL DNA ESTRATTO E VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ	153
5.4.3. QRT-PCR, DDPCR E DILUIZIONE LIMITE	157
5.5. CONCLUSIONI	159
5.6. BIBLIOGRAFIA	169

ESTRAZIONE DI DNA DA OLIO DI OLIVA E UTILIZZO DI MARCATORI MICROSATELLITI PER LA SUA TRACCIABILITÀ **173**

6.1. ABSTRACT	173
6.2. INTRODUZIONE	174
6.3. MATERIALI E METODI	177
6.3.1. PRELIEVO DEL MATERIALE VEGETALE ED ESTRAZIONE DELL'OLIO	177
6.3.2. AMPLIFICAZIONE LOCUS <i>UBIQUITINA</i> E PRIMER PLASTIDIALI	180
6.3.3. QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA MEDIANTE QRT-PCR	180
6.3.4. ANALISI CON MARCATORI MICROSATELLITI	181
6.3.5. ANALISI DEI DATI	182
6.4. RISULTATI E DISCUSSIONI	184
6.4.1. CONFRONTO DEI PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE DI DNA DA OLIO EXTRAVERGINE D'OLIVA	184
6.5. QUANTIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO DA OLIO MEDIANTE QRT-PCR	186
6.6. ANALISI SSR MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE	188
6.7. CONCLUSIONI	200
6.8. BIBLIOGRAFIA	201

DISCUSSIONE GENERALE **204**

TAVOLE MORFOLOGICHE POPOLAZIONE CLONALE **I**

ABSTRACT

The olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most representative plants of the Mediterranean area. In Sicily, there is a wide intraspecific variability and numerous accessions triggered not just by the reproductive biology, but also by the plurality of cultivation environments that characterize the island. In this context, the extra virgin olive oil is considered one of the highest quality product both for the high economic and commercial value and for nutritional and health factors. In particular, genetic differences, together with edaphic, climatic and agronomic conditions, are one of the factors that greatly influence the sensorial and organoleptic characteristics of the olive oils produced; then, the possibility to define the origin and varietal composition represents one of the key aspects of the traceability of extra virgin olive oils via molecular methodology.

The PhD thesis was aimed at identifying the genetic differences on a wide number of olive tree accessions, through a morphological and molecular characterization of 24 accessions of three main cultivar of South-Eastern Sicily. Other objectives of the thesis have been to evaluate the efficiency of protocols for DNA extraction from extra virgin olive oil, by determining the extracted quantity and the genetic characterization of six Sicilian single-variety extra virgin olive oils. The analysis, both morphological and molecular, allowed to distinguish the main cultivars analysed as well as those accessions with intra-cultivar variability largely widespread in Eastern Sicily, opening up interesting perspectives regarding the possible applications of the results on clonal selection programs. In its entirety, the study realized via High Melting Resolution (HRM), represents the first investigation conducted on the polyclonal composition of some of the most important Sicilian cultivars, thus allowing to supply useful information for the definition of the genetic structure of the species in Sicily and for the varietal identification. The study of the genetic variability of the Sicilian olive cultivar has been parallel to the evaluation of different protocols for the extraction of DNA from extra virgin olive oils, by means of some methods of quantitative and qualitative analysis

of the DNA obtained. Quantitative and qualitative analysis have been performed via QRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR) and ddPCR (droplet digital PCR) that, combined, permitted an absolute quantification of the number of copies of the DNA of the analysed samples. The use of ddPCR, defined third generation PCR, applied for the first time on DNA in food, specifically on extra virgin olive oil, allowed an evaluation of the extraction protocols used, based on the real quality of the DNA obtained and on the evaluation of the number of copies of the amplified DNA. Molecular analysis via capillary electrophoresis (EC) of the DNA extracted from 6 single-variety olive oils with microsatellite markers was aimed at the definition of a molecular characterization protocol of the olive oil able to compare the genetic profile of the DNA extracted from the leaves of the same varieties. The extraction of DNA from extra virgin olive oil provide the basics for setting up a genetic “Identity card” of the single-variety PDO and PGI extra virgin olive oils that can be used as a supplement to the documental traceability, representing a tool of protection.

RIASSUNTO

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle piante più rappresentative dell'ambiente mediterraneo. In Sicilia, è presente con una molteplicità di accessioni e un'ampia variabilità intraspecifica, determinata non solo dalla biologia riproduttiva, ma anche dalla pluralità degli ambienti di coltivazione che contraddistingue l'isola. L'olio extravergine di oliva, in questo contesto, è considerato uno dei prodotti di maggior qualità sia per l'elevato valore economico-commerciale, sia per gli aspetti nutrizionali e salutistici. In particolare, le differenze genetiche sono uno dei fattori che contribuiscono maggiormente, insieme alle condizioni edafiche, climatiche e agronomiche, sulle caratteristiche sensoriali e organolettiche degli oli prodotti; la possibilità di definire, quindi, l'origine e la composizione varietale, rappresentano uno degli aspetti fondamentali al fine della tracciabilità degli oli extravergine di oliva mediante metodologia molecolare.

Il lavoro di tesi di Dottorato ha avuto lo scopo di identificare le differenze genetiche su un ampio numero di accessioni di olivo, mediante una caratterizzazione morfologica e molecolare di 24 accessioni appartenenti a tre principali cultivar della Sicilia Sud-Orientale. Altri obiettivi della tesi sono stati la valutazione dell'efficienza di protocolli di estrazione di DNA da olio extravergine di oliva, determinandone la quantità estratta e la caratterizzazione genetica di sei oli extravergine monovarietali di oliva siciliani. Le analisi sia di carattere morfologico che molecolare hanno permesso di discriminare le principali cultivar analizzate, nonché quelle accessioni con variabilità intracultivar maggiormente diffuse nella Sicilia orientale, aprendo interessanti prospettive per quanto riguarda possibili applicazioni dei risultati per programmi di selezione clonale. Nel complesso lo studio realizzato tramite High Melting Resolution (HRM) costituisce la prima indagine condotta sulla composizione policlonale di alcune tra le più importanti cultivar siciliane, consentendo di fornire informazioni utili per la definizione della struttura genetica della specie in Sicilia e per l'identificazione varietale. Lo studio della variabilità genetica della

popolazione clonale siciliana è stato affiancato alla valutazione di diversi protocolli di estrazione di DNA da olio extravergine di oliva, mediante l'ausilio di alcuni metodi di analisi quantitativa e qualitativa del DNA ottenuto. Le analisi quantitative e qualitative sono state effettuate mediante QRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR) e mediante ddPCR (droplet digital PCR) che, in combinazione, hanno consentito una quantificazione assoluta del numero di copie del DNA dei campioni in analisi. L'utilizzo della ddPCR, definita PCR di terza generazione, applicata per la prima volta su DNA di matrice alimentare, in particolare su olio extravergine di oliva, ha consentito una valutazione dei protocolli di estrazione utilizzati, basati sulla reale qualità del DNA ottenuto e sulla valutazione del numero di copie del DNA amplificato. L'analisi molecolare mediante Elettroforesi Capillare (EC) del DNA estratto da 6 oli monovarietali, con marcatori microsatelliti è stata finalizzata alla definizione di un protocollo di caratterizzazione molecolare dell'olio di oliva, che ha consentito di comparare il profilo genetico del DNA estratto dalle foglie con quello del corrispettivo olio, permettendo di valutare la corrispondenza dei risultati attesi. L'estrazione di DNA da olio extravergine di oliva, con un focus particolare sulle cultivar siciliane e la possibile applicazione altre tipologie di marcatori molecolari creano i presupposti della costituzione di una auspicata "Carta d'identità" genetica degli oli extravergini d'oliva monovarietali con marchi DOP e IGP da poter utilizzare come complemento alla tracciabilità documentale e che potrebbe, dunque, rappresentare uno strumento di tutela.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Prof.ssa Alessandra Gentile, mio docente guida e tutor della tesi, per avermi sostenuto ed incoraggiato durante questi tre anni di Dottorato. Inoltre, ringrazio il Prof Alberto Continella, anche nella qualità di co-tutor, per il supporto costante e durante la stesura della tesi, il Prof. Stefano La Malfa per la pazienza e il supporto scientifico durante la stesura di abstract e pubblicazioni presenti e future sul lavoro di tesi e il Dott. Gaetano Distefano per l'insostituibile aiuto e appoggio.

Un particolare ringraziamento va a tutte le persone che quotidianamente nel mondo universitario e nella sezione di Arboricoltura e Genetica Agraria del Di3A mi hanno fatto sentire parte di questa famiglia: Elisabetta, Fausta, Lory, Angela e la Sig.ra Morales. I miei colleghi di lavoro e di laboratorio, per anni passati insieme e in particolare Giuseppina Las Casas, Sergio Currò, Nicolleta Zingale e Claudia Pannitteri.

Ringrazio Pilar Hernandez e Gabriel Dorado per l'ospitalità all'IAS-CSIC (Cordoba) e il supporto scientifico durante questo anno e mezzo di collaborazione. In particolare Leticia per la sua disponibilità e amichezza, così come in Spagna e così come in Sicilia.

Un grazie al Dott. Andrea Scoto per averci aiutato nel reperimento del materiale vegetale presso il Campo di Germoplasma di Olivo di c.da Zagaria e al preside dell'Istituto Superiore I.P.S.A.A. di Palazzolo Acreide, per la disponibilità nelle micromolitura per la produzione di oli monovarietali.

Ringrazio, infine, Daniela e la mia famiglia per il grande sostegno che mi hanno dato in questi anni per arrivare alla fine di questo percorso.

Per ultimi, Andrea, Gianni e Stefano per il loro immutato sostegno fin dai tempi liceali.

LIST OF ABBREVIATIONS

%	percentuale
°	gradi
°C	gradi Celsius
AFLP	Amplified-Fragment Length Polymorphism
cpSSR	cloroplastic Simple-Sequence Repeat (microsatellite plastidiale)
ddPCR	droplet digital-PCR
HRM	High Resolution Melting
nuSSR	nuclear Simple-Sequence Repeat (microsatellite nucleare)
PDO	Protected Designation of Origin
PGI	Protected Geographical Indication
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RAPD	Random Amplification of Polyporphic DNA
SCAR	Sequence-Characterized Amplified Region
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple-Sequence Repeat (microsatellite)
T _m	Temperatura di <i>melting</i>

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE GENERALE: OLIVO E OLIO

1.1. Botanica e Tassonomia

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una tra le più antiche specie arboree coltivate nel bacino del Mediterraneo e l'unica con frutto edule tra le circa 30 appartenenti al genere *Olea* (ordine *Ligustrales*, famiglia *Oleaceae*). Originario del Caucaso (Iran), Mesopotamia e Palestina, l'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle specie arboree più antiche a livello mondiale (Bracci *et al.*, 2011) e la più importante e rappresentativa nella regione del bacino del Mediterraneo, dove si concentra il 95% della superficie coltivata (Lombardo, 2003).

Nell'ambito della famiglia delle *Oleaceae*, oltre al genere *Olea* di notevole interesse economico e ornamentale possono essere annoverati altri generi quali *Forestiera*, *Forsythia*, *Fraxinus*, *Ligustrum*, e *Syringa* (Fornaciari *et al.*, 2009). Il genere *Olea* è suddiviso in tre subgenera: *Paniculatae*, *Tetrapilus* e *Olea* (Green, 2002); all'interno della specie *Olea europaea* L., si distinguono ben sei sottospecie in relazione alle caratteristiche morfologiche e in base alla distribuzione geografica:

- subsp. *europaea*, distribuita nel bacino del Mediterraneo;
- subsp. *cuspidata*, distribuita nell'Asia sud-occidentale e nell'Africa sud-orientale;
- subsp. *laperrinei*, regione Sahariana;
- subsp. *maroccana*, presente in Marocco;
- subsp. *cerasiformis*, presente nell'Isola di Madeira;
- subsp. *guanchica*, presente nelle Isole Canarie.

La subsp. *europaea* include due varietà botaniche: *sativa* (Loudon), cui fanno parte le numerose varietà coltivate, e *oleaster* (Hoffm. e Link) Hegi o subsp.

sylvestris (Miller) Hegi, cui appartengono le forme spontanee, comunemente chiamate oleastri.

L'olivo è una specie diploide costituita da 46 cromosomi ($2n=2x=46$) (Breviglieri e Battaglia, 1954) anche se sono stati riscontrati alcuni casi di piante triploidi e tetraploidi (Bellini *et al.*, 2003). Pianta arborea sempreverde, prevalentemente allogama, propagata vegetativamente (Bracci *et al.*, 2011) che dimostra un'elevata tolleranza alla siccità e salinità, se confrontata con altre specie arboree da frutto (Gucci e Tattini, 1997). L'olivo rappresenta, infatti, la seconda coltura da olio più importante a livello mondiale dopo l'olio di palma (Bracci *et al.*, 2011) con una superficie che occupa dieci milioni di ettari, concentrati nel Mediterraneo, dove viene consumato il 70% dell'olio prodotto (Baldoni e Belaj, 2009).

Le antiche origini della coltivazione dell'olivo, nonché la facilità nella propagazione, sia gamica che agamica, hanno portato alla presenza di numerose cultivar in tutto il mondo. L'ampia variabilità genetica intraspecifica che si riscontra nell'olivo è imputata alle caratteristiche biologiche della specie, come la presenza di allogamia e autocompatibilità fiorale, in cui gli elevati livelli di etero-impollinazione conduce alla presenza di eterozigosi. In alcuni casi, si parla di cultivar-popolazione, al fine di indicare la presenza di cloni diversi all'interno di una stessa cultivar. Spesso diverse identità genetiche sono chiamate con lo stesso nome (omonimie), oppure la medesima identità genetica è chiamata con nomi differenti in diversi areali produttivi (sinonimie). Le numerose sinonimie e omonimie presenti nelle cultivar siciliane, italiane ed estere rendono difficile, però, la distinzione e l'identificazione varietale. L'olivo vanta un patrimonio genetico molto ampio, frutto di diverse mutazioni gemmarie e incroci spontanei avvenuti nel corso dei secoli; a rendere ancora più ricca la biodiversità dell'olivo è la creazione e distribuzione di variabilità senza seguire un modello morfologicamente definito, poiché l'interesse per il miglioramento e la selezione varietale sono state focalizzate maggiormente non tanto sulle caratteristiche merceologiche dei frutti, quanto in funzione delle caratteristiche tecnologiche e sensoriali degli oli. Ciò ha portato nel corso di diversi decenni alla formazione di

cultivar-popolazioni, individui che all’interno della medesima varietà si differenziano per un certo numero di caratteri morfologici e agronomici, piuttosto che alla formazione di cultivar monoclonali.

L’elevato numero di cultivar, unito ai molti casi di sinonimia e omonimia, rende tuttavia molto complessa sia la loro distinzione, descrizione e classificazione, sia la tracciabilità e l’autenticità degli oli di oliva prodotti, oltre ai problemi relativi alla gestione delle collezioni del germoplasma (Fabbri *et al.*, 2009; Chiappetta *et al.*, 2014).

Secondo quanto riporta Bartolini (2008), si annoverano circa 1,250 varietà coltivate in 54 paesi e conservate in più di 100 collezioni, incluse nella banca dati del germoplasma olivicolo della FAO; anche se molto probabilmente a causa di mancate informazioni riguardanti varietà locali ed ecotipi sconosciuti, tale numero potrebbe essere certamente più elevato (Cantini *et al.*, 1999). La maggior parte delle cultivar proviene dai paesi dell’Europa meridionale: l’Italia, in questo senso, possiede la più elevata biodiversità olivicola, annoverando oltre 600 varietà; a seguire vi sono la Spagna con 183 varietà, la Francia con 88 e la Grecia con 52 (Baldoni e Belaj, 2009). Il panorama produttivo italiano è caratterizzato dalla presenza, in coltivazione principale, di 148 cultivar, ma, come sopra detto, vi si ascrivono ben oltre 600 differenti genotipi alcuni dei quali hanno diffusione geografica così limitata da essere talvolta individuati all’interno di singole aziende. La frammentazione del panorama olivicolo italiano è determinata non solo dalla millenaria tradizione che l’olivicoltura riveste nel nostro paese e dalle particolari condizioni edafiche, ma anche dalla tormentata storia del nostro paese, diviso in una miriade di Stati fino alla seconda metà dell’Ottocento. Inoltre, non sono poche le sinonimie e le omonimie tra le diverse cultivar, che solo in parte sono state chiarite con studi di caratterizzazione molecolare del germoplasma (Las Casas *et al.*, 2014).

L’importanza economica e commerciale dell’olivo è sempre in continuo aumento, merito dei prodotti, quali olio e olive da mensa, sempre più richiesti, apprezzati e riconosciuti per le eccellenti caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche. L’olio extravergine d’oliva rappresenta uno dei prodotti più

pregiati e apprezzati dell'industria agroalimentare costituendo un importante elemento della Dieta Mediterranea (Agrimonti *et al.*, 2011) grazie alle sue caratteristiche organolettiche e per il suo contributo a una dieta sana (Wahrburg *et al.*, 2002).

1.1.1. Aspetti botanici

L'olivo è un'angiosperma sempre verde di medio sviluppo, caratterizzata da un portamento arboreo di tipo basitono. Gli esemplari si caratterizzano per un fusto con ramificazione alta e composta di germogli basali con un ritmo di accrescimento maggiore rispetto a quelli mediani e apicali. L'altezza media complessiva varia tra 4 e 8 metri, anche se in relazione all'età della pianta e al tipo di potatura adottato, possono trovarsi individui che raggiungono i 15 metri con il caule con massimo diametro prossimo ai 2 metri.

La chioma, che negli individui giovani ha forma globosa, in seguito al maggior accrescimento radiale tende ad assumere profilo emisferico. Le condizioni pedoclimatiche possono influenzare in maniera considerevole il portamento e lo sviluppo morfologico della pianta, in proporzione all'aumento delle variabili ambientali sfavorevoli all'accrescimento della specie. In funzione del naturale portamento delle ramificazioni le cultivar possono essere distinte: *assurgente o eretto* (Carolea, Tonda Iblea, Moraiolo e Barnea), *pendulo* (Nocellara dell'Etna, Nocellara del Belice e Pendolino) e *intermedio o semi-pendulo* (Giarraffa, Ascolana e Leccino).

L'accrescimento del tronco tende ad assumere, in un olivo lasciato libero di vegetare, un aspetto cespuglioso e contorto, con un avvolgimento in senso orario lungo l'asse verticale (Fiorino, 2003). Il legno è duro, pesante e compatto con un peso specifico medio di circa 925 kg/m³ (Cecchini, 1952). La corteccia, grigio-verdastra nei soggetti giovani, tende ad assumere nel tempo una colorazione grigia spesso non uniforme, si caratterizza per la presenza di profonde fessurazioni irregolari.

La porzione fotosintetizzante si compone di foglie persistenti, con durata poliennale, aventi forma ellittica o lanceolata. Le lamine hanno margine intero e consistenza coriacea; la superficie fogliare media oscilla tra i 2 e 10

cm², mentre il peso specifico per cm² tra 8-20 mg (Barone *et al.*, 1993; Proietti e Tombesi, 1996). Il ridotto volume degli spazi intercellulari presenti nei tessuti del mesofillo fogliare è una caratteristica fondamentale che evidenzia l'*habitus xerofitico* della specie.

Il palco radicale, fascicolato, analogamente alle altre piante arboree, è distinto in radici principali e conduttrici (che hanno funzione principalmente di sostegno e rappresentano il 20% circa del volume totale della frazione ipogea) e radici capillarie, di transizione e assorbenti (Fiorino, 2003).

I fiori dell'olivo sono raggruppati in infiorescenza nota anche col termine “mignola”. Il periodo in cui essa persiste, che va dalla sua emissione fino all'antesi, è detto mignolatura e dura solitamente dalla prima metà di aprile fino alla prima o seconda decade di giugno. Lo sviluppo dell'infiorescenza è piuttosto lento, occorrono dalle 4 alle 6 settimane dall'apertura della gemma a fiore alla fioritura della mignola (Lavee, 1985). L'antesi dura circa 3 giorni nell'infiorescenza e da 6 a 10 giorni nell'intero albero in relazione all'andamento climatico stagionale (Fabbri *et al.*, 2004).

L'infiorescenza, di lunghezza compresa tra 3 e 8 cm (Lavee, 1985), è formata da un asse embrionale che, in condizioni climatiche favorevoli, si accresce e fuoriesce dalle perule, abbozzi fogliari posti a protezione delle gemme. Sull'asse centrale si inseriscono poi i pedicelli dei singoli fiori, in numero variabile da 15 a circa 30 (Martin e Sibbett, 2005) in funzione delle cultivar. La mignola, inizialmente di colore verde, vira poi verso un colorito biancastro e infine giallo in prossimità della fioritura che si verifica principalmente sui rami di due anni.

L'olivo è una pianta che produce generalmente fiori perfetti, tuttavia, possono presentarsi con rilevante frequenza, anche casi in cui i fiori abbiano una evidente involuzione del gineceo (fiori andromorfi o staminiferi). I fiori ermafroditi sono generalmente formati da 4 verticilli: calice, corolla, androceo e gineceo. Il primo è costituito da 4 sepali di colore verde chiaro, mentre la corolla si compone di 4 petali bianchi. L'androceo è formato da due grossi filamenti, saldati alla corolla, sormontati da una antera deiscende longitudinalmente. Il gineceo infine consta di un ovario, esternamente

ricoperto da una epidermide monostratificata, dal quale si estende lo stilo. Quest'ultimo, generato dall'unione di 2 carpelli, se sezionato trasversalmente ha la forma di 8. Lo stimma, che ne è all'apice, è piumoso e diviso in due lobi rivestiti di cellule papillose che captano il polline trasportato dal vento (Morettini, 1972). La posizione del fiore nella mignola influenza la precocità di apertura (Cuevas e Polito, 2004) e anche il suo genere (Martin *et al.*, 2005; Cuevas e Polito, 2004), una maggiore percentuale di fiori perfetti si evince infatti a metà dell'infiorescenza e nella sua parte distale (Martin *et al.*, 2005; Ateyyeh *et al.*, 2000).

Il frutto dell'olivo è una drupa, formata da un mesocarpo carnoso e costituito da olio per il 12-25 % del peso fresco, da un sottile esocarpo protettivo e da un endocarpo legnoso, posto in posizione centrale. Le dimensioni e il peso variano per le diverse cultivar, oscillando su valori compresi tra 2-3 cm di diametro e 0,20-0,60 grammi di peso. Il processo di formazione del frutto dura 2 anni e inizia con la formazione delle gemme e la loro induzione a fiore nei primi 12 mesi del ciclo, continua quindi nel secondo anno con la differenziazione degli organi florali e la successiva fioritura. Qualora, dopo l'antesi, avvenga l'impollinazione e la relativa fecondazione, la fruttificazione procede con lo sviluppo dei frutticini e la maturazione delle drupe. Durante quest'ultima fase, la sintesi dei costituenti chimici porta al progressivo miglioramento delle qualità chimico-fisiche e organolettiche del prodotto. Fondamentale, per l'individuazione del periodo ottimale di raccolta, l'individuazione dell'arco temporale in cui si prefissa come obiettivo il raggiungimento della maggiore quantità di prodotto in relazione alla massima qualità perseguibile (Angelini, 2009).

1.2. Importanza economica

La coltivazione dell'olivo, così come la produzione di olio extravergine d'oliva, è di notevole interesse sia per l'economia rurale, sia per il patrimonio locale che per l'ambiente. Secondo il rapporto del COI (Consiglio Oleicolo Internazionale), i paesi del Mediterraneo rappresentano il 97% della coltivazione olivicola mondiale, stimata in 10.000.000 di ettari. In tutto il

mondo sono coltivati circa 800 milioni di olivi, per lo più destinati alla produzione di olio (circa il 90%) e il resto per la coltivazione di olive da tavola; si stima che ogni anno sono prodotte più di 2.500.000 tonnellate di olio d’oliva (Rabiei e Enferadi, 2012).

L’Unione Europea detiene il primato mondiale sia per la produzione di olive da tavola, che raggiunge il 32% (Muzzalupo, 2014), sia per la produzione e il consumo di olio d’oliva grazie alle 2,1 milioni di tonnellate di olio prodotto; la Spagna è leader mondiale nel settore oleario con una produzione media (2008-2014) di 1,3 milioni di tonnellate olio d’oliva, seguita dall’Italia, al secondo posto, con 450.000 tonnellate, e dalla Grecia con 285.000 tonnellate di olio prodotto; infine, altri paesi europei come Portogallo, Cipro e Francia contribuiscono rispettivamente con 67.500, 5.200 e 5.300 tonnellate (Tabella 1.1). Per quanto riguarda i paesi produttori non-comunitari Siria, Tunisia, Turchia, Marocco, Algeria e Palestina, sono quelli che si contraddistinguono per quantità e qualità delle produzioni. Tuttavia, le recenti espansioni del settore olivicolo nelle aree di nuova coltivazione, come Australia e Stati Uniti, sta contribuendo ad una maggior stabilizzazione del mercato dell’olio extravergine di oliva (Rabiei e Enferadi, 2012).

A seguito della importanza del settore olivicolo, legate alle difficoltà riscontrate nel sostenere la concorrenza delle produzioni dei Paesi extra-comunitari caratterizzati con costi alla produzione più bassi, l’Unione Europea ha promulgato specifici provvedimenti e regolamenti comunitari con lo scopo di tutelare l’olio di oliva, con normative riguardanti la classificazione degli oli (Reg. EC n. 1989/03), la commercializzazione e l’etichettatura (1019/2002) e l’istituzione di marchi di tutela come DOP (Denominazione di origine protetta), IGP (Indicazione Geografica Protetta) e STG (Specialità Tradizionale Garantita) (2081/92 e 2082/92), oltre all’erogazione di contributi e integrazioni del reddito degli olivicoltori.

L’Italia possiede un patrimonio olivicolo inestimabile, con circa 600 cultivar detiene il record per numero di varietà rappresentando il 25% del germoplasma olivicolo mondiale (Muzzalupo, 2014). Tale diversità, in combinazione con la antica tradizione culturale e colturale di tale specie,

rappresenta, dunque, uno dei valori di pregio dell'olivicoltura italiana; ogni varietà, legata in maniera indissolubile ad un particolare territorio, esprime proprietà sensoriali e organolettiche diversificate, diventando un elemento della tradizione enogastronomica locale. Queste caratteristiche produttive hanno consentito all'Italia di poter richiedere il riconoscimento per 37 DOP e di una IGP, divenendo il Paese più rappresentativo a livello comunitario per numero di riconoscimenti di origine (Filo della Torre, 2009).

Tabella 1.1 Produzione di olio d'oliva nei principali paesi dell'UE, espresse in 1.000 tonnellate (Fonte: COI, 2014)

Paese	Media dal 2002-03		Media dal 2008-09		Incremento %
	al 2007-08	%	al 2013-14	%	
Spagna	1072.9	50.2	1305.4	61.7%	17.81
Italia	639.1	29.9	447.7	21.1%	-42.75
Grecia	379.7	17.8	285.1	13.5%	-33.18
Portogallo	35.1	1.6	67.6	3.2%	48.08
Cipro	6.8	0.3	5.2	0.2%	-30.77
Francia	4.4	0.2	5.3	0.3%	16.98
Altri UE	0.3	0.0	0.5	0.0%	40.00
Totale	2138.3	100.0%	2116.8	100.0	2.31

1.3. Il panorama varietale

Il patrimonio varietale italiano è ricchissimo, spesso alcune cultivar sono rappresentate da pochi esemplari (Caruso *et al.*, 2009). Per testimoniare questo fenomeno basti pensare che in Italia 25 varietà coprono solo il 58% della produzione nazionale, mentre in Spagna un ugual numero copre il 96% della produzione. In Grecia o Portogallo sono presenti solo 3 varietà (Pisante *et al.*, 2009).

Le varietà italiane vengono opportunamente distinte a secondo del loro utilizzo produttivo; sono presenti, infatti, *varietà da olio* (con frutto ricco in grassi), *varietà da mensa* (caratterizzate da frutto grande) e *a duplice attitudine*. Le varietà italiane sono spesso caratterizzate da sinonimie, ossia due o più nomi diversi fanno riferimento alla stessa cultivar, o viceversa omonimie, cioè si indicano con lo stesso nome genericamente più genotipi, probabilmente perché fenotipicamente simili.

1.3.1. Cultivar siciliane

La Sicilia da sempre costituisce un bacino per la biodiversità, caratteristica dovuta alla presenza di condizioni pedoclimatiche estremamente variabili. Essa è, inoltre, sempre stata crocevia di culture diverse che qui hanno lasciato qualcosa della loro terra. Lo sviluppo industriale lento e l'agricoltura tradizionale hanno protetto l'isola dall'erosione genetica. È possibile quindi, suddividere ulteriormente il territorio isolano in zone, nelle quali sono presenti specifiche cultivar, che assieme alle peculiarità dei diversi agro-sistemi producono eccellenze dell'agroalimentare apprezzate nel mondo. A testimonianza di quanto detto finora vanno citate le sei DOP ottenute dai diversi oli extravergini regionali e la DOP “Oliva Nocellara del Belice”.

Di seguito sono descritte le cultivar più rappresentative dell'olivicoltura siciliana, suddivise in tre macrozone di appartenenza, con attenzione maggiormente rivolta nella descrizione delle varietà oggetto di studio in questa tesi.

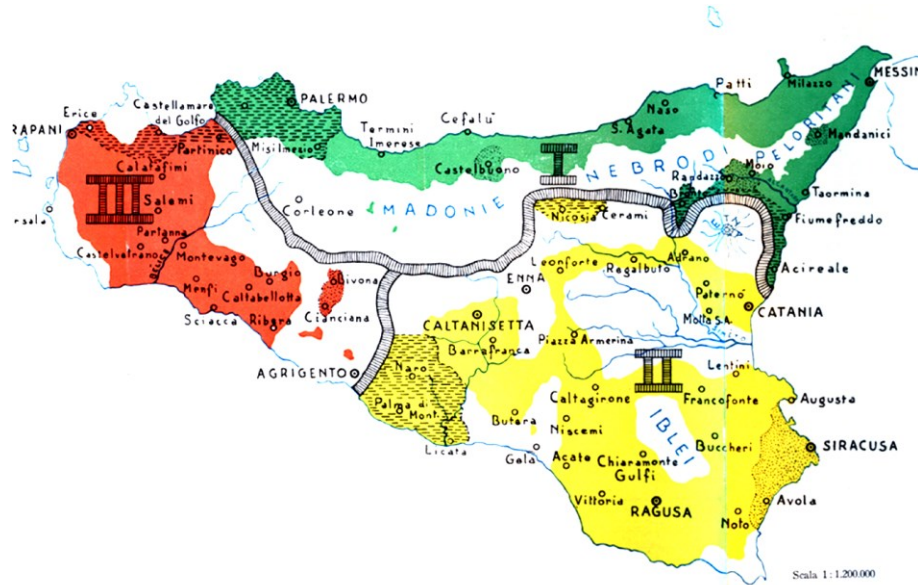


Figura 1.1. Limite delle aree di diffusione delle principali varietà. Area delle varietà 'Ogliarola Messinese', 'Santagatese', 'Minuta' (I). Area delle varietà 'Moresca', 'Nocellara Etnea', 'Tonda Iblea', 'Biancolilla' (II). Area delle varietà 'Cerasuola', 'Nocellara del Belice', 'Buscionetto', 'Giaraffa' (III).

1.3.2. Cultivar della Sicilia Occidentale

CERASUOLA: cultivar della Sicilia occidentale conosciuta con diversi nomi (Palermitana, Marfia, Ogliara), è una varietà sensibile alla rogna, con un'alta resa in olio. Le foglie sono mediamente lunghe ellittico lanceolate, la mignola è compatta di lunghezza media. L'invaiaitura inizia dalla base. Il frutto ha un peso medio (4.3 g) di forma ellittica, presenta piccole lenticelle. L'invaiaitura inizia dall'apice.

NOCELLARA DEL BELICE: cultivar originaria della Valle del Belice e diffusa nella Sicilia occidentale. Produce olio e olive per il consumo diretto. La resa in olio è media, le foglie ellittico lanceolate, la mignola è rada di lunghezza media. Il frutto è pesante (7,4g) di forma sferica, umbonato con poche lenticelle di grande dimensione. L'invaiaitura è uniforme.

1.3.3. Cultivar della Sicilia Settentrionale

OGLIAROLA MESSINESE: cultivar diffusa in Sicilia occidentale e nel messinese, assume diversi nomi come Passalunara o Termisia, sebbene sia coltivata per la produzione di olio dalla resa media è conosciuta

soprattutto per la particolare produzione di olive appassite deamarizzate dal fungo *Sphaeropsis*. Le foglie sono ellittico lanceolate e la mignola è compatta. Il frutto pesante di forma ellittica è umbonato e presenta numerose grandi lenticelle. L'invasatura inizia dalla base.

SANTAGATESE: questa varietà è diffusa nella Sicilia settentrionale con diversi nomi, come Ogliarola o Montonica, ed è facilmente riconoscibile per il suo portamento fortemente assurgente. Tale pianta da olio ha una resa alta ed un ottimo rapporto polpa nocciolo. La foglia è corta e compatta, la mignola è rada. Il frutto è di peso medio elevato di forma ellittica, presenta umbone e lenticelle. L'invasatura progredisce dall'apice.

1.3.4. Cultivar della Sicilia Centro – Sud - Orientale

BIANCOLILLA: si fa riferimento ad una popolazione di genotipi originari della Sicilia occidentale. Il nome deriva dal colore biancastro che vira al lilla della drupa durante l'invasatura. Questa cultivar esclusivamente utilizzata per l'estrazione dell'olio, ha una resa bassa, ma produce un olio molto apprezzato.

Pianta di grande vigoria con portamento non ben definito. Le foglie sono corte e lanceolate, di colore verde scuro, la mignola è rada corta. Il frutto è grande (4.5g) di forma ellittica e umbonato, con un'ottima percentuale del peso della polpa, circa l'85% , rispetto a quello dell'intera drupa. La produzione è spesso alternante e mostra eccezionali annate di carica. La Biancolilla risulta parzialmente autofertile, viene però incrementata l'impollinazione da Moresca, Nocellara Etnea, Zaituna, Ogliarola Messinese e Tonda Iblea (Bottari e Spina, 1952).

MORESCA: Il nome deriva dalla colorazione nera che assume a maturazione precoce già nel mese di ottobre. Viene coltivata per l'estrazione dell'olio con una resa in olio media di circa il 16-19% e per il consumo diretto, riguardante la produzione di olive nere essiccate. La pianta ha un portamento espanso con rametti dagli internodi lunghi. Le foglie sono di lunghezza media e piuttosto larghe, quindi di forma ellittica, la mignola è compatta e corta. Il frutto di peso

medio ha forma ellittica, presenta numerose lenticelle grandi e l'umbone. L'invaiaitura progredisce dalla base. La Moresca è auto sterile, ma viene solitamente fecondata da Biancolilla, Nocellara Etnea, Zaituna, Ogliarola Messinese e Tonda iblea (Bottari e Spina, 1952).

NOCELLARA ETNEA: accessione originaria e diffusa nella Sicilia orientale. A duplice attitudine, il frutto a maturazione tardiva viene facilmente denoccolato, quindi si presta alla produzione di olive verdi farcite, presenta un ottimo rapporto polpa nocciolo e la resa in olio media è del 15-20%. La pianta è molto vigorosa con una folta chioma dal portamento pendulo e rametti dagli internodi lunghi. Le foglie sono lanceolate di media lunghezza, la mignola è compatta. Il frutto di peso medio elevato mostra una forma allungata, umbonato presenta poche lenticelle grandi. Tra le cultivar siciliane, i frutti di questa varietà risultano i meno danneggiati da attacchi d'acici. L'invaiaitura è uniforme. La Nocellara Etnea risulta essere auto e spesso inter sterile, i principali impollinatori sono Biancolilla e Moresca (Bottari e Spina, 1952).

TONDA IBLEA: coltivata nella provincia di Ragusa, Siracusa Catania, e Enna, è utilizzata come cultivar a duplice attitudine, per la preparazione di olive verdi, dato l'ottimo rapporto polpa nocciolo, con valori di percentuale di polpa che si attestano a circa il 90%; media risulta, invece, la resa in olio. La pianta, dal portamento assurgente, presenta diversi adattamenti xerofitici: gli internodi, infatti, sono corti, le foglie brevi, lanceolate, con lembi ripiegati verso la pagina inferiore, la mignola è anch'essa compatta. Il frutto è pesante di forma sferica o ellittica, non presenta umbone e scarso è il numero di lenticelle. L'invaiaitura progredisce dall'apice. È una cultivar auto e spesso inter sterile, tra gli impollinatori principali vi sono Moresca, Zaituna e Calatina per l'alta collina (Bottari e Spina, 1952).

1.4. Caratteristiche dell’olio d’oliva

L’olio d’oliva, grazie alla composizione lipidica bilanciata e alla presenza di micronutrienti con attività antiossidante, è uno degli alimenti più rappresentativi e importanti della Dieta Mediterranea, costituendone la principale fonte di grassi (Kushi *et al.*, 1995; Willett *et al.*, 1995). Fonte ricca di acidi grassi insaturi principalmente monoinsaturi, i cosiddetti MUFA, fornisce acidi grassi polinsaturi essenziali nella dieta umana per il loro effetto benefico sulla salute (Perez-Jimenez *et al.*, 2007).

Chimicamente l’olio è costituito da una frazione saponificabile costituita da trigliceridi (98-99%) e da una frazione insaponificabile (1-2%) costituita dai cosiddetti *componenti minori*, sostanze che sebbene siano presenti in modeste quantità, possiedono un elevato valore nutrizionale (Bonaga e Frega, 1997).

1.5. Sicurezza e qualità dei prodotti agroalimentari

A seguito dei diversi scandali che si sono verificati nel settore agro-alimentare, quali i casi legati alla diossina nei polli (Vellinga e Van Look, 2002) e BSE (Willesmith, 1996), così come altre operazioni fraudolente come ad esempio le adulterazioni e le sofisticazioni di prodotti alimentari, si è evidenziata la necessità di applicare controlli sempre più rigorosi sulla qualità degli alimenti (Busconi *et al.*, 2003) al fine di ridurre i rischi sulla salute umana e tutelare il consumatore. Le produzioni agro-alimentari, a seguito di lavorazioni e tecniche di produzione sempre più complesse, devono necessariamente essere garantite da una certificazione che ne attesti l’origine e ne tracci le fasi lungo tutta la filiera produttiva. Poiché, oggi, nella produzione industriale risulta quasi sempre non plausibile se non impossibile ottenere prodotti senza l’utilizzo di fitofarmaci, diserbanti o senza l’aggiunta di sostanze chimiche quali additivi alimentari, aromi artificiali, antibiotici etc. (Manzelli, 2004); questo indubbiamente aumenta il rischio e l’incertezza nei confronti della salute dei consumatori. Appare chiaro che la qualità e la sicurezza degli alimenti sono di fondamentale importanza, divenendo principi cardini della politica europea sulla sicurezza alimentare, secondo cui dunque è necessario garantire un elevato grado di protezione della salute umana e degli interessi

dei consumatori, tenendo conto della diversità e della tipicità dei prodotti tradizionali. Lo scopo è quello di tutelare i produttori e i consumatori fornendo tutte le informazioni necessarie affinché si possa conoscere il percorso di trasformazione compiuto da un alimento: dai “campi alla tavola”. I consumatori richiedono informazioni sempre più chiare e precise per scegliere gli alimenti in maniera scrupolosa al fine di soddisfare i propri gusti, le proprie esigenze e le proprie abitudini alimentari; l’etichettatura dei prodotti alimentari deve essere onesta e accurata, soprattutto se hanno subito processi di lavorazione e trasformazione. Le informazioni devono essere sancite dalla legge in modo che il cibo sia esattamente quello riportato in etichetta, così che debba essere veritiero e non descritto in maniera errata (Woolfe e Primrose, 2004). L’identificazione della provenienza di un alimento e/o dell’appartenenza dello stesso a un determinato processo produttivo, è tra i più stimolanti argomenti cui la ricerca deve dare risposte al fine di tutelare il produttore da ingiuste usurpazioni e di garantire al consumatore che le caratteristiche del prodotto acquistato siano effettivamente quelle dichiarate dal produttore (Secchiari *et al.*, 2008).

Il problema delle frodi alimentari è quanto mai attuale, soprattutto per quanto riguarda tutti quei prodotti “di nicchia” che possiedono un’elevata qualità e quindi di alto valore economico. Le più comuni frodi, oltre alle varie tipologie di adulterazione, sono le sofisticazioni, le falsificazioni e le contraffazioni.

La legislazione in vigore, che ha come scopo quella di assicurare la tracciabilità e la rintracciabilità, è essenziale e gioca un ruolo chiave in moderno sistema di controllo e valutazione dei prodotti alimentari. La tracciabilità aiuta, di certo, a impedire le frodi, fornisce un metodo valido per la valutazione e la gestione del rischio alimentare, facilitando le procedure di controllo e contribuendo alla fiducia dei consumatori in merito della sicurezza dei prodotti. (Negrini *et al.*, 2008).

L’Unione Europea negli ultimi anni ha sostenuto svariati sforzi per tutelare produttori e consumatori dalle più comuni pratiche fraudolente cui sono soggetti una miriade di prodotti di eccellenza agroalimentare. In particolare, al

fine di poter tutelare tali produzioni aventi caratteristiche uniche, quali il processo produttivo, il valore nutrizionale e la biodiversità agro-alimentare, sono stati istituiti con il regolamento CEE 2081/92 i marchi di qualità DOP e IGP (Agrimonti *et al.*, 2011). Il primo si riferisce a un prodotto originario di un paese e di una regione caratterizzato da una qualità essenzialmente o esclusivamente dovuta all'areale geografico, inclusi quei fattori naturali e umani che diversificano il prodotto; mentre il marchio IGP introduce nella tutela della qualità l'aspetto industriale della sua produzione, dando maggiore rilevanza alle tecniche di produzione che al vincolo territoriale (Rao *et al.*, 2009).

Per l'identificazione di specie animali e vegetali negli alimenti con lo scopo di smascherare le frodi e, ivi, garantire la sicurezza, l'origine e l'autenticità dei prodotti alimentari, ci si avvale in genere di metodologie tradizionali, in confronto a quelle genetiche, come analisi analitiche, chimiche e biochimiche. Quest'ultime, tuttavia, nonostante abbiano avuto un grosso apporto in termini anche di innovazioni in conoscenze e strumentazione, presentano diversi limiti (Enferadi e Rabiei, 2013). I metodi tradizionali basati sulla valutazione di caratteristiche chimiche e morfologiche sono influenzate dalle condizioni ambientali e sono usufruibili solo su materiali non processati (Rao *et al.*, 2009). Altre tecniche, come i saggi immunologici, funzionano bene su matrici alimentari tal quale, ma perdono il loro potere discriminante quando sono applicate su alimenti trasformati. Molte di queste tecniche non sono in grado di discriminare facilmente tra materiali correlati strettamente da un punto di vista livello chimico; nel caso dell'olio d'oliva, ad esempio, è stato dimostrato come la tecnica di spettroscopia infrarossa di Fourier (FT-IR) è possibile rilevare l'adulterazione di olio extravergine di oliva vergine con olio di nocciola, chimicamente molto simili tra loro, soltanto quando si trova in miscele maggiori o uguali al 25% (Kumar *et al.*, 2011)

1.6. Tracciabilità molecolare degli oli extravergini di oliva

La caratterizzazione molecolare dell'olivo ha avuto, nell'ultimo decennio, un notevole sviluppo anche sui prodotti alimentari che derivano dalla sua coltivazione. Una prima caratterizzazione delle cultivar di olivo è stata effettuata utilizzando sia marcatori morfologici che fenologici, e successivamente con marcatori molecolari (Fabbri *et al.*, 1995; Angiolillo *et al.*, 1999; Sefc *et al.*, 2000). Queste stesse metodiche, seppur siano state applicate per la genotipizzazione delle cultivar d'olivo, non hanno avuto una reale ricaduta sulla tracciabilità dell'olio di oliva. Per quanto riguarda l'olio extravergine di oliva esistono delle normative specifiche le quali mirano alla tutela delle produzioni di qualità. Per proteggere l'origine geografica e la qualità degli oli extravergini di oliva, l'Unione Europea ha promulgato regolamenti per la classificazione degli oli d'oliva (Reg. EC n. 1989/03), per la commercializzazione e l'etichettatura (Reg. EC 1019/2002) e per l'identificazione dell'origine geografica (Reg. EC 2081/92 e Reg. EC 2082/92). L'istituzione di marchi di tutela DOP (Denominazione di Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta) è vincolata all'applicazione di un rigido protocollo di produzione e, in particolare, gli stessi, soggetti ad una tracciabilità interna, tutelano sia la qualità e la tipicità dei prodotti che dei consumatori. Il sistema di tracciabilità dell'olio d'oliva è dunque un requisito indispensabile per il controllo della qualità del prodotto lungo tutta la catena produttiva, specie per gli oli DOP e IGP, e gioca un ruolo di fondamentale importanza nel garantire l'origine degli oli stessi e per proteggere i consumatori contro le frodi (Woolfe e Primrose, 2004; Consolandi *et al.*, 2008; Ben-Ayed *et al.*, 2011). Le pratiche fraudolenti più comuni dell'olio extravergine di oliva riguardano: a) la purezza, che può essere compromessa dall'adulterazione con oli di altre specie vegetali, per esempio l'olio di nocciola presenta una composizione acidica analoga a quella dell'olio d'oliva (Rugini e Baldoni, 2011); b) la miscelazione con olio di sansa o con oli provenienti da varietà d'olivo non previste da disciplinari di produzione; c) la conformità dell'etichetta in relazione alla composizione per le cultivar impiegate e le loro

proporzioni relative; d) la conformità all’etichetta in relazione alla provenienza geografica del prodotto; e) l’uso di un diverso metodo di produzione. Il genotipo di partenza per la produzione di olio è uno degli elementi più importanti nella definizione di un marchio DOP, la possibilità di identificare la composizione di un olio, in termini di origine genetica delle olive che l’hanno generato, rappresenta un punto critico per verificarne la conformità ed evitare, ivi, la miscelazione con altri oli, estratti da cultivar provenienti da areali di produzione limitrofe.

Un’altra caratteristica importante degli oli DOP e IGP è la regione da cui provengono: risulta importante verificare tale provenienza, indipendentemente dalle dichiarazioni dei produttori. I composti presenti nell’olio, in particolare quelli volatili, ne definiscono il sapore e l’aroma; essendo caratteristici del metabolismo di ogni cultivar dipendono, oltre che dalle caratteristiche genetiche, in grande misura dalle condizioni pedologiche e climatiche di coltivazione.

Nella maggior parte dei casi, le analisi chimiche non rappresentano, infatti, un metodo per confermare l’autenticità di un olio, ma per verificare l’eventuale miscelazione con oli di origine vegetale (mais, girasole, soia, ecc.), in quanto permettono di valutare le caratteristiche chimiche, soggette all’influenza dei fattori ambientali e culturali.

Un approccio basato, invece, sull’analisi genetica e sul contenuto metabolico è funzionale per definirne l’origine e la composizione varietale di un olio e stabilire, quindi, la sua conformità in base a quanto dichiarato in etichetta (Marmioli *et al.*, 2009). La conoscenza delle cultivar impiegate per la produzione di un olio d’oliva risulta di estrema importanza e ciò può contribuire a certificare la sua origine, come già affermato da alcuni autori dimostrando come la diversità genetica delle cultivar di olivo sia fortemente strutturata a secondo del paese d’origine (Besnard *et al.*, 2001a; 2001b). Tale fatto ha un importante interesse commerciale soprattutto nel caso degli oli pregiati monovarietali o certificati, dato che in genere le etichette indicano il paese di origine ma non riportano in dettaglio le cultivar utilizzate, fornendo spesso un’informazione insufficiente che non giustifica le variazioni di prezzo.

Inoltre, come conseguenza di ciò, come già accennato sopra, gli oli risultano essere maggiormente esposti alle adulterazioni con altri oli di bassa qualità, ottenuti da cultivar anonime o meno costose (Breton *et al.*, 2004).

Il primo requisito per eseguire un'analisi molecolare su un alimento è la disponibilità di DNA, che deve essere di qualità e quantità elevate. La quantità e la qualità di DNA presente negli alimenti dipendono: dal materiale originale utilizzato, dal trattamento che hanno subito e dal tempo trascorso dall'inizio del processo di trasformazione. Questi fattori possono degradare le molecole di DNA, denaturarle, modificare la struttura chimica e diminuirne quantità e dimensioni.

L'olio è una matrice grassa, in cui il DNA è poco solubile e quindi difficilmente recuperabile (Hellebrand *et al.*, 1998). Il DNA estratto dall'olio di oliva presenta un alto livello di degradazione, generalmente le dimensioni dei frammenti amplificabili in PCR non superano le 300 paia di basi (bp). Muzzalupo e Perri (2002), Busconi *et al.*, (2003) sono stati fra i primi autori a riportare la possibilità di recuperare e caratterizzare il DNA estratto da olio d'oliva. Qualche tempo dopo è stato presentato uno studio comparativo su diversi metodi di estrazione di DNA da olio d'oliva, con il fine di individuare il migliore per isolare una quantità sufficiente di DNA utilizzabile in analisi molecolari (Breton *et al.*, 2004). Altri autori hanno avuto modo di dimostrare la possibilità di estrarre DNA dall'olio di oliva e poterlo amplificare mediante PCR con diverse tipologie di marcatori molecolari (Pasqualone *et al.*, 2004; Pafundo *et al.*, 2005; Pafundo *et al.*, 2007; Pasqualone *et al.*, 2007). Nel 2008 Palmieri e Consolandi hanno applicato le metodiche di estrazione del DNA dall'olio di oliva a una piattaforma microarray UA-LDR per il riconoscimento varietale delle cultivar impiegate nella produzione di oli monovarietali. Questi studi hanno evidenziato la possibilità di eseguire analisi molecolari su olio d'oliva e, quindi, applicabili per la tracciabilità genetica di questo prodotto. I risultati riportati in letteratura hanno aperto, quindi, la prospettiva dell'utilizzo di marcatori molecolari in analisi di "fingerprinting".

In merito alle caratteristiche organolettiche e agli aspetti benefici apportati alla salute, l'olio extravergine d'oliva è considerato un elemento di elevata

qualità; come conseguenza di queste peculiari caratteristiche l'interesse per tale prodotto è in continuo aumento e il suo consumo si è diffuso anche tra i paesi non tradizionalmente produttori come Stati Uniti, Australia e Giappone (Pinelli *et al.*, 2003; Consolandi *et al.*, 2008).

Le analisi genetiche sono in continua evoluzione, oggi giorno la “Food Genomics” si sta sviluppando in maniera considerevole anche per quanto riguarda l'olivo e i suoi prodotti. L'interesse nell'utilizzo di marcatori genetici applicati sull'olivo ha permesso di condurre studi, in cui gli sforzi concentrati sulla ricerca hanno permesso di risolvere alcuni problemi d'identificazione e caratterizzazione varietale (Las Casas *et al.*, 2014). Tuttavia, i dati ottenuti dai diversi laboratori non sono ancora confrontabili tra loro, come l'assenza di protocolli di analisi comuni o la mancanza di un'autorità nazionale che certifichi e tuteli l'identità del materiale analizzato in comparazione di un genotipo di riferimento (Rugini e Baldoni, 2011). Le difficoltà riscontrate per la caratterizzazione genetica dell'olivo dipendono da alcuni fattori: ricchezza del germoplasma in coltivazione (Bartolini *et al.*, 1998), distribuzione delle varietà (varietà locali e varietà a larga diffusione), sopravvivenza di ecotipi locali, genotipi rari, impollinatori e olivi selvatici, presenza di sinonimi (es. Frantoio, Raggiola, Correggiolo), omonimi (es. Ogliarola, Rosciola) e problemi relativi alla presenza di presunti varianti all'interno di ciascun clone (Rugini e Baldoni, 2011). Inoltre, l'elevato numero di cultivar causa problemi considerevoli per quanto concerne la gestione del germoplasma, la tracciabilità e autenticità degli oli d'oliva prodotti data l'incertezza sulla corretta denominazione delle cultivar impiegate (Chiappetta *et al.*, 2014).

Una vasta gamma di marcatori molecolari è stata ampiamente utilizzata su olivo ottenendo risultati importanti in diversi campi di ricerca, come studi di popolazione di *Olea europaea*, la caratterizzazione del germoplasma, studi di filogenesi e programmi di breeding (review in Bracci *et al.*, 2011). In più, essendo capaci di distinguere efficacemente cultivar differenti senza alcuna influenza ambientale (Ben-Ayed, 2011), i marcatori molecolari possono essere applicati anche all'olio d'oliva, poiché potenzialmente in grado di risolvere

problemi di provenienza e di tracciabilità dell'olio stesso, assicurando la sua conformità alla legislazione (Agrimonti *et al.*, 2011).

La tracciabilità molecolare applicata all'olio d'oliva è uno strumento sensibile che consente di poter determinare con certezza la composizione varietale degli oli extra-vergini italiani, valutare la presenza di oli derivati da varietà estranee, verificare la presenza di oli di specie diverse dall'olivo. Le procedure di tracciabilità molecolare prevedono la presenza di alcuni presupposti che debbano essere soddisfatti (Rugini e Baldoni, 2011):

a) Disponibilità di metodi d'estrazione di DNA da matrice oleosa.

b) Identificazione di marcatori nucleari o plastidiali delle varietà di olivo e delle specie diverse da olivo.

c) Verifica della funzionalità del metodo su oli costruiti sperimentalmente.

d) Applicazione dell'analisi molecolare agli oli commerciali.

1.6.1. Estrazione di DNA da olio d'oliva

Una condizione necessaria e sufficiente al fine di eseguire analisi molecolare su un alimento è quella di poter isolare da esso DNA di buona quantità e qualità. La quantità di DNA isolabile da un alimento, così come pure la sua qualità, dipende dalla natura delle matrici alimentari e dai trattamenti sottoposti, oltre che dal tempo trascorso dall'inizio del loro processo di estrazione e lavorazione. Le trasformazioni e i trattamenti, come quelli chimici e fisici, influenzano notevolmente il DNA, che può danneggiarsi o subire modificazioni chimiche e strutturali, tali da condizionarne quantità e dimensioni (Vietina, 2008).

Nel caso dell'olio d'oliva, a causa delle sue caratteristiche intrinseche, riuscire a estrarre e recuperare DNA non è di semplice applicazione e risulta pertanto un'operazione particolarmente complessa (Muzzalupo *et al.*, 2007).

A causa degli stress meccanici connessi alla lavorazione delle olive, vengono rilasciate e attivate nucleasi nell'olio responsabili della degradazione del DNA,

che per questo motivo risulta essere altamente degradato (Muzzalupo e Perri, 2002; De la Torre *et al.*, 2004; Testolin e Lain, 2005). In merito a ciò, l'olio è una matrice grassa in cui il DNA è sia poco solubile che difficilmente recuperabile (Hellebrand *et al.*, 1998); la quantità di DNA isolabile risulta perciò essere bassa e spesso può essere rilevata con tecniche classiche come l'elettroforesi in gel d'agarosio e la spettrofotometria UV (Agrimonti *et al.*, 2011). Inoltre, la presenza di composti fenolici e di polisaccaridi ha implicazioni dirette sull'analisi del DNA, poiché questi composti hanno un'attività inibitrice nei confronti delle DNA polimerasi fornendo prodotti aspecifici di amplificazione PCR, ottenendo, quindi, risultati non affidabili (Busconi *et al.*, 2003; De la Torre *et al.*, 2004).

Come dimostrato da Hellebrand *et al.* (1998), gli ampliconi che possono essere ottenuti dopo la reazione di PCR non superano generalmente le 300 bp, a causa della forte degradazione del DNA estratto. Muzzalupo e Perri (2002) sono stati fra i primi autori a recuperare e caratterizzare DNA isolato da olio d'oliva mediante un protocollo di estrazione di DNA da olio, utilizzando un metodo di estrazione a base di CTAB (Doyle e Doyle, 1987), modificato partendo da sedimento di olio d'oliva, prodotto sperimentalmente con *proteinasi-K* aggiunta durante il processo di gramolazione, sfruttando la sua attività enzimatica nel prevenire danni a carico del DNA.

Nel corso dell'ultimo decennio, sono state pubblicate diverse ricerche scientifiche nelle quali sono state riportate differenti procedure e descritti protocolli di estrazione di DNA, con risultati soddisfacenti (Tabella 1.2). In generale, i metodi di estrazione del DNA si possono dividere tra quelli che utilizzano CTAB e solventi organici (Busconi *et al.*, 2003) o mediante kit commerciali come Qiagen QIAmp DNA Stool kit, Gene Elute Plant Kit (Sigma), NucleoSpin Food e NucleoSpin Plant, i quali sono stati utilizzati da diversi gruppi ottenendo risultati positivi. Come riportato in Tabella 1.2, in confronto ai primi tentativi di estrazione di DNA da olio d'oliva, vi è stata una rilevante riduzione di volume iniziale dei campioni utilizzati. Nei primi lavori, infatti (Muzzalupo e Perri, 2002; Busconi *et al.*, 2003; Breton *et al.*, 2004), i volumi di olio utilizzati erano piuttosto consistenti (maggiori o uguali a 50 ml)

e non risultano facilmente applicabili in analisi di routine in laboratorio; mentre in lavori più recenti, i protocolli di estrazione sono stati implementati al fine di procedere con quantità anche inferiori a 1 ml (Muzzalupo *et al.*, 2007; Gimenez *et al.*, 2010), permettendo di impiegare così un minor tempo e con la possibilità di applicazione in processi industriali. Questi processi hanno permesso di potere isolare DNA di quantità e qualità sufficiente al fine di condurre analisi molecolari (Pasqualone *et al.*, 2004; Pafundo *et al.*, 2005; Doveri *et al.*, 2006; Pasqualone *et al.*, 2007; Pafundo *et al.*, 2007).

Uno dei punti critici dell'estrazione, in grado di influenzare la resa del DNA estraibile dall'olio, è il tempo di conservazione dell'olio stesso. La degradazione del DNA è legata al tempo e alle modalità di conservazione dell'olio; infatti, i processi degradativi sono strettamente legati ai processi ossidativi che avvengono a carico dell'olio. L'autenticazione e la caratterizzazione molecolare di un olio extravergine d'oliva dovrebbero avvenire dunque entro un mese dalla sua produzione (Pafundo *et al.*, 2010).

L'ottimizzazione di protocolli di estrazione di DNA resta comunque un *top trend*, oggetto di studi che ha richiamato l'attenzione di molti ricercatori, considerato che ad oggi non esiste un metodo univoco e riconosciuto da più gruppi di ricerca. In un recente studio Muzzalupo *et al.* (2015) suggeriscono una metodologia molto semplice mediante un processo di filtrazione, quindi fisico, e senza l'aggiunta di solventi chimici; tale protocollo ha permesso l'amplificazione di DNA partendo direttamente dal campione selezionato, bypassando così una classica estrazione. Questa procedura si esegue in combinazione con l'utilizzo di una *Taq-polimerasi* (KAPA3G) capace di tollerare gli inibitori che interferiscono sull'amplificazione del DNA isolato. Questo protocollo veloce, facile ed economico, ha permesso di amplificare 11 loci microsatelliti fornendo buoni risultati e dimostrando dunque di essere uno strumento alternativo da applicare in analisi di tracciabilità e autenticità dell'olio extravergine d'oliva.

Tabella 1.2 Metodo di estrazione di DNA da matrici di olio, differenza di quantità di partenza e quantità di DNA isolata riscontrata

Protocolli di estrazione del DNA	Olio d'oliva	Quantità di partenza	DNA estratto	Bibliografia
CTAB-based method	Olio vergine di oliva monovarietale	N.d.	N.d.	Muzzalupo e Perri (2002)
	Olio extravergine di oliva monovarietale	50-100 ml	quantità molto bassa	Busconi <i>et al.</i> (2003)
	Olio di oliva monovarietale filtrato e non filtrato	2-40 g	10 ng/μl	Testolin and Lain (2005)
	Olio di oliva monovarietale e commerciale	6 ml	7.75 ng/μl	Martins-Lopes <i>et al.</i> (2008)
	Olio di oliva monovarietale commerciale	1 ml	N.d.	Gimenez <i>et al.</i> (2010)
CTAB-Hexane method	Olio di oliva monovarietale commerciale	100 ml	40 ng/μl	Consolandi <i>et al.</i> (2008)
	Olio di oliva monovarietale commerciale	1 ml	N.d.	Gimenez <i>et al.</i> (2010)
CTAB-Hexane-Chloroform method	Olio di oliva monovarietale commerciale	500 μl	N.d.	Gimenez <i>et al.</i> (2010)
Hexane method	Olio di oliva monovarietale	2 ml	27 ng/μl	Consolandi <i>et al.</i> (2008)
	Olio di oliva monovarietale e commerciale	2 ml	35.2 ng/μl	Martins-Lopes <i>et al.</i> (2008)
	Olio di oliva monovarietale	1 ml	N.d.	Gimenez <i>et al.</i> (2010)
Based on DNA extraction from paraffin	Olio di oliva monovarietale	2 ml	N.d.	Pafundo <i>et al.</i> (2005)
NucleoSpin® Plant mini Kit	Olio di oliva monovarietale	2 ml	N.d.	Pafundo <i>et al.</i> (2007)
	Olio di oliva monovarietale e commerciale	1 ml	13.2 ng/μl	Martins-Lopes <i>et al.</i> (2008)
NucleoSpin® Food kit	Olio di oliva a differenti tempi di conservazione	N.d.	N.d.	Pafundo <i>et al.</i> (2010)
	Olio di oliva monovarietale	2 ml	23 ng/μl	Consolandi <i>et al.</i> (2008)
Qiagen QIAmp DNA Stool kit	Olio di oliva monovarietale	200 μl	5-10 ng/μl	Ayed <i>et al.</i> (2009)
	Olio di oliva monovarietale filtrato e non filtrato	2-40 g	10 ng/μl	Testolin e Lain (2005)
	Olio di oliva denocciolato	100-300 μl	3.67-15.0 ng/μl	Muzzalupo <i>et al.</i> (2007)
	Olio di oliva filtrato e marcato con λDNA	50 ml	10 μg λdna	Spaniolas, Bazokos, Nturuou <i>et al.</i> (2008)

Protocolli di estrazione del DNA	Olio d'oliva	Quantità di partenza	DNA estratto	Bibliografia
	Oli vegetali	50 ml	quantità molto bassa	Spaniolas, Bazokos, Nturuou et al. (2008)
Dneasy Plant mini kit	Olio di oliva monovarietale filtrato e non filtrato	2-40 g	10 ng/μl	Testolin e Lain (2005)
	Olio di oliva monovarietale e commerciale	1 ml	1.75 ng/μl	Martins-Lopes et al. (2008)
Gene Elute plant kit (Sigma)	Olio di oliva monovarietale e blend filtrato e non filtrato	50 ml (olio non filtrato) 200 ml (olio filtrato)	N.d.	Pasqualone <i>et al.</i> (2007)
	Olio di oliva monovarietale	200 ml	N.d.	Montemurro <i>et al.</i> (2008)
	Olio di oliva monovarietale	250 ml	5 ng/μl	Alba <i>et al.</i> (2009)
Hydroxyapatite Biogel (Sigma)	Olio di oliva commerciale (DOP e IGP)	400 ml	N.d.	Breton <i>et al.</i> (2004)
Silica kit (Sigma)	Olio di oliva commerciale (DOP e IGP)	80 ml	N.d.	Breton <i>et al.</i> (2004)
	Olio di oliva commerciale (DOP e IGP)	40 ml	N.d.	Breton <i>et al.</i> (2004)
Wizard® Magnetic purification system for food (Promega)	Olio di oliva monovarietale filtrato e non filtrato	2-40 g	10 ng/μl	Testolin e Lain (2005)
	Olio di oliva monovarietale	120 ml	34 ng/μl	Consolandi <i>et al.</i> (2008)
Commercial LB Link-Bioteck ExtMan Official Swiss method for lecithin and oil DNA extraction		2,5 ml	quantità bassa	Doveri <i>et al.</i> (2006)
TEA based buffer (Tris, EDTA, and ascorbic acid) method Sedimento, Olio di oliva monovarietale filtrato e non filtrato 25-500 g			0.2-2 ng/g sedimento olio 0.1-0.5 pg/g olio	de la Torre <i>et al.</i> (2004)
TNE based buffer (Tris, NaCl, EDTA, SDS) method with Wizard DNA Clean up resin (Promega)	Olio d'oliva e olive	250 ml	N.d.	Pasqualone <i>et al.</i> (2001)
TNE based buffer (Tris, NaCl, EDTA, SDS) method	Olio di colza raffinato ed estratto a freddo	200 ml	N.d.	Hellebrand <i>et al.</i> (1998)

1.6.2. Marcatori molecolari impiegati nell’olio d’oliva

I risultati ottenuti sulla possibilità di estrazione del DNA hanno aperto la strada alle analisi molecolari sull’olio extravergine d’oliva anche al fine di poterle utilizzare per la tracciabilità del prodotto. Diversi lavori hanno messo in evidenza l’utilizzo di marcatori molecolari, già utilizzati in studi di caratterizzazione del germoplasma olivicolo, per valutare il DNA isolato e ottenere una caratterizzazione genetica da poter confrontare con altre specie in procedure di identificazione (Marmioli *et al.*, 2009). Tuttavia, in uno studio dove è stato utilizzato il λ DNA, molecola lineare della lunghezza analoga a quella DNA presente nell’olio (circa 50 kb), come marker per monitorare la lunghezza dei frammenti di DNA durante il periodo di conservazione (Spaniolas *et al.*, 2008), la concentrazione iniziale di DNA presente nell’olio e la durata di conservazione risultano fattori limitanti per l’applicazione dei marcatori molecolari allo scopo di identificare l’origine varietale. Inoltre, le tecniche di *fingerprinting*, che richiedono templati superiori di 100 bp, potrebbero non essere in grado di amplificare con successo sequenze target provenienti da campioni di olio conservati per diversi mesi. L’individuazione di marcatori polimorfici, che amplificano per dimensioni inferiori a 100 bp, può avere una più ampia gamma di applicazioni nel *fingerprinting* del DNA dell’olio d’oliva, suggerendo l’impiego di marcatori con profili semplici e specifici, quali SNPs, caratteristici per singola varietà (Rugini e Baldoni., 2011).

La scelta del marcatore molecolare da utilizzare diventa, allora, un punto cruciale. I criteri su cui ci si basa la scelta del marcatore opportuno possono essere: il potere di discriminazione; la corrispondenza tra profili di DNA proveniente da foglia e da olio; la riproducibilità e ripetibilità del risultato; la semplicità dell’analisi (Agrimonti *et al.*, 2011). Al fine di identificare il genotipo e studiarne una reale applicazione, sono stati utilizzati su olio extravergine di oliva diverse tipologie di marcatori molecolari (Tabella 3) già utilizzati in studi di caratterizzazione del germoplasma olivicolo: RAPD (Besnard *et al.*, 2001b; Belaj *et al.*, 2003 Ganino *et al.*, 2007), AFLP (Angiolillo *et al.*, 1999), SCARs (Busconi *et al.*, 2006), ISSRs (Gemmas *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2009), SSR (Sefc *et al.*, 2000;

Cipriani *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2006; Belaj *et al.*, 2007; Breton *et al.*, 2008; Muzzalupo *et al.*, 2009; Erre *et al.*, 2010), e SNP (Reale *et al.*, 2006; Muleo *et al.*, 2009; Hakim *et al.*, 2010).

1.6.2.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

I marcatori RAPD, sviluppati da William *et al.* (1990), si basano sull'amplificazione di regioni geniche random mediante l'utilizzo di primer corti 10 bp di sequenza arbitraria. Il pattern elettroforetico che ne deriva è rappresentato da un numero variabile di frammenti di diversa lunghezza. Semplici da applicare e a basso costo, sono stati applicati i primi marcatori molecolari usati per la tracciabilità delle cultivar in olio d'oliva in diversi lavori. Muzzalupo e Perri (2002) hanno riscontrato un profilo elettroforetico dopo l'amplificazione non del tutto comparabile con quello ottenuto dal DNA fogliare. Inoltre, un fattore limitante nell'utilizzo dei RAPD per scopi di tracciabilità dell'olio è la loro scarsa riproducibilità, per cui il loro impiego può essere valido per lo sviluppo di marcatori SCAR (Busconi *et al.*, 2003).

1.6.2.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

La metodica AFLP (Vos *et al.*, 1995) richiede una digestione del DNA con enzimi di restrizione con due amplificazioni selettive. L'applicazione di questi marcatori presenta diversi vantaggi, uno tra tutti la non necessaria ricchezza di informazioni sulle sequenze da analizzare. Questo fatto assume grande importanza per la tracciabilità dell'olio d'oliva dovuto alla irrisorio numero di sequenze depositate di olivo disponibili in banca dati. Inoltre, essi risultano essere altamente polimorfici e più riproducibili rispetto ai RAPD. La convenienza dell'utilizzo della tecnica AFLP, al fine di valutare la composizione varietale in campioni di olio, è stata esaminata in diversi lavori. Busconi *et al.* (2003) hanno utilizzato tali marcatori osservando che il profilo del DNA purificato da olio monovarietale mostrava un'elevata corrispondenza con il profilo di DNA ottenuto dalle foglie della medesima cultivar. Pafundo *et al.* (2005) hanno ottimizzato il protocollo AFLP per ottenere dei profili genetici di elevata qualità e altamente riproducibili; i risultati ottenuti hanno evidenziato una corrispondenza del 70% confrontando il fingerprint ottenuto dall'olio con le cultivar di riferimento, mettendo in risalto alcuni fattori limitanti quali il protocollo di estrazione del DNA che influisce negativamente sull'affidabilità dei profili AFLP e la non rilevabilità di frammenti più lunghi di 250 bp. A differenza dei risultati ottenuti nel lavoro precedente, Montemurro *et al.* (2008) hanno dimostrato la possibilità di amplificare frammenti più lunghi di 250 bp. Gli stessi autori affermano che le differenze con i risultati ottenuti nel lavoro di Pafundo *et al.* (2005) erano

probabilmente legati a diversi fattori quali, per esempio, dai differenti metodi di estrazione di DNA e le differenti condizioni di restrizione e amplificazione. Seppure i profili AFLP sono in grado di poter fornire una grossa mole di dati, tale tecnica risulta, tuttavia, abbastanza complessa, costosa e difficilmente applicabile alle miscele di olio (Agrimonti *et al.*, 2011).

1.6.2.3. SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

La tecnica SCAR, introdotta da Paran e Michelmore (1993) comporta la conversione di prodotti RAPD e AFLP in sequenze amplificate e caratterizzate per ciascun individuo. Essi sono marcatori molecolari basati su PCR e rappresentano loci geneticamente definiti che sono stati ampiamente utilizzati e usati con successo per la selezione assistita da marcatori (MAS) in diverse piante da interesse agrario (Zhang e Stommel, 2001). Hernández *et al.* (2001) riportano la loro applicazione per la caratterizzazione del germoplasma di olivo, dimostrando che possono essere applicati anche in multiplex PCR e in piattaforme microarray.

In studi di caratterizzazione su olio d'oliva l'utilizzo di SCAR derivato da RAPD e AFLP risulta essere una strategia efficace per superare l'ostacolo della degradazione del DNA e un'alternativa da poter utilizzare per la tracciabilità. Gli SCAR risultano essere generalmente a singolo locus e permettono di ottenere ampliconi tra 50 bp e 400 bp; i marcatori multi-locus, infatti, non permettono un'identificazione univoca delle varietà che compongono un olio; per questo gli SCAR rappresentano un mezzo efficace per superare le difficoltà incontrate nell'analisi di questa matrice alimentare (Montemurro *et al.*, 2009). Busconi *et al.* (2003) hanno sviluppato marcatori SCAR non specifici da profili RAPD ottenuti da DNA proveniente da foglia.

1.6.2.4. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Con il termine SNP (Single Nucleotide Polymorphism) si intendono delle mutazioni che avvengono naturalmente nel DNA e che hanno effetto su un singolo nucleotide (Brookes *et al.*, 1999). Hanno il vantaggio di essere uniformemente diffusi nel genoma, sono inoltre di facile identificazione. Gli SNP sono comunemente usati nella caratterizzazione della struttura delle popolazioni e nelle ricerche riguardanti la storia dei geni e hanno una notevole importanza per gli studi di mappaggio tramite ricombinazione.

Gli SNP possono essere classificati in:

- a) *non codificanti*, nelle regioni non trascritte in 5' o in 3' UTR (Untranslated Region);
- b) *codificanti* possono essere polimorfismi di sostituzione, cioè che cambiano l'amminoacido codificato, oppure polimorfismi sinonimi, ovvero che cambiano il codone ma non il corrispondente amminoacido codificato;
- c) *di non sostituzione*, comprendono polimorfismi sinonimi e non codificanti, molti dei quali possono comunque influenzare le funzioni del gene come quelli che si basano nelle regioni regolative (Gibson *et al.*,2004).

È possibile anche classificare gli SNP in base al tipo di mutazione che identifica il polimorfismo. Si possono, infatti, riscontrare tre possibili transversioni C↔A ($G_1 \leftrightarrow T_1$), C↔G ($G_1 \leftrightarrow C_1$) e T↔A ($A_1 \leftrightarrow T_1$), e una sola transizione C↔T ($G_1 \leftrightarrow A_1$). Nell'uomo la frequenza dei quattro tipi di SNP non è eguale, infatti i 2/3 degli SNP riguardano il tipo C↔T ($G_1 \leftrightarrow A_1$) e questo è dovuto probabilmente alla reazione di *deaminazione* della *5-metilcitosina*, che è nota accadere frequentemente, in particolare a livello dei dinucleotidi CpG (Holliday e Grigg, 1993). Inoltre a causa della natura del codice genetico, è poco probabile che le transizioni modifichino gli amminoacidi rispetto alle transversioni e di conseguenza si ritiene che le transizioni siano mantenute nelle regioni codificanti con una probabilità maggiore. Il grande vantaggio nell'utilizzo degli SNP è dato dall'elevato numero di polimorfismi che possono essere oggetto di genotipizzazione e dalla loro elevata presenza lungo un genoma.

Nel campo vegetale marcatori di singolo polimorfismo sono stati usati per studi di genetica di popolazione, analisi filogenetiche, e per la costruzione di mappe genetiche (Chiapparono *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2003; Rafalsky *et al.*, 2002). L'elevata flessibilità degli SNP li rende marcatori molecolari ottimali per la sua estrema adattabilità alle piattaforme "high-throughput", come microarray e Real-Time PCR, consentendo di realizzare analisi ad ampio spettro sia qualitative che quantitative.

La rilevazione di marcatori SNPs prevede la disponibilità di primer oligonucleotidici, che fiancheggiano particolari regioni del genoma dove sono presenti questi polimorfismi. Grazie alla loro abbondanza nel genoma allo

sviluppo di tecnologie genomiche di nuova generazione da alcuni autori attribuiscono agli SNPs il ruolo di marcatori del futuro (Bracci *et al.*, 2010.)

Lo sviluppo di questi marcatori richiede un elevato livello d'informazione genica e la disponibilità di un elevato numero di sequenze in GeneBank. Reale *et al.* (2006) hanno contribuito in maniera determinate ad aumentare il numero di sequenze, sequenziamento prodotti di amplificazione e confrontando le sequenze dei polimorfismi trovati.

Muleo *et al.* (2009) hanno individuato diversi SNPs nel gene fitocromo A e, utilizzando la tecnica High Resolution Melting (HRM), sono stati in grado di rilevare facilmente la presenza di mutazioni per sostituzione, sia in condizione di omozigosi che di eterozigosi del gene. L'analisi HRM presenta una riproducibilità e una sensibilità molto elevata per rilevare SNPs, consentendo la genotipizzazione di differenti cultivar e essendo un metodo semplice, informativo e di basso costo.

L'High Resolution Melting è stata identificata come un interessante metodo di analisi che può essere applicato per l'indagine sulla variabilità genetica e per l'individuazione di SNPs, inserzioni o delezioni e di metilazioni nel DNA (Hermann *et al.*, 2007; White *et al.*, 2007). La tecnica comporta nella misurazione della variazione di fluorescenza di colorante che si intercala all'interno della molecola a doppio filamento di DNA, tramite l'ausilio di un rilevatore ottico altamente preciso, già impiegato nei termociclatori delle RealTime-PCR. Una leggera variazione nella sequenza del DNA del campione porta alla variazione rilevabile delle curve di melting, perciò risulta possibile distinguere e caratterizzare le differenti varianti alleliche degli amplificati di PCR. Questa tecnica è stata già utilizzata per studiare la variabilità genetica in diverse specie arboree come olivo, melo, vite, mandorlo, ciliegio e agrumi (Wu *et al.*, 2008; Chagne *et al.*, 2008; Mackay *et al.* 2008; Muleo *et al.*, 2009; Ganopoulos *et al.*, 2011; Distefano *et al.*, 2012). L'HRM è stata applicata per indagini sulla biodiversità e il mappaggio genetico (Lehmensiek *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2011), anche mediante l'utilizzo di marcatori microsatelliti (Mackay *et al.* 2008; Muleo *et al.*, 2009; Ganopoulos *et al.*, 2011; Mader *et al.*, 2008; Arthofer *et al.*, 2011; Distefano *et al.*, 2012).

Il vantaggio più significativo degli SNP è, rispetto agli altri marcatori molecolari, la possibilità di amplificare un frammento di DNA di 100 bp (Rabiei e Enferadi., 2013); possono pertanto essere strumenti utili per tracciare DNA estratto da matrici complesse come l'olio d'oliva. L'elevata flessibilità degli SNP li rendono marcatori ideali per lo screening ad elevate prestazioni, soprattutto mediante l'utilizzo di piattaforme Real-Time PCR e microarray (Marmiroli *et al.*, 2009). Di recente hanno trovato applicazione SNP scoperti in svariati geni coinvolti in *pathway* metabolici (Consolandi *et al.*, 2007; Reale *et al.*, 2006). La combinazione di diversi SNP ha fornito la possibilità di rilevare particolari aplotipi specifici per alcune varietà di olivo (Marmiroli *et al.*, 2009). Attraverso una piattaforma microarray LDR-UA è stato possibile distinguere 49 varietà di olivo sulla base di 17 SNP del DNA fogliare (Consolandi *et al.*, 2007). Questa stessa piattaforma array è stata successivamente affinata ed applicata direttamente al DNA estratto da olio per caratterizzare otto oli monovarietali. Nonostante la procedura multiplex PCR sul DNA estratto da olio abbia permesso l'analisi di 13 SNP rispetto ai 17 analizzati nel precedente lavoro, si è riusciti allo stesso modo di discriminare le varietà, dimostrando così che la piattaforma LDR-UA dovrebbe essere di grande aiuto nelle analisi di laboratorio per verificare l'origine e l'autenticità degli oli d'oliva monovarietali (Consolandi *et al.*, 2008).

1.6.2.5. SSR (Simple Sequence Repeat)

Con il termine SSR (Simple Sequence Repeat) o microsatelliti vengono indicate delle regioni di DNA caratterizzate da una ripetizione in tandem di una stessa sequenza di 2-6 basi, ad esempio (AG)_n. Questo genere di polimorfismi sono diffusissimi all'interno del genoma, inoltre presentano un elevato livello di variabilità all'interno di ciascuna specie (Rafalsky *et al.*, 1996).

Le differenze trovate a livello di sequenza tra le diverse cultivar di olivo possono essere utilizzate come “*tracciante*” per identificare la presenza di specifico materiale vegetale nell'olio e valutarne l'origine varietale. Breton *et al.* (2004) hanno dimostrato la possibilità di amplificare con marcatori microsatelliti DNA isolato da diverse tipologie di olio di oliva con differenti metodi, realizzando uno studio dei profili di dissociazione degli alleli mediante Real-Time PCR, valutando

in questo modo la loro corrispondenza con quelli identificati nel DNA estratto dalla rispettiva cultivar di riferimento. L’approccio si è rivelato positivo, permettendo di amplificare con successo diversi alleli, poi visualizzati attraverso elettroforesi capillare (Testolin e Lain, 2005). L’analisi dei profili microsatelliti per la comparazione degli alleli identificati nell’olio e nelle rispettive cultivar di riferimento è stata sviluppata anche su gel di agarosio (Pasqualone *et al.*, 2004; Pasqualone *et al.*, 2007).

Durante le reazioni di amplificazione mediante PCR di loci microsatelliti è possibile riscontrare un numero di artefatti che possono interferire con una chiara interpretazione e genotipizzazione degli alleli presenti nel DNA oggetto di analisi.

Diversi autori (Taberlet *et al.*, 2006, Hoffman e Amos 2005) hanno discusso le numerose fonti di errore che possono incorrere nell’analisi dei dati degli amplificati SSR, come i pattern:

- “*stutter bands*”,
- “*allele drop-out*”,
- “*non template nucleotide*”,
- “*shadow bands*” e “*null allele*”.

Le “*stutter bands*” sono un classico problema dovuto allo scivolamento della *Taq-polimerasi* lungo la sequenza del microsatellite; questo comporta che per ciascun allele si abbia un pattern con più bande. In modo particolare, per campioni in cui il DNA è di bassa qualità con la presenza di una miscela di due o più individui (come potrebbe essere il caso di un blend di olio d’oliva policultivar) l’interpretazione dei dati potrebbe risultare alquanto difficile. Il *picco*, nel caso di una visualizzazione con elettroferogrammi in Elettroforesi Capillare (EC), con maggiore intensità rappresenta l’allele del microsatellite analizzato, mentre i picchi laterali costituiscono i prodotti di “*stutter*” (n+1, n-1, n-2, n-3). Nel caso delle ripetizioni dinucleotidiche, la “*stutter band*” prevalente è di 2 bp, più piccola rispetto al picco principale, ma si possono individuare picchi di “*stutter*” rispettivamente di 4 bp e 6 bp più piccole. L’intensità delle “*stutter bands*” è generalmente minore del 10% rispetto al picco principale (Murray *et al.*, 1993).

L'utilizzo di marcatori tri o tetra-nucleotidici permette di ottenere profili elettroforetici caratterizzati da un livello di bande di "stutter" minore.

L'"*allele drop-out*" consiste invece nell'amplificazione preferenziale di uno soltanto dei due alleli, generalmente il più piccolo fra i due. La causa di questa tipologia di errore è spesso dovuta al bassissimo numero di molecole amplificabili presenti nel campione. L'"*allele drop-out*" è direttamente correlato con la dimensione degli alleli, loci caratterizzati da una differenza molto elevata tra l'allele più piccolo e quello più grande presentano una maggiore percentuale di allele drop-out (Bjourklund *et al.*, 2005).

Un altro errore, dovuto alla reazione di amplificazione, è dato dalla tendenza della *Taq polimerasi* di aggiungere all'estremità 3' una *adenina* durante la fase di elongazione (Clark *et al.*, 1988; Magnuson *et al.*, 1996); questo porta all'aggiunta di una base alla reale dimensione dell'allele. Il problema può essere risolto predisponendo un *extension step* finale compreso tra 60°C e 72°C, in modo da favorire l'aggiunta di un nucleotide a tutti i prodotti di PCR e omogeneizzare i risultati (Clarck *et al.*, 1988).

L'"*allele nullo*" rappresenta un'altra tipologia di errore che intercorre durante l'amplificazione ed è dovuto ad una mutazione nel sito di appaiamento dei primer; questo porta alla determinazione, nel caso di campioni omozigoti, della mancata individuazione dell'allele, generando errori di interpretazione. Il rilevante calo della percentuale di eterozigosi all'interno di una popolazione è un chiaro indice della possibile presenza di mutazioni (Schumm *et al.*, 1996).

Le "*shadow bands*" o bande fantasma sono un altro possibile errore nell'uso di marcatori microsatelliti: alla base vi è la ricombinazione erronea dei singoli filamenti durante la fase di elongazione della PCR (Murray *et al.*, 1993). Questo fenomeno genera bande che sono estranee ai normali profili allelici, viene rilevato soprattutto nelle amplificazioni di sequenze con ripetizioni dinucleotidiche utilizzando un alto numero di cicli di PCR.

Nonostante tutto, gli SSR sono la classe di marcatori maggiormente impiegati per la caratterizzazione varietale delle cultivar di olivo e per l'autenticazione. Tali marcatori sono infatti ubiquitariamente distribuiti in tutto il genoma presentando un elevato grado di polimorfismo; sono inoltre riproducibili,

codominanti (permettono, quindi, di discriminare la condizione eterozigote da quella omozigote) e consentono di ottenere profili semplici. Inoltre, risultano essere i più affidabili per effettuare indagini forensi (Jobling e Gill, 2004) e i più adatti per piattaforme analitiche. Diversi gruppi hanno selezionato SSR specifici di olivo che presentano un elevato grado di polimorfismo (Sefc *et al.*, 2000; Rallo *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002; De La Rosa *et al.*, 2002), come riportato in Tabella 1.4. Numerosi sono i lavori presenti in letteratura che si avvalgono di tali strumenti per analizzare il DNA estratto da olio.

Diversi lavori come, quelli di Pasqualone *et al.* (2004, 2007), riportano che è possibile analizzare e confrontare pattern SSR ottenuti da DNA da olio e da foglia delle cultivar, dimostrando che i marcatori SSR sono validi nel verificare la presenza di una specifica cultivar in un olio certificato DOP, verificando così l'identità del prodotto. Essi hanno affermato che era sufficiente un singolo microsatellite (GAPU103A) per distinguere oli ottenuti dalla varietà Leucocarpa da altri campioni. Anche Muzzalupo *et al.* (2007) hanno dimostrato che il profilo SSR ottenuto da olio monovarietale della cultivar 'Ogliarola salentina' corrispondeva al profilo ottenuto dalle foglie della medesima cultivar, nonostante questa fosse autoincompatibile.

Tuttavia, l'analisi con marcatori SSR non è esente da difficoltà. Le sequenze di questi marcatori e la tipologia di olio preso in esame influenzano infatti in maniera significativa l'efficienza dell'analisi (Marmiroli *et al.*, 2009). L'amplificabilità e la corrispondenza tra alleli amplificati da olio o da tessuto fogliare varia in base ai differenti loci SSR considerati, in quanto la lunghezza della sequenza dei microsatelliti risulta essere un parametro critico (Vietina *et al.*, 2011). La possibilità di poter rinvenire nell'olio alleli extra e inattesi è un altro punto controverso per la tracciabilità molecolare; questo fenomeno è dovuto a diversi fattori, quali la possibile contaminazione con DNA di altre cultivar presenti in tracce nei macchinari durante il processo di molitura, la miscelazione accidentale con olive di altre cultivar durante le fasi di raccolta, trasporto e lavorazione, oppure ancora per la presenza nell'olio di DNA embrionale derivante dall'impollinazione allogama (Agrimonti *et al.*, 2011). Il DNA proveniente dall'embrione, frutto dell'interazione tra pianta madre ed impollinatore, può

potenzialmente portare all'amplificazione di alleli che di per sé sono assenti nel genoma della pianta madre e che potrebbero compromettere il risultato delle analisi rendendo così non valida la tracciabilità molecolare nell'olio d'oliva (Muzzalupo *et al.*, 2007).

1.6.3. **Marcatori citoplasmatici: plastidiali e mitocondriali**

L'informazione genetica all'interno di una pianta è contenuta in tre tipi diversi di DNA: il DNA mitocondriale (mtDNA), il DNA plastidiale (cpDNA) e il DNA nucleare. L'informazione portata dai tre tipi di DNA non dipende dalla lunghezza del DNA stesso, dove invece giocano un'importanza fondamentale le modalità di trasmissione e di evoluzione. Infatti il mtDNA ed il cpDNA sono ereditati per via materna, e si evolvono generalmente per ricombinazione o mutazione. Il DNA nucleare, invece, è costituito da metà genoma materno e da metà genoma paterno. Nell'olivo, a differenza delle altre specie appartenenti al genere *Olea*, i geni presentano regioni molto conservate, nella quali non sono presenti inserzioni, delezioni, duplicazioni geniche, sequenze ripetute e assenza di introni. Sono stati effettuati studi sul DNA plastidiale di olivo attraverso i quali sono state ottenute informazioni fondamentali sulla genomica strutturale e funzionale dei plastidi (Mariotti *et al.*, 2010). In olivo, così come per le altre specie arboree da frutto, si ha la presenza di una bassa variabilità genetica all'interno del cromosoma plastidiale. Mariotti *et al.* (2010) in uno studio sui marcatori citoplasmatici, benché abbiano utilizzato marcatori RFLP di DNA cloroplastidico su 72 cultivar di olivo hanno evidenziato la presenza di un genoma plastidiale comune per tutte. Besnard *et al.* (2002) utilizzando due marcatori microsatelliti e 13 RFLP su più di 140 cultivar, hanno identificato solo quattro differenti clorotipi. La disponibilità di sequenze genomiche complete del DNA del cloroplasto, in un numero crescente di specie, offre la possibilità di valutare molti siti potenzialmente polimorfici e di identificare nuove regioni che potrebbero essere utilizzate per caratterizzare le cultivar e per studi su *DNA Barcoding*. La conseguente disponibilità delle sequenze dell'intero plastoma ha consentito la valutazione della composizione della sequenza plastidiale in *O. europaea*, oltre all'individuazione di nuovi polimorfismi che potrebbero discriminare le differenti

cultivar di olivo. Uno studio sul plastoma della cultivar Frantoio (Mariotti *et al.*, 2010) ha evidenziato una lunghezza del genoma di circa 155.889 bp con 144 geni unici e 19 dei quali presenti in duplice copia per un totale di 133 geni (Figura 1.2). Il cloroplasto di olivo mantiene una gamma di dimensioni, organizzazione e ordine dei geni tipico della maggior parte delle piante terrestri. Il basso livello di polimorfismo del cpDNA rilevata fino ad ora, all'interno di cultivar di olivo, rappresenta un serio ostacolo all'ampio uso di marcatori citoplasmatici per la caratterizzazione delle cultivar, l'analisi di parentela e la genetica delle popolazioni. Le cause più probabili del livello di conservazione della sequenza può essere correlato al processo di domesticazione o da un comune capostipite, da cui la maggior parte delle cultivar sono probabilmente derivate.

Nello studio di Bersnard *et al.* (2002), utilizzando 8 cultivar, sono stati identificati 30 nuovi marcatori di cpDNA oltre ai 10 già conosciuti. Infatti, la disponibilità dell'intero genoma cloroplastico e il sequenziamento di regioni candidate hanno portato all'identificazione di nuovi polimorfismi, per lo più rappresentati da sostituzioni nucleotidiche e da riarrangiamenti di diversi microsatelliti. I 40 marcatori applicati su 8 cultivar hanno permesso la loro suddivisione in sei clorotipi diversi. I 10 marcatori noti sono in grado di stabilire inoltre la loro filogenesi individuando i potenziali antenati (Bersnard *et al.*, 2002).

I marcatori citoplasmatici potrebbero fornire un valido contributo alla comprensione dei processi evolutivi ed ecologici coinvolti nell'addomesticazione dell'olivo, nonché per aumentare la conoscenza della funzione dei geni plastidiali sul metabolismo della pianta. Essi potrebbero essere utilizzati per lo screening dei genotipi di olivo, per la valutazione della distribuzione delle cultivar e per determinare meglio le relazioni filogenetiche con le popolazioni selvatiche, e inoltre con altre sottospecie del genere *Olea*. I riarrangiamenti avvenuti all'interno del genoma plastidiale mostrano che le variazioni sono state fissate e mantenute all'interno di cultivar moltiplicate agamicamente. Il ruolo putativo funzionale, che queste mutazioni possono svolgere nel modificare il metabolismo di cultivar e nello sviluppo di adattamenti all'ambiente, potrebbero anche

apportare un ulteriore contributo alla comprensione del background genetico dell'olivo, fornendo approfondimenti sull'evoluzione di fenotipi vegetali.

Tutti i metodi utilizzati per strutturare la diversità genetica si basano sulle frequenze alleliche che risultano essere costanti quando per le analisi si usano i marcatori codominanti. Un metodo utilizzato efficacemente è quello “Bayesiano” per l'analisi del DNA nucleare, con il quale è stato possibile costruire dei raggruppamenti o cluster (sulla base delle deduzioni sulle frequenze alleliche) e verificare in ogni individuo in esame la proporzione del genoma che proviene dai diversi cluster effettuati dal software. Tuttavia, il Metodo Bayesiano può mescolare i dati provenienti sia dal DNA nucleare, dal cpDNA o dal mtDNA. Ovviamente, i vecchi gruppi di dati potrebbero essere trattati con nuovi metodi per ottenere nuove informazioni. Nel 2000, la diversità molecolare nell'olivo selvatico è apparsa profondamente strutturata, questo significa che la distribuzione geografica dei marcatori molecolari nell'olivo selvatico non era omogenea. La struttura genetica (stimata dal F_{st}) si presentava più complessa nel DNA mitocondriale e citoplasmatico rispetto a quella del DNA nucleare. Inoltre, si è visto che questa complessità si manifestava in maniera diversa anche a seconda del luogo in cui erano stati prelevati i campioni; ad esempio, il DNA mt e cp dei campioni prelevati nella parte orientale era meno complessa di quella dei campioni prelevati dalla parte occidentale del Mar Mediterraneo (Breton *et al.*, 2012).

Tabella 1.3 Marcatori molecolari per la tracciabilità delle cultivar in olio d'oliva

Marcatori molecolari	Sviluppatori	Riferimenti
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	Williams et al. (1990)	Muzzalupo e Perri (2002) Martins-Lopes et al. (2008)
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	Vos et al. (1995)	Busconi et al. 2003, Pafundo et al. 2005
SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)	Paran e Michelmore (1993)	De la Torre et al. (2004) Pafundo et al. (2007)
SSRs (Single Sequence Repeats)	Morgante e Olivieri (1993)	Muzzalupo et al. (2007) Pasqualone et al. (2007) Martins-Lopes et al.(2008) Alba et al. (2009)
ISSR (Inter Simple sequence Repeats)	Zietkiewicz et al. (1994)	Pasqualone et al.(2001) Martins-Lopes et al. (2008)
SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	Wang <i>et al.</i> (1998)	Consolandi et al. (2007, 2008) Reale et al. (2006)
Chloroplast and mitochondrial (Direct sequencing)	Botstein et al. (1980)	Pérez-Jimenez et al. (2013)

Tabella 1.4 Lista dei microsatelliti isolati in olivo, molti dei quali utilizzati per la tracciabilità dell'olio d'oliva. Da: Rabiei e Enferadi, 2012.

Serie	Numero	Istituto	Riferimenti
ssrOeUA-DCA	15	Boku, Vienna, Austria	Sefc <i>et al.</i> , 2000
IAS-oli	5	CSIC, Còrdoba, Spagna	Rallo <i>et al.</i> , 2000
GAPU	20	Agrobios, Matera, Italia	Carriero <i>et al.</i> , 2002
UDO	30	Università di Udine, Italia	Cipriani <i>et al.</i> , 2002
EMO	7	ETSIAM, Cordòba, Spagna	De La Rosa <i>et al.</i> , 2002
Totale	77		

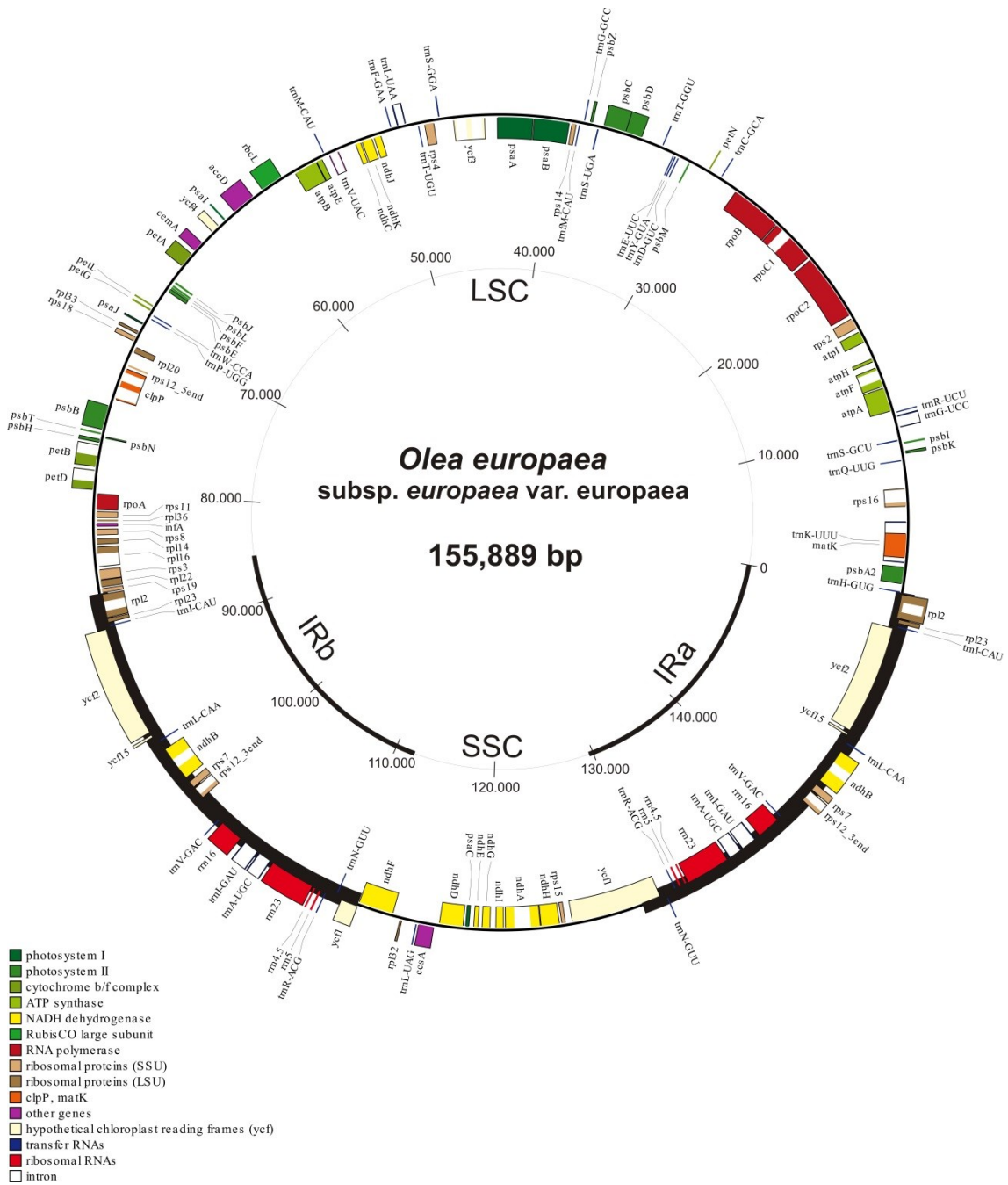


Figura 1.2 Genoma cloroplastico di *Olea europaea* ottenuto mediante sequenziamento diretto delle regioni LSC, SSC e IR (Mariotti *et al.*, 2011).

1.7. Bibliografia

- Agrimonti C., Vietina M., Pafundo S., Marmioli N. (2011). The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science & Technology*. 22, 237-244.
- Alba V., Sabetta W., Bianco A., Pasqualone A., Montemurro C. (2009). Microsatellite Markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *European Food Research and Technology*. 229, 375-382.
- Angelini R., Pisante M., Inglese P., Lercker G. & Ponti I. (2009). L'Ulivo e l'olio. *Script Editore*.
- Angiolillo A., Mencuccini M. and Baldoni L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98: 411-421.
- Arthofer W, Steiner FM, Schlick-Steiner BC (2011) Rapid and cost-effective screening of newly identified micro satellite loci by high resolution melting analysis. *Mol Genet Genomics* 286: 225–235.
- Ateyyeh A.F., Stosser R. & Qrunfleh M. (2000). Reproductive biology of the olive (*Olea europae* L.) cultivar "Nabali Baladi". *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* 74, 255-270.
- Baldoni L., Belaj A. (2009). Olive. In: Vollmann J, Rajean I (eds) Oil crops. *Handbook of plant breeding*. Vol 4. Springer Science + Business Media, New York. 397–421. doi 10.1007/978-0-387-77594-4_13.
- Barone E, Di Marco L, Motisi A & Caruso T (1993) The Sicilian olive germplasm and its characterization by using statistical methods. *Acta Horticulturae* 356: 66-69.
- Bartolini G. (2008). *Olea* databases. Disponibile su: <http://www.oleadb.it>.
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G., Menini U. (1998). *Olive germplasm: Cultivars and world-wide collections*. FAO, Rome
- Belaj A., Munoz-Diez C., Baldoni L., Porceddu A., Barranco D. and , Satovic Z. (2007). Genetic diversity and population structure of wild olives from the North-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann Bot* 100:449-458.
- Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., et al. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 736-744.
- Bellini E., Giordani E., Nin S. (2003). Genetica e miglioramento. In P. Fiorino (A cura di), *Olea – Trattato di olivicoltura*. (p. 113-143). Edagricole.
- Ben-Ayed R., Grati-Kamoun N., Sans-Grout C., Moreau F., Rebai A. (2011). Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. *European Food Research and Technology*. 234, 263-271.
- Besnard G, Khadari B, Baradat P. and , Berville A. (2002). Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasm genetic differentiation in the olive

- complex (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 2002, 105(1):139-144.
- Besnard G, Khadari B, Baradat P. and , Berville A. (2002). Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasm genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 2002, 105(1):139-144.
- Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B., & B. A. (2001b). Cultivar identification in the olive *Olea europaea* L. based on RAPDs. *J Am Hort Sci* , 126, 668–675.
- Björklund M. (2005) A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop-out. *Molecular Ecology Notes* 3: 676-679.
- Bonaga G., Frega N. (1997). Le fonti e le caratteristiche dei lipidi alimentari. In “Manuale degli oli e dei grassi”. P. Capella, E. Fedeli, G. Bonaga, G. Lercker. (A cura di). Ed. Tecniche Nuove, Milano, 31-61.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32, 314 – 331.
- Bottari, V., Spina, P., 1952. Le varietà di olivo coltivate in Sicilia. *Annu. Sper. Agric.* 7, 937e1004.
- Bracci T., Busconi M., Fogher C., Sebastiani L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea Europea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*. 30, 449 - 462.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., & Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Rep* (30), 449-462.
- Breton C, Pinatel C, Medail F and Bonhomme F (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. *Plant. Sci.* 175: 524-532.
- Breton C., Warnock P. and Bervillè A.J. (2012). Olive Germplasm, The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. Rijeka, Croatia. *InTech* pag: 3-22.
- Breton, C., Claux, D., Metton, I., Skorski, G., & Bervillè, A. (2004). Comparative Study of Methods for DNA Preoartation from Olive Oil Samples to Identify SSR Alleles in Commercial Oil Samples: Possible Forensic Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 52, 531-537.
- Breviglieri N., Battaglia E. (1954). Ricerche cariologiche in *Olea europaea* L. *Caryologia*. 2-3, 271-283.
- Brookes AJ. (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
- Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorno C., Cattapan F., Fogher C. (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry*. 83, 127-134.
- Busconi M., Sebastiani L. and , Fogher C. (2006). Development of SCAR markers for germplasm characyerisation in olive tree. *Mol Breed* 17:59-68.
- Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorno, C., Cattapan, F., & Fogher, C. (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry* , 83, 127-134.

- Busconi, M., Sebastiani, L., Fogher, C. (2006). Development of SCAR markers for germplasm Characterisation in Olive tree (*Olea europaea* L.). *Molecular Breeding*. 17 (1), 59-68.
- Cantini C., Cimato A., Sani G. (1999). Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica*. 109, 173-181.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., & Giorio, G. (2002). Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* , 104, 301-307.
- Caruso T., Rotundo A. and Sebastiani L. (2009). *Coltura e Cultura, l'ulivo e l'olio*, BayerCropScience.
- Cecchini G. (1952) - *L'identificazione del legnami*, Hoepli, Milano.
- Chagne D, Gasic K, Crowhurst RN, Han Y, Bassett HC, et al. (2008). Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics* 92: 353–358.
- Chiapparono E., Lee D., Donini P. (2004) Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 47: 414–420.
- Chiappetta A., Bruno L., Muzzalupo I. (2014). Omics Approaches for the Characterization and Valorisation of Olive Varieties. In: *Agricultural and Food Biotechnology of Olea europaea and Stone Fruit*, (p: 75-108). Eds: Innocenzo Muzzalupo and Sabrina Micali. Bentham Science Publishers.
- Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., Cimato, A. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor Appl Genet* , 104, 223-228.
- Clark A.G. (1990) Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Molecular Biology and Evolution* 7: 111-122.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Doveri, S., Maestri, E., Marmiroli, N., Reale, S., et al. (2007). Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format. *Journal of Biotechnology* (129), 565-574.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Servergnini, M., Maestri, E., Marmiroli, N., Agrimonti, C., et al. (2008). A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *Eur Food Res Technol* , 227, 1429-1438.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Servergnini, M., Maestri, E., Marmiroli, N., Agrimonti, C., et al. (2008). A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *Eur Food Res Technol* , 227, 1429-1438.
- Cuevas j. & Polito V.S. (2004). The role of staminate flowers in the breeding system of *Olea europaea* L. (*Oleaceae*): an andromonoecious, wind-pollinated taxon. *Annals of Botany* 93, 547-553.
- De La Rosa R., James C.M. and , Tobutt K.R. (2002). Isolation and characterisation of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleaceae*. *Mol Ecol* 2:265-267.
- De la Torre F., Bautista R., Cánovas F.M., Claros G. (2004). Isolation of DNA from *olive*

- oil* and oil sediments: application in oil fingerprinting. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. Vol. 2, 84-9.
- Diaz, A.; Martin, A.; Rallo, P.; Barranco, D. & De la Rosa, R. (2006). Self-incompatibility of ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive assessed by SSR markers, *J Am Soc Hortic Sci*. Vol.131, pp. 250–255
- Distefano G., Caruso M., La Malfa S., Gentile A., Wu S-B. (2012) High Resolution Melting Analysis is a more sensitive and effective alternative to gel-base platforms in analysis of SSR – An example in Citrus. *Plos One* 7:(8) e44202. Doi:10.1371/journal.pone.0044202
- Doveri S., O’Sullivan D.M., Lee D. (2006). Non-concordance between Genetic Profiles of Olive Oil and Fruit: a Cautionary Note to the Use of DNA Markers for Provenance Testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 9221-9226.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*. 19, 11-15.
- Endean D., Pirelli K., Lee S.B., Duda N., Ma M., Schumm J.W. (1996) Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. *J Forensic Sci*. 41: 582-590.
- Enferadi S.T., Rabiei Z. (2013). Challenges for Genetic Identification of Olive Oil. In: *The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive*. Edited by Danijela Poljuha and Barbara Sladonja, ISBN 978-953-51-1067-5, 322 pages. Publisher: InTech, Chapters published April 10, 2013 under CC BY 3.0 license. DOI: 10.5772/3442
- Enferadi S.T., Rabiei Z. (2013). Challenges for Genetic Identification of Olive Oil. In: *The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive*. Edited by Danijela Poljuha and Barbara Sladonja, ISBN 978-953-51-1067-5, 322 pages. Publisher: InTech, Chapters published April 10, 2013 under CC BY 3.0 license. DOI: 10.5772/3442
- Erre, P., Chessa, I., Munoz-Diez, C., Belaj, A., Rallo, L., & Trujillo, I. (2010). Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR marker. *Gnet Resour Crop Evol*, 57, 41-54.
- Fabbri A., Bartolini G., Lambardi M., e S. G. Kailis (2004). *Olive Propagation Manual*. Landlinks, Collingwood, Vic.
- Fabbri A., Hormazy J.J. and Polito V.S. (1995). Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*O. europea* L.) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 538-542.
- Fabbri A., Lambardi M., Ozden-Tokatli Y. (2009). Olive breeding. In: Mohan Jain S., Priyadarshan PM (eds) *Breeding plantation tree crops: tropical species*. Springer Science + Business Media LLC. New York, 423-68.
- Filo della Torre R. (2009). Italia delle DOP. In AA.VV., *L’ulivo e l’olio* (p. 716-732). Bologna: Ed. Script.
- Fiorino P., e Mancuso S. (2003). Tecniche di propagazione e vivaismo. In *“Olea. Trattato di olivicoltura” Edagricole, Bologna*.
- Fornaciari da Passano M., Barone E., Romano B. (2009). Caratteristiche botaniche. In AA.VV., *L’ulivo e l’olio* (p. 2-23). Bologna: Ed. Script.
- Ganino T, Beghè D, Valenti S, Nisi R, Fabbri A (2007). RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia

- region, Northern Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54(7): 1531-1540.
- Ganopoulos I, Argiriou A, Tsaftaris A (2011) Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control* 22: 532–541.
- Gemas VJV, Almadanim MC, Tenreiro R, Martins A, Fevereiro P (2004). Genetic diversity in the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 51:501-511.
- Gibson G., Spencer V. (2002) *Introduzione alla genomica* Cap., 5 pp. 223-271 Zanichelli
- Gibson W.T., Farooqi I.S., Moreau M., Depaoli A.M: Lawrence E., O'Rahilly S., Trussell R.A. (2004). Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the Delta133G mutation: report of another case and evaluation of response to four years of leptin therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(10), 4821 – 4826.
- Giménez, M.J.; Pistón, F.; Martín, A. & Atienza, S.G. (2010). Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication, *Food Chemistry*, Vol.118, pp. 482–487
- Gomes, S., Martins-Lopes, P., Lopes, J., & Guedes-Pinto, H. (2009). Assessing Genetic Diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers. *Plant Mol Biol Rep* , 27, 365-373
- Green P.S.(2002). A revision of *Olea* L (Oleaceae). *Kew Bulletin.* 140, 57-91
- Gucci R., Tattini M. (1997). Salinity tolerance in olive. *Horticultural Reviews.* 21, 177-213.
- Hakim, I. R., Kammoun, N. G., Makhloufi, E., & Rebai, A. (2010). Discovery and Potential of SNP Markers in Characterization of Tunisian Olive Germplasm. *Diversity* (2), 17-27.
- Hellebrand, M., M., N., & Morsel, J. (1998). Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Z. Lbensm. Unters. Forsh. A.* (206), 237-242.
- Hernandez, P., De La Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G., Martín, A., 2001. Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theor. Appl. Genet.* 103, 788e791.
- Hoffman J.I., Amos W. (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches commonsources and consequences for paternal exclusion. *Mol Ecol.* 14: 599-612.
- Holliday R, Grigg GW. 1993. DNA methylation and mutation. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mugag* 285:61–67.
- Jin Q., Waters D., Cordeiro G.M., Henry R.J., Reinke R.F. (2003) A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Sci.* 165: 395-364.
- Jobling MA., Gill P. (2005) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet* 6(3), 246.
- Kumar S., Kahlon T., Chaudhary S. (2011). A rapid screening for adulterants in olive oil using DNA barcodes. *Food Chemistry.* 127, 1335–1341.
- Kushi L.H., Lenart L.B., Willet W.C. (1995). Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods and dairy products. *American Journal*

- of Clinical Nutrition*. 61 (Suppl), 1407S–1415S.
- Las Casas G., Scollo F., Distefano G., Continella A., Gentile A., La Malfa S. (2014) Molecular characterization of olive (*Olea europaea* L.) Sicilian cultivars using SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 57, 15–19.
- Lavee S. (1985). 'Olea europaea'. In: Halevy, A.H. (Ed.). Handbook of Flowering. CRC Press, Boca Raton Fl. pp. 423-434.
- Lavee S. (1996) - *Biologia e fisiologia dell'olivo*. In: Enciclopedia mondiale dell'olivo. COI, Madrid. pp. 61-110.
- Lehmensiek A, Sutherland M, McNamara R (2008) The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 117: 721–728.
- Lombardo N. (2003). Aspetti generali dell'olivicultura. In P. Fiorino (A cura di), *Olea – Trattato di olivicultura* (p. 3-11). Edagricole
- Mackay JF, Wright CD, Bonfiglioli RG (2008) A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods* 4: 8.
- Mader E, Lukas B, Novak J (2008) A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC Genet* 9: 69.
- Magnuson V.L., Ally D.S., Nylund S.J., Karanjawala Z.E., Rayman J.B., Knapp J.I., Lowe A.L., Ghosh S., Collins F.S., (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping and cloning. 21: 700- 709
- Manzelli P. (2004). Sicurezza Alimentare Relazioni tra nuove professioni ed antica cultura.
- Mariotti R., Cultrera N., Munoz Diez C., Baldoni L. and Rubini A. (2010) Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives (*Olea europaea* L.) through plastome sequence comparison. *BMC Plant biology*, 10:211. doi: 10.1186/1471-2229-10-211
- Marmioli, N., Maestri, E., Pafundo, S., & Vietina, M. (2009). Molecular traceability of olive oil: from plant genomics to food genomics. *Advances in Olive Resources* .
- Marmioli, N., Maestri, E., Pafundo, S., & Vietina, M. (2009). Molecular traceability of olive oil: from plant genomics to food genomics. *Advances in Olive Resources* .
- Marmioli, N., Maestri, E., Pafundo, S., & Vietina, M. (2009). Molecular traceability of olive oil: from plant genomics to food genomics. *Advances in Olive Resources*.
- Marmioli, N., Maestri, E., Pafundo, S., Vietina, M. (2009). Molecular traceability of olive oil: from plant genomics to food genomics. In: L. Berti, & J. Maury (Eds.), *Advances in olive resources* (pp. 157-172). Kerala (India). Transworld Research Network.
- Martin G.C. & Sibbet G.S. (2005). Botany of the olive. *University of California, Agriculture and Natural Resources*, 15-19.
- Martin G.C., Ferguson L. & Sibbet G.S. (2005). Flowering, pollination, fruiting alternate bearing and abscission. *University of California, Agriculture and Natural Resources*, 49-54.

- Martins-Lopez P., Gomes S., Santos E., Guedes-Pinto H. (2008). DNA Markers for Portuguese Olive Oil Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 11786-11791.
- Montemurro C., Pasqualone A., Simeone R., Sabetta W., Blanco A. (2008). AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *European Journal of Food Research and Technology*. 226, 1439-1444.
- Morettini A. (1950). Olivicoltura (seconda edizione). *Ramo Editoriale degli Agricoltori*.
- Morettini A. (1972) - *Olivicoltura*. REDA, Roma.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*. 3, 175-182.
- Muleo R., Colao M.C., Miano D., Cirilli M., Intrieri M.C., Baldoni L. and Rugini E. (2009). Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome*, 52 (3), pp. 252-260.
- Muleo R., Colao M.C., Miano D., Cirilli M., Intrieri M.C., Baldoni L. and Rugini E. (2009). Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome*, 52 (3), pp. 252-260.
- Murray V., Monchawin C., England P.R. (1993) The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 2395-2398.
- Murray V., Monchawin C., England P.R. (1993) The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 2395-2398.
- Muzzalupo I., Micali S. (2014). Agricultural and Food Biotechnology of *Olea europaea* and Stone Fruit, 2014. Eds: Innocenzo Muzzalupo and Sabrina Micali. Bentham Science Publishers.
- Muzzalupo I., Pisani F., Greco F., Chiappetta A. (2015) Direct DNA amplification from virgin olive oil for traceability and authenticity. *European Food Research and Technology*. 241, 151-155.
- Muzzalupo, I., & Perri, E. (2002). Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *Eur Food Res Technol*, 214, 528-531.
- Muzzalupo, I., Pellegrino, M., & Perri, E. (2007). Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *Eur Food Res Technol* (224), 469-475.
- Muzzalupo, I., Pellegrino, M., & Perri, E. (2007). Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *Eur Food Res Technol* (224), 469-475.
- Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Salimonti, A., Falabella, R., & Perri, E. (2009). Microsatellite Markers for Identification of a Group of Italian Olive Accessions., 66, pp. 685-690. Piracicaba, Braz.
- Negrini R., Nicoloso L., Crepaldi P., Milanese E., Marino R., Perini D., Pariset L., Dunner S., Leveziel H., Williams J.L., Ajmone Marsan P. (2008). Traceability of four European Protected Geographic Indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. *Meat Science*. 1212-1217.
- Oliver RE, Lazo GR, Lutz JD, Rubenfield MJ, Tinker NA, et al. (2011) Model SNP development for complex genomes based on hexaploid oat using highthroughput 454

- sequencing technology. *BMC Genomics* 12: 77.
- Pafundo, S., Agrimonti, C., & Marmiroli, N. (2005). Traceability of Plant Contribution in Olive Oil Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6995-7002.
- Pafundo, S., Agrimonti, C., Maestri, E., & Marmiroli, N. (2007). Applicability of SCAR Markers to Food Genomics: Olive Oil Traceability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6052-6059.
- Pafundo, S., Busconi, M., Agrimonti, C., Fogher, C., & Marmiroli, N. (2010). Storage-time effects on olive oil DNA assessed by Amplified Fragments Length Polymorphisms. *Food Chemistry*, 123, 787-793.
- Paran, I., Michelmore, R. (1993). Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol.85, 985-993.
- Pasqualone, A., Montemurro, C., Caponio, F., & Blanco, A. (2004). Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites. *J. Agric. Food Chem.* (52), 1068-1071.
- Pasqualone, A., Montemurro, C., Summo, C., Sabetta, W., Caponio, F., & Blanco, A. (2007). Effectiveness of Microsatellite DNA Markers in Checking the Identity of Protected Designation of Origin Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3857-3862.
- Pérez-Jiménez F., Ruano J., Perez-Martinez P., Lopez-Segura F., Lopez-Miranda J. (2007). The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 1199-1208.
- Pérez-Jiménez M., Besnard G., Dorado G., Hernandez P. (2013). Varietal Tracing of Virgin Olive Oils Based on Plastid DNA Variation Profiling. *PLoS ONE* 8 (8): e70507. Doi:10.1371/journal.pone.0070507.
- Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Vincieri F.F., Cimato A., Romani A. (2003). Minor polar compound and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*. 80, 331-336.
- Pisante M., Inglese P., Lercker G., (Eds)2009. Germoplasma e varietà. In L'ulivo e l'olio. Ed Script, Bologna. Bayer Crop Science.
- Proietti, P., Tombesi A. (1996) Translocation of assimilates and source-sink influences on productive characteristics of the olive tree. *Adv. hort. Sci.* 10: 11-14.
- Rabiei Z, Enferadi S.T. (2012). Traceability of Origin and Authenticity of Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. Dr Dimitrios Boskou (Ed.), ISBN: 978-953-307-921-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/olive-oilconstituents-quality-health-properties-and-bioconversions/traceability-of-origin-and-authenticity-of-olive-oil-by-molecular-approaches>.
- Rafalski J.A., Vogel J.M., Morgante M., Powell W., Andre C., Tingey S.V. (1996) Generating and using DNA markers in plants in: Biren B. Lai E. (Eds.) Nonmammalian genomic analysis. A practical guide Academic Press San Diego pp.75-134.
- Rafalsky A. (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinon in Plant Biology* 5,94-100

- Rallo, P., Dorado, G., & Martin, A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 984-989.
- Rao R., Caramante M., Blanco A., Lanteri S., Lucchin M., Mazzucato A. (2009). Innovazioni genetiche per l'identificazione e la protezione di prodotti tipici italiani. *Italian Journal of Agronomy / Rivista di Agronomia*. 3, Suppl:93-99.
- Reale S., Doveri S., Diaz A., Angiolillo A., Lucentini L., Pilla F., Martin A., Domini P. and Lee D. (2006). SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* 49:1193-1205.
- Reale, S., Doveri, S., Diaz, A., Angiolillo, A., Lucentini, L., & Pilla, F. (2006). SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* (49), 1193-1205.
- Rugini E., Baldoni L. (2011). Biotecnologie. Collana Divulgativa dell'Accademia. Vol. III. A cura di E. Rugini e L. Baldoni. Realizzazione editoriale: Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olio.
- Secchiari P., Serra A., Mele M., Conte G., Casarosa L. (2008). Tracciabilità e valorizzazione delle produzioni ovine e caprine. Supplemento *Large Animal Review*. 14, 83-85.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendonca, D., Rodrigues Dos Santos, M., Laimer Da Camara Machado, M., and Da Camara Machado, A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9 : 1171-1173. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.00954.x. PMID:10964237.
- Spaniolas S., Bazakos C., Ntourou T., Bihmidine S., Georgousakis A., Kalaitzis P. (2008). Use of lambda DNA as a marker to assess DNA stability in olive oil during storage. *European Food Research and Technology*. 227, 175-179.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 24: 3189-3194
- Testolin R., Lain O. (2005). DNA Extraction from Olive Oil and PCR Amplification of Microsatellite Markers. *Journal of Food Science*. 70, 108-112.
- Testolin, R., & Lain, O. (2005). DNA Extraction from Olive Oil and PCR Amplification of Microsatellite Markers. *Journal of Food Science*, 70(1), 108-112.
- Vellinga A., Van Look F. (2002). The dioxin crisis experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis. *Emerging Infectious Diseases*. 8, 19-22.
- Vietina M. (2008). Il contributo delle biotecnologie alla "Carta di identità" dell'olio di oliva. Tesi di Dottorato. Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali. Università degli studi di Parma.
- Vietina M., Agrimonti C., Bonas U., Marmiroli M., Marmiroli N. (2011). Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.4317.
- Wahrburg U., Kratz M., Cullen P. (2002). Mediterranean diet, olive oil and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104, 698-705.
- Wang D.G., Fan J.B., Siao C-J., Berne A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N.,

- Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L. et al. (1998). Large scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* . 280, 1077-1082.
- White HE, Hall VJ, Cross NCP (2007) Methylation-sensitive high resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader- Willi and Angelman syndromes. *Clin Chem* 53: 1960–1962.
- Willesmith J.W. (1996). Recent observations on the epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. In: C.J. Gibbs (Ed). *Bovine spongiform encephalopathy: the BSE dilemma* (pp. 45-58). New York: Springer.
- Willett W.C., Sacks F., Trichopoulou A., et al. (1995). Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *American Journal of Clinical Nutrition*. 61 (Suppl), 1402S–1406S.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Research*. 18, 6531-6535.
- Woolfe M., Primrose S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *TRENDS in Biotechnology*. Vol.22. No.5, 222-226.
- Wu S-B, Tavassolian I, Rabiei G, Hunt P, Wirthensohn M, et al. (2009) Mapping SNP-anchored genes using high-resolution melting analysis in almond. *Mol Genet Genomics* 282: 273–281.
- Wu S-B, Wirthensohn MG, Hunt P, Gibson JP, Sedgley M (2008) High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theor Appl Genet* 118: 1–14.
- Zhang Y., Stommel J.R. (2001). Development of SCAR and CAPS markers linked to the beta gene in tomato. *Crop Science*. 41, 1602-1608.
- Zietkiewicz E.; Rafalski A., Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. Vol.20, 176–183

CAPITOLO 2

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CULTIVAR DI OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) SICILIANE ED ESTERE CON MARCATORI MICROSATELLITI (SSR)

2.1. Abstract

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle più importanti piante arboree da frutto a vivere nel bacino del Mediterraneo, con una produzione destinata principalmente all'estrazione di olio. In Sicilia, luogo in cui l'olivo è stato coltivato fin dai tempi antichi, il germoplasma autoctono è caratterizzato da un'ampia diversità genetica, dovuta a un addomesticamento e diffusione in tempi antichi e dalle caratteristiche biologiche e riproduttive della specie, quali l'auto-incompatibilità. L'analisi di caratterizzazione molecolare è stata condotta su 65 genotipi con lo scopo di caratterizzare una grande quantità di accessioni siciliane (47 genotipi) e di confrontarle con varietà italiane e le più importanti cultivar straniere presenti nel bacino del Mediterraneo. Per questo lavoro sono stati utilizzati 8 marcatori microsatelli SSR (Single Sequence Repeat), i quali hanno permesso di rilevare un totale di 74 alleli e di identificare una media di 19.5 genotipi. I risultati ottenuti hanno evidenziato una variabilità maggiore rispetto quell'attesa. In particolare, sono state confermate alcune sinonimie già riportate in letteratura; ma anche sono state discriminate alcune cultivar considerate identiche, come nel caso di Castriciana, Ogliarola messinese e Passalunara. Lo studio ha permesso di rivelare un'ampia variabilità intraspecifica all'interno del pool genetico esaminato, indipendentemente dall'origine geografica.

2.2. Introduzione

L'olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) è una delle specie arboree da frutto economicamente più importanti e una delle più diffuse nel bacino del Mediterraneo. La pianta è caratterizzata da un'allogamia prevalente e da una grande longevità, fattori che hanno determinato elevati livelli di eterozigosi (Rallo *et al.*, 2000) così come l'accumulo di mutazioni all'interno del genoma (Lopes *et al.*, 2004; Baali-Cherif e Besnard, 2005). Le diverse condizioni pedoclimatiche e la propagazione sessuale e agamica, hanno dato luogo ad un ricco germoplasma e alla selezione di un gran numero di cultivar presenti nei principali paesi produttori di olio d'oliva (Baldoni & Belaj, 2009). Tuttavia, questa ricca biodiversità comporta spesso oggettive difficoltà d'identificazione del materiale vegetale a causa della presenza di sinonimie e omonimie (Bartolini, 2007). Tra i paesi olivicoli, l'Italia possiede circa 600 diverse accessioni, le quali rappresentano una grossa parte della totalità del germoplasma olivicolo mondiale (Bartolini *et al.*, 2005). In Sicilia, l'olivo è stato ampiamente coltivato fin dalla sua antichità, inoltre gli olivastri sono una delle componenti importanti della macchia mediterranea (Zohary & Hopf, 1994). La Sicilia nella sua diversa composizione e nella pluralità degli ambienti di coltivazione offre una serie di condizioni di crescita favorevoli per l'olivo, in relazione alle svariate condizioni climatiche e edafiche sono state accumulate un ampio numero di accessioni (Bottari & Spina, 1952). Inoltre, il germoplasma olivicolo siciliano si caratterizza per la presenza di variabilità intra-cultivar, un fenomeno ampiamente è riscontrato in moltissime accessioni italiane ed estere, dove piante con la stessa manifestazione fenotipica, mostrano piccole differenze genetiche (Lopes *et al.*, 2004; Muzzalupo *et al.*, 2011; Ipek *et al.*, 2012). L'utilizzo di marcatori biochimici e molecolari risulta essere fondamentale per effettuare studi sulla variabilità genetica del germoplasma vegetale. Studi di caratterizzazione genotipica e genetica delle popolazioni su olivo sono stati pubblicati in diversi lavori mediante l'utilizzo di diversi marcatori molecolari: AFLPs (Angiolillo *et al.*, 2006), SCARs (Hernandez *et al.*, 2001; Bautista *et al.*, 2003), ISSRs (Gomes *et al.*, 2009) and

SNPs (Muleo *et al.*, 2009; Hakim *et al.*, 2010). Negli ultimi anni, una serie di marcatori microsatelliti SSR, ampiamente utilizzati per l'identificazione genetica e la discriminazione di cultivar, sono stati identificati e isolati in olivo (Sefc *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002). I microsatelliti rappresentano, oggi, un importante strumento al fine dell'identificazione varietale e hanno trovato recenti applicazioni anche nella valutazione della variabilità inter e intra-cultivar (Belaj *et al.*, 2008; Roubos *et al.*, 2010; Ercisli *et al.*, 2011).

In questo lavoro, sono stati studiati mediante l'ausilio di marcatori microsatelliti la variabilità genetica e le relazioni parentali tra 47 accessioni di olivo siciliano in confronto con 18 accessioni provenienti da altre regioni italiane e paesi del Mediterraneo al fine di fornire uno strumento affidabile e inequivocabile per la caratterizzazione del germoplasma olivicolo.

2.3. Materiali e Metodi

2.3.1. Materiale vegetale e estrazione del DNA

In questo lavoro, 47 cultivar siciliane sono state analizzate e confrontate con 10 tra le più rappresentative cultivar italiane e 8 varietà rappresentative di altri paesi del Mediterraneo (Tabella 2.1). Ventiquattro cultivar siciliane sono state campionate presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania (37°24'41"N; 15°03'15"E), in cui sono state conservate la maggior parte delle accessioni descritte da Bottari e Spina (1952). Tutte le altre accessioni oggetto di analisi (41) sono state raccolte presso il Campo Collezione Germoplasma di Olivo "CNR-ISAFOM" e "Provincia Regionale di Enna" (37° 30'52"N; 14°17'46" E). Sono state campionate giovani foglie, di queste circa 100 mg di tessuto fresco sono state triturate utilizzando il Qiagen Tissuelyser II (Qiagen, Hilden, Germania). Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit di estrazione *DNA Mini Kit* (Bioline, Londra, UK). La quantità e qualità del DNA isolato sono state, invece, verificate mediante spettrofotometria con il NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham,

Massachusetts, Stati Uniti d'America), dove sono state calcolate la concentrazione ng/ μ l, i rapporti 260/280 e 260/230.

Tabella 2.1 Cultivar di olivo caratterizzate analizzate con marcatori SSR (Azienda Agraria Sperimentale (ASA) Università degli Studi di Catania; Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo C.da Zagaria – Enna realizzato da CNR-ISAFOM e Provincia Regionale di Enna).

Nome	Origine	Campo Collezione
'Abunara'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Aitana'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Biancolilla'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Bottone di gallo'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Brandofino'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Buscionetto'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Calamignana'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Calatina'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Castriciana'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Cavaliera'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Cerasuola'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Erbano'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Giarfara'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Giarraffa'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Gioconda'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Lumiario'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Mandanici'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Marmorina'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Minuta'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Monachella'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Montonica'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Moresca'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Morghetana'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Nasitana'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Nerba'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Nocellara del Belice'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Nocellara Etnea'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Nocellara messinese'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania

Nome	Origine	Campo Collezione
'Occhiolà'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Ogliarola messinese'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Olivo di Castiglione'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Passalunara'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Randazzese'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Riondello'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Rizza'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'S. Benedetto'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Santagatese'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Tonda Iblea'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Tortella'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Tur dunazza'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Vaddarica'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Verdella'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Verdello grosso'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Vir disa'	Italia (Sicilia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Zaituna'	Italia (Sicilia)	ASA Università degli Studi di Catania
'Bella di Cerignola'	Italia (Puglia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Cellina di Nardò'	Italia (Puglia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Cipressino'	Italia (Puglia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Coratina'	Italia (Puglia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Ogliarola leccese'	Italia (Puglia)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Carolea'	Italia (Calabria)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Dolce di Rossano'	Italia (Calabria)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Grossa di Gerace'	Italia (Calabria)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Leucocarpa'	Italia (Calabria)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Ottobratica'	Italia (Calabria)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Frantoio'	Italia (Toscana)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Leccino'	Italia (Toscana)	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Koroneiki'	Grecia	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Picholine marocaine'	Marocco	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Arbequina'	Spagna	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo

Nome	Origine	Campo Collezione
'Arbosana'	Spagna	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Manzanilla'	Spagna	ASA Università degli Studi di Catania
'Picudo'	Spagna	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Chemlali'	Tunisia	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo
'Chetoui'	Tunisia	Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo

2.3.2. Analisi SSR

Otto loci SSR, su dieci che ne erano stati originariamente valutati, sono stati selezionati per l'analisi: *ssrOeUA-DCA3*, *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUADCA16*, *GAPU59*, *GAPU101*, *UDO99-008*, *UDO99-012*, *UDO99-024* (Tabella 2.2). La scelta è stata effettuata in base al grado di polimorfismo, nonché alla chiarezza e riproducibilità dei frammenti di DNA amplificati e dei profili in elettroforesi capillare (EC). Le amplificazioni sono state eseguite in un volume finale di 15 µl contenente circa 30 ng di DNA genomico, 1X NH4 Reaction Buffer (Bioline), 0.2 mM dNTP (Bioline), 1 mM MgCl₂, 0.167 nM di forward e reverse primer, 0.13 nM di M₁₃F marcato con un colorante fluorescente (6-FAM, NED e PET; MWG Operon, Ebersberg, Germania) 1 U di *Taq polimerasi* (Bioline). L'amplificazione è stata effettuata in due termociclatori (GeneAmp PCR 9700 e 2700 System - Applied Biosystems, Foster City, USA) con una denaturazione iniziale di 94 °C per 5 minuti, seguita da 40 cicli di 94 °C per 30 s, annealing 53 °C per 30 s e 72 °C per 45 s, con una estensione finale a 72°C per 15 min. Un'aliquota compresa tra 0.4 - 0.6 µl di prodotto di PCR (a seconda delle prestazioni di amplificazione di ciascuna coppia di primer) è stato posto in miscela con 13 µl di formammide e 0,3 µl di size standard LIZ-500, il quale poi è stato denaturato a 95 °C per 5 min e posto in ghiaccio per tre minuti, al fine di denaturare il prodotto amplificato e analizzare in elettroforesi capillare. Diverse combinazioni di marcatori sono stati analizzati contemporaneamente, fino a tre prodotti PCR marcati con tre differenti fluorofori FAM, PET o NED. Le dimensioni dei prodotti PCR, amplificati e così processati, sono state osservate in elettroforesi capillare utilizzando il sequenziatore ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e analizzati mediante il software GeneMapper 4.0. Tutti i campioni sono stati analizzati

con la stessa metodologia e nelle stesse condizioni per rendere i risultati comparabili.

2.3.3. Analisi dei dati

La distanza genetica tra le accessioni in analisi, calcolata comparando i profili elettroforetici, è stata elaborata con il software PowerMarker Versione 3.25 (Liu et Muse, 2005), il quale è stato utilizzato dapprima per generare da una matrice binaria una matrice delle distanze, utilizzando il coefficiente *shared alleles*, e in fine costruire un albero filogenetico utilizzando l'algoritmo *Neighbor-joining* (Saitou et Nei, 1987); questa tipologia di analisi è stata già utilizzata da altri autori per la valutazione genetica di collezioni di germoplasma (Dangl et al., 2001; Barkley et al., 2006). L'albero filogenetico ottenuto mediante un indice di dissimilarità con il software DARwin 5.0 (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006) ha previsto l'analisi di riproducibilità attraverso un *bootstrap* 1000. Altre analisi genetiche sono state elaborate col software PowerMarker (Liu e Muse, 2005), al fine di valutare la performance dei marcatori utilizzati. In fine sono stati calcolati: la maggiore frequenza allelica; il numero di genotipi discriminati; il numero di alleli per locus; l'eterozigosi osservata (H_o) e l'indice di polimorfismo osservato (PIC). In particolare, il PIC è un indice che può variare da 0 (locus monomorfo) a 1 (altamente polimorfo e discriminante), fornendo una indicazione importante sul potere discriminante di un dato marcatore, non solo per il numero di alleli discriminati, ma anche per la frequenza relativa degli alleli analizzati (Botstein *et al.*, 1980).

Tabella 2.2 Sequenza dei primer, motivo ripetuto, lunghezza (bp) del frammento amplificato (M13F: 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3')

Source	Locus	Primer Sequence (5' to 3')		Repeat motif	Peso Molecolare (bp) range (bp)
		Forward	Reverse		
Sefc <i>et al.</i> (2000)	ssrOeUA-DCA3*	M13F- CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC	TGCTTTTGTTCGTGTTTGAGATGTTG	(GT) ₁₉	246-274
	ssrOeUA-DCA9*	M13F- AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG	GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	(GT) ₂₃	181-231
	ssrOeUA-DCA16*	M13F- TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG	TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	140-250
Carriero <i>et al.</i> (2002)	GAPU59	M13F-CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA	CAAAGGTGCACTTTCTCTCG	(CT) ₉	220-248
	GAPU101*	M13F-CATGAAAGGAGGGGACATA	GGCACTTGTGTGCAGATTG	(GA) ₈ (GA) ₃ (AG) ₃	201-238
Cipriani <i>et al.</i> (2002)	UDO99-008	M13F-AAAAACACAACCCGTGCAAT	AAATTCCTCCAAGCCGATCT	(AC) ₁₃	174-188
	UDO99-012	M13F-TCACCATTTCTTAACCTCACACCA	TCAAGCAATTCCACGCTATG	(GT) ₁₀	174-186
	UDO99-024	M13F- GGATTTATTAAGCAAAACATACAAA	CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA	(CA) ₁₁ (TA) ₂ (CA) ₄	184-218

*Primer raccomandati in accordo con Bartolini (2007)

2.4. Risultati

I microsatelliti impiegati hanno prodotto profili genetici chiari e riproducibili nelle 65 accessioni analizzate (Figura 2.1). La dimensione degli alleli elaborati varia tra 121 e 248 bp, identificando un totale di 74 alleli nelle 65 accessioni, mentre il numero di alleli amplificati complessivamente nelle accessioni siciliane sono stati 67. Il numero di alleli per ogni coppia di primer è stato di 8.4 in accessioni siciliane e 9.3 nel totale dei campioni (Tabella 2.3). Il locus UDO99-008 ha mostrato il minor numero di alleli (4), mentre *ssrOeUA-DCA9* ha presentato il valore più alto (15). È stata riscontrata una maggiore frequenza allelica nei primer GAPU59 e UDO99-024 (0.585). L'eterozigosi osservata, invece, è variata da un minimo di 0,431 in UDO99-008 a un massimo di 0.969 per *ssrOeUA-DCA3* (media 0.760); i valori di PIC riscontrati sono stati compresi tra 0.549 in GAPU59 e 0.853 in *ssrOeUA-DCA9* (media 0.722). Il marcatore che ha mostrato un alto potere discriminante è stato *ssrOeUA-DCA9*, il quale ha permesso, da solo, di discriminare 32 genotipi; invece, UDO99-008 ha mostrato il minor numero di alleli discriminati con solo 9 genotipi differenti (Tabella 2.4). Nel complesso, i microsatelliti utilizzati, si sono dimostrati altamente polimorfici e senza ambiguità hanno permesso di discriminare 58 genotipi dei 65 analizzati. Le accessioni che sono risultate essere sinonimi sono state Calamignara e Ogliarola messinese; Morghetana e Moresca; Nocellara Etnea, Marmorina, Virdisa e Zaituna; Verdello Grosso e Turdunazza; Busciunetto e Abunara. La distanza genetica tra i genotipi è stata determinata in accordo con l'indice di dissimilarità. Il dendrogramma Neighbor-joining (Figura 2.2) ha mostrato un'elevata variabilità tra le accessioni analizzate; le varietà si sono distribuite in tre gruppi principali (A, B e C), di cui due, sono ulteriormente suddivisi in tre e due subcluster, rispettivamente (A1, A2 e A3, B1 e B2). I genotipi siciliani, contraddistinti da una variabilità genetica diffusa, sono presenti in tutti i subcluster, mentre quelli provenienti dalle altre regioni italiane ed estere si sono raggruppati in due di essi. In particolare, le tre varietà spagnole (Arbequina, Manzanilla e Picudo) e la Picholine Marroccaine (Marocco) sono state incluse nello stesso

gruppo del subcluster A1, mentre le due varietà tunisine (Chetoui e Chemlali) sono state raggruppate insieme la Koroneiki (Grecia) e un'altra cultivar spagnola, Arbosana, nel subcluster B2 insieme a tre genotipi siciliani. Le altre varietà italiane si sono nettamente separate tra loro e dalla maggior parte delle cultivar siciliane. Alcune delle più importanti cultivar della Sicilia, coltivate principalmente nella parte orientale, come Nerba, Tonda Iblea, Moresca e Ogliarola Messinese, caratterizzati da frutti di grossa pezzatura e a maturazione intermedia, hanno mostrato un alto livello di similarità e si sono stati raggruppati nel subcluster A2, la quale comprende anche alcune delle accessioni (Calamignana, Passalunara e Castriciana) già riconosciute come sinonimi di Ogliarola Messinese (Seed and Plant Genetic Resources Service, FAO).

Le altre varietà siciliane sono state raggruppate nei subcluster A3 e B1, le due Nocellara (Nocellara Etnea e Nocellara del Belice) sono stati raggruppati insieme ad alcune varietà a maturazione tardiva. Infine, il cluster C ha incluso due tra le più importanti varietà italiane per la produzione di olio, Frantoio e Leccino.

Tabella 2.3 Marcatori molecolare analizzati per la caratterizzazione dei genotipi di olivo.

Marker	Maggiore Frequenza Allelica	Numero Genotipi	Numero Alleli	Eterozigosi attesa	Eterozigosi osservata	PIC
ssrOeUA-DCA3	0.246	25	9	0.841	0.969	0.821
ssrOeUA-DCA9	0.208	32	15	0.867	0.923	0.853
ssrOeUA- DCA16	0.300	30	14	0.829	0.800	0.810
GAPU59	0.585	12	6	0.594	0.585	0.549
GAPU101	0.208	22	9	0.850	0.938	0.832
UDO99-008	0.462	9	4	0.689	0.431	0.640
UDO99-012	0.431	10	5	0.690	0.800	0.635
UDO99-024	0.585	16	12	0.624	0.631	0.600
Media di tutti i campioni	0.378	19.5	9.3	0.748	0.760	0.718
Media dei campioni siciliani	0.393	15.6	8.4	0.734	0.788	0.702

Tabella 2.4 Profili allelici delle 65 cultivar di olivo analizzati con 8 marcatori SSR.

NOME	ssrOeUA- DCA3	ssrOeUA- DCA9	ssrOeUA- DCA16	GAPU59	GAPU101	UDO99- 008	UDO99- 012	UDO99- 024
Abunara	234/248	192/207	121/173	212/212	204/215	163/163	157/167	186/186
Aitana	240/244	162/201	148/153	212/218	188/204	155/163	165/167	184/186
Arbequina	242/244	162/204	123/146	212/212	190/215	165/165	157/157	186/186
Arbosana	227/238	192/204	121/123	212/222	182/188	163/163	159/165	202/202
Bella di Cerignola	244/248	162/180	153/177	212/212	198/215	165/165	157/157	167/186
Biancolilla	238/242	162/184	148/177	212/212	188/215	160/165	157/167	167/186
Bottone di gallo	234/248	165/192	177/177	212/222	192/198	165/165	159/167	167/186
Brandofino	227/242	190/204	121/173	212/212	204/215	165/165	157/167	186/186
Buscionetto	234/248	192/207	121/173	212/212	204/215	163/163	157/167	186/186
Calamignara	238/248	184/192	148/177	208/212	188/198	160/165	157/165	186/186
Calatina	234/242	162/162	173/173	208/222	182/188	155/155	165/165	179/186
Carolea	227/248	162/196	123/153	212/218	190/215	165/165	157/167	184/186
Castriciana	238/248	184/194	148/173	208/212	188/198	160/165	157/165	186/186
Cavaliera	227/238	171/184	148/165	208/222	188/190	160/165	159/165	181/186
Cellina di Nardò	234/240	180/204	148/155	208/212	182/196	156/160	165/167	181/186
Cerasuola	227/238	162/207	158/173	212/214	188/198	165/165	157/157	179/186
Chemlali	227/234	171/171	121/146	212/212	190/196	160/160	157/157	184/186
Chetoui	227/234	168/192	121/173	212/214	190/204	163/163	159/167	186/191
Cipressino	238/238	162/184	148/148	208/208	190/204	165/165	167/167	186/188
Coratina	234/238	184/196	148/148	212/212	196/215	160/160	157/167	167/186
Dolce di Rossano	238/240	171/184	148/148	218/218	190/204	160/160	167/167	186/188
Erbano	234/238	162/165	157/173	212/222	188/204	163/163	159/167	186/188

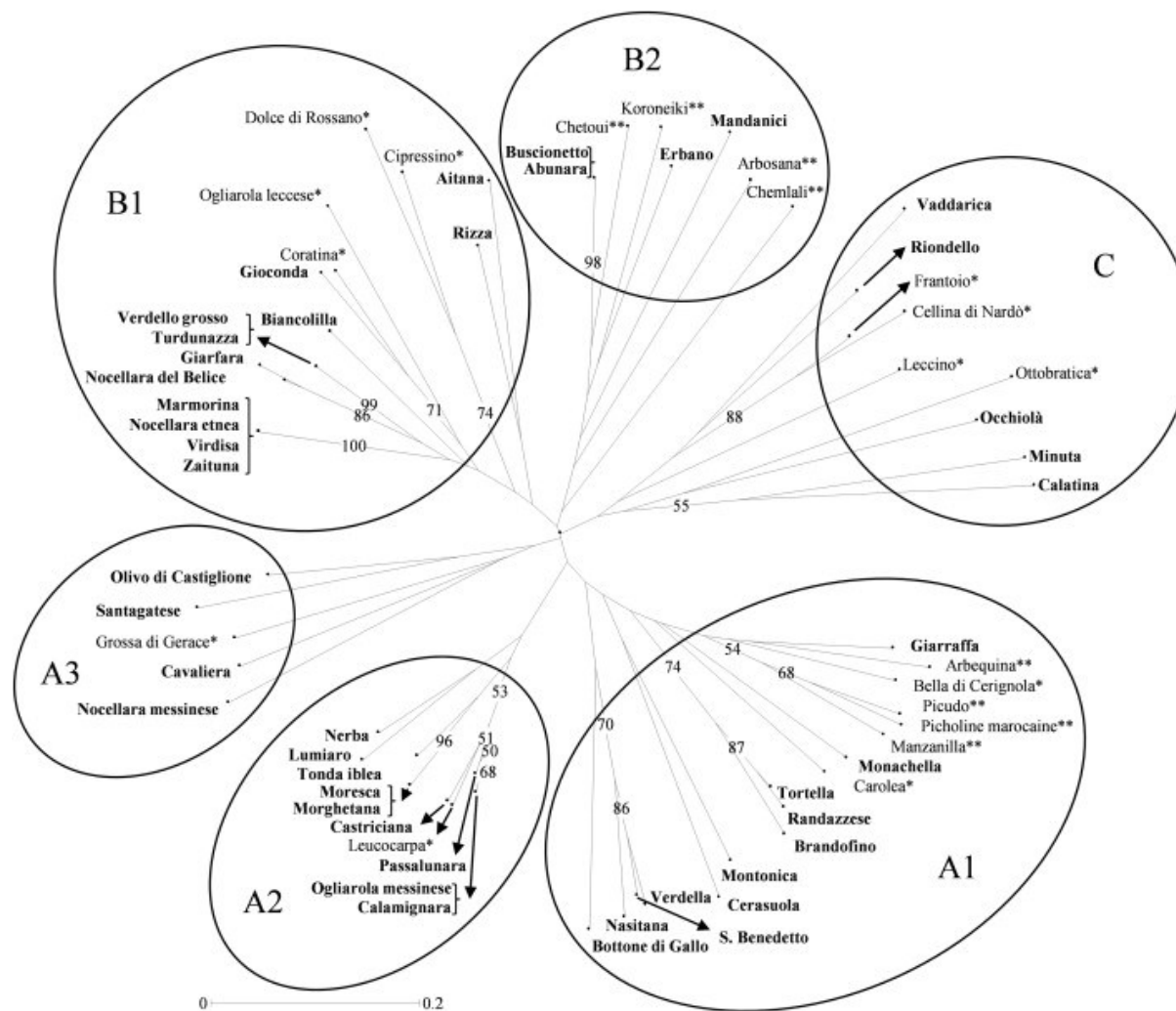
TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DELLE PRINCIPALI VARIETÀ DI OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) ED OLI
EXTRAVERGINE DI OLIVA SICILIANI

Frantoio	232/238	180/204	148/155	208/212	182/196	156/160	165/167	181/186
Giarfara	238/244	162/171	148/173	212/212	198/204	163/163	157/167	186/186
Giarraffa	244/248	162/192	123/173	212/212	198/215	165/165	157/157	186/186
Gioconda	234/238	180/192	148/171	212/212	196/215	160/160	157/167	167/186
Grossa di Gerace	227/238	184/204	121/153	204/218	188/188	160/165	157/165	167/186
Koroneiki	234/234	180/204	148/148	208/212	190/204	163/163	159/167	186/188
Leccino	238/248	162/204	148/173	208/212	196/198	155/155	157/167	183/183
Leucocarpa	238/248	184/194	148/148	208/212	188/198	160/165	157/165	186/186
Lumiaro	238/248	165/171	121/123	212/212	188/198	160/165	157/165	186/186
Mandanici	227/234	165/199	121/144	222/222	188/204	160/160	159/167	186/195
Manzanilla	240/248	162/204	153/173	212/212	196/217	165/165	157/157	167/186
Marmorina	238/244	171/192	123/148	212/212	204/215	155/165	157/167	167/186
Minuta	234/240	180/201	121/177	208/208	188/192	155/155	159/165	167/179
Monachella	227/244	162/184	146/173	212/222	190/215	165/165	157/161	167/186
Montonica	238/248	192/199	121/173	212/218	198/198	165/165	157/157	186/186
Moresca	240/244	184/192	148/173	208/212	188/198	155/165	157/165	186/186
Morghetana	240/244	184/192	148/173	208/212	188/198	155/165	157/165	186/186
Nasitana	234/248	162/201	148/153	208/214	192/198	165/165	157/165	181/186
Nerba	238/244	162/171	121/123	208/212	188/198	160/165	157/165	186/186
Nocellara del Belice	238/244	162/171	148/173	212/212	198/204	163/165	157/167	186/186
Nocellara Etnea	238/244	171/192	123/148	212/212	204/215	155/165	157/167	167/186
Nocellara Messinese	227/232	184/192	153/153	208/212	182/215	160/165	157/165	171/181
Occhiolà	232/244	171/184	173/173	208/222	198/198	155/165	157/165	179/179
Ogliarola leccese	238/251	171/171	148/148	212/212	182/196	163/163	159/167	167/186
Ogliarola	238/248	184/192	148/177	208/212	188/198	160/165	157/165	186/186

CAPITOLO 2 - CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CULTIVAR DI OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) SICILIANE ED
ESTERE CON MARCATORI MICROSATELLITI (SSR)

Messinese									
Olivo di Castiglione	240/248	192/192	146/148	208/212	188/190	160/165	165/167	179/186	
Ottobratica	227/234	184/201	155/155	208/222	190/196	163/163	157/157	179/179	
Passalunara	238/248	184/192	148/173	208/212	188/198	160/165	157/165	186/186	
Picholine marocaine	234/248	192/204	153/171	212/222	196/215	165/165	157/157	167/186	
Picudo	240/248	182/192	153/173	212/222	196/215	165/165	157/157	167/186	
Randazzese	227/244	192/204	121/175	212/212	204/215	165/165	157/167	186/186	
Riondello	227/232	180/201	148/153	208/212	188/196	163/163	165/167	173/181	
Rizza	227/238	162/192	148/148	212/218	188/198	163/163	157/167	184/186	
S. Benedetto	234/248	162/201	123/177	208/212	192/198	165/165	157/165	179/186	
Santagatese	227/240	192/192	121/153	208/218	188/190	155/165	165/167	167/184	
Tonda Iblea	238/244	162/171	148/173	208/212	188/198	155/165	157/165	186/186	
Tortella	227/244	192/204	121/173	212/212	204/215	165/165	157/167	186/186	
Turdunazza	238/248	162/171	148/173	212/212	196/198	160/165	157/167	167/186	
Vaddarica	232/240	171/180	121/153	208/222	196/196	155/163	161/167	181/184	
Verdella	234/248	162/201	177/177	208/212	192/198	165/165	157/165	179/186	
Verdello grosso	238/248	162/171	148/173	212/212	196/198	160/165	157/167	167/186	
Virdisa	238/244	171/192	123/148	212/212	204/215	155/165	157/167	167/186	
Zaituna	238/244	171/192	123/148	212/212	204/215	155/165	157/167	167/186	

Figura 2.2 Dendrogramma Neighbor Joining delle cultivar di olivo analizzate: Siciliane (grassetto), altre Italiane (*) e straniere (**)
costruito sulla matrice di dissimilarità con analisi bootstrap (1000).



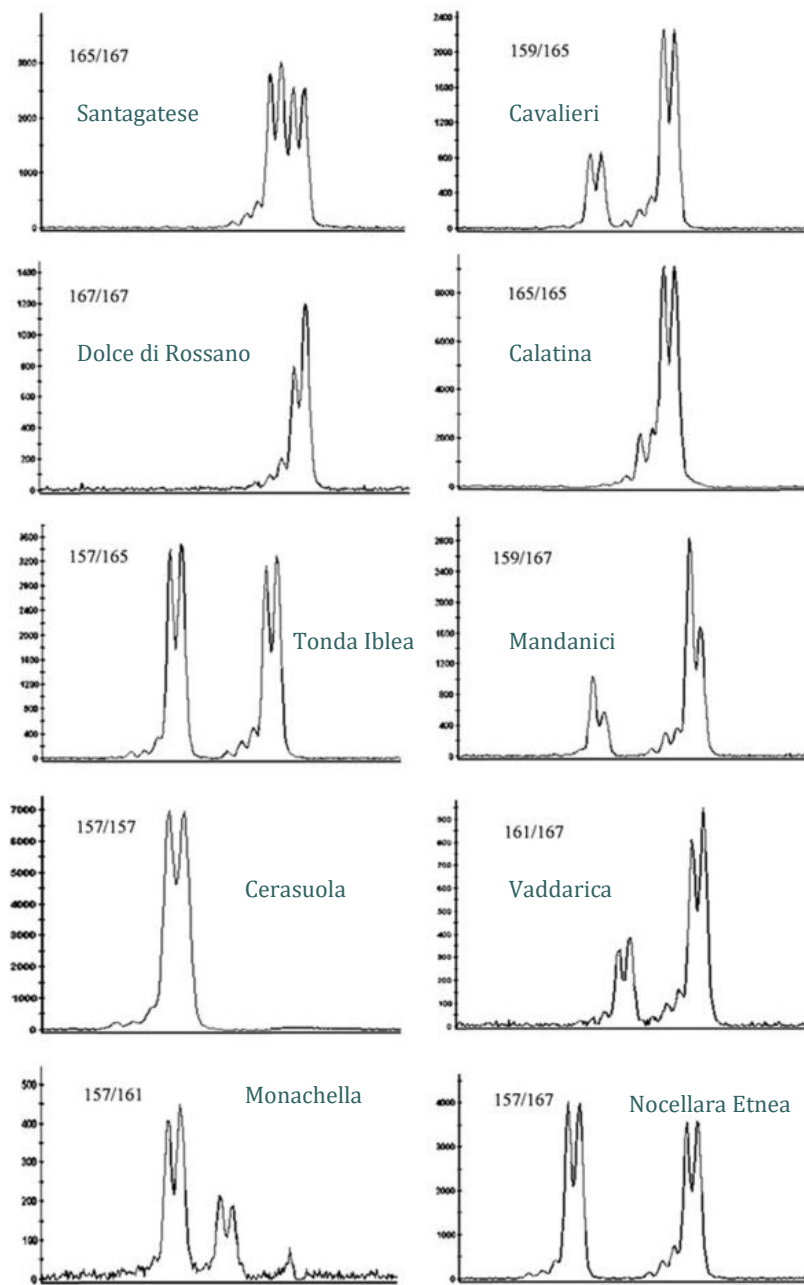


Figura 2.3 Elettroforesi capillare di differenti aplotipi del locus UDO99-012.

2.5. Discussione

L'elevato livello di polimorfismo osservato è in accordo con i risultati ottenuti da diversi autori che hanno eseguito studi sulla variabilità genetica del germoplasma olivicolo mediante l'utilizzo di SSR (Lopes *et al.*, 2004; Alba *et al.*, 2009), evidenziando la ricchezza in termini di diversità genetica che è propria del olivo (Bartolini *et al.*, 2005).

La natura co-dominante dei marcatori SSR ha permesso di rilevare un gran numero di alleli in differenti locus con elevati livelli di eterozigosi. Le accessioni siciliane hanno mostrato una notevole variabilità genetica, paragonabile a quella registrata ai genotipi provenienti da altri paesi del Mediterraneo inclusi nell'analisi. L'elevato livello di variabilità genetica può essere dovuto alla diffusione e lo scambio di materiale di propagazione tra diverse aree di coltivazione e alla selezione empirica a seguito di incroci spontanei. Questi eventi sono collegati alla storia della coltivazione dell'olivo, per molti secoli sottoposti ad una intensa diffusione antropica, essendo la Sicilia fin dai tempi antichi una terra di incontro per le popolazioni del Mediterraneo (Zohary & Hopf, 2000; Rugini *et al.*, 2011.).

Le accessioni indiscriminate dalla analisi hanno confermato i casi di sinonimia che erano già stati riportati in letteratura (Bottari e Spina, 1952; La Mantia *et al.*, 2005; Caruso *et al.*, 2007). In particolare, Nocellara Etnea, la più importante cultivar dell'area etnea, ha mostrato lo stesso profilo allellico di Marmorina (che significa "come il marmo", per sottolineare la durezza della drupa), Virdisa (che significa "di colore verde", per indicare il colore della luce di la drupa) e Zaituna. Mentre Marmorina e Virdisa sono comunemente ammesse come sinonimo di Nocellara Etnea, nel caso di Zaituna, un maggior numero di SSR o di diversi tipi di marcatori, come ad esempio SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), potrebbe inequivocabilmente distinguerlo. In realtà, Zaituna, anche se storicamente considerata come sinonimo di Virdisa (Bottari e Spina, 1952), è anche il nome di una cultivar che si riscontra ancora oggi con frequenza in alcuni distretti olivicoli del siracusano, la quale

presenta caratteri morfologici simili a Nocellara Etnea (Bottari e Spina, 1952).

Altre due coppie di genotipi (Abunara e Busciunetto; Turdunazza e Verdello Grosso) sono risultate indistinte; queste accessioni minori presenti nei diversi campi collezione, sono state riportate per la prima volta come sinonimi; le accessioni Castricana, Passalunara e Ogliarola messinese, già riportati da altri autori come sinonimi, sono stati discriminati nella nostra analisi, facendo ipotizzare l'esistenza di una composizione clonale ampia e variegata.

2.6. Bibliografia

- Alba, V., Montemurro, C., Sabetta, W., Pasqualone, A., Blanco, A., 2009. SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. *Sci. Hortic.* 123, 11-16.
- Angiolillo, A., Reale, S., Pilla, F., Baldoni, L., 2006. Molecular analysis of olive cultivars in the Molise region of Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53, 289e295.
- Baali-Cherif, D., Besnard, G., 2005. High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *Laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Ann. Bot.* 96, 823-830.
- Baldoni, L., Belaj, A., 2009. Olive. In: Vollmann, J., Rajean, I. (Eds.), *Oil Crops. Handbook of Plant Breeding*, vol. 4. Springer Science Business Media, New York, pp. 397e421.
- Bartolini, G., 2007. *Olea* Databases. Available at: <http://www.oleadb.it>.
- Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, G., 2005. *Olive Germplasm: Cultivars and World-wide Collections*. Available at: <http://apps3.fao.org/wIEWS/olive/oliv.jsp>.
- Bautista, R., C_ervas, F.M., Claros, M.G., 2003. Genomic evidence for a repetitive nature of the RAPD polymorphisms in *Olea europaea* (olive-tree). *Euphytica* 130, 185-190.
- Belaj, A., Ojeda, A., Muñoz, C., Trujillo, I., Barranco, D., Rallo, L., De La Rosa, R., Rallo, P., Díaz, A., Martín, A., Baldoni, L., 2008. Molecular markers in olive: an integrated approach. *Acta Hort.* 791, 45-48.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- Bottari, V., Spina, P., 1952. Le varietà di olivo coltivate in Sicilia. *Annu. Sper. Agric.* 7, 937-1004.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G., 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104, 301-307.
- Caruso, T., Cartabellotta, D., Motisi, A., 2007. *Cultivar di Olivo Siciliane e Identificazione, validazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e qualità degli oli*. Regione Siciliana Assessorato Agricoltura e Foreste e Dipartimento Colture Arboree. Università degli Studi di Palermo (Italy).
- Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A., 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 104, 223-228.
- Ercisli, S., Ipek, A., Barut, E., 2011. SSR marker-based DNA fingerprinting and cultivar identification of olives (*Olea europaea* L.). *Biochem. Genet.* 49, 555-561.
- Gomes, S., Martins-Lopes, P., Lopes, J., Guedes-Pinto, H., 2009. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR Markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27, 365-373.
- Hakim, I.R., Kammoun, N.G., Makhoulfi, E., Rebai, A., 2010. Discovery and potential of SNP markers in characterization of Tunisian olive germplasm. *Divers* 2, 17-27.
- Hernández, P., De La Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G., Martín, A., 2001. Development

- of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theor. Appl. Genet.* 103, 788-791.
- Ipek, A., Barut, E., Gulen, H., Ipek, M., 2012. Assessment of inter- and intra-cultivar variations in olive using SSR markers. *Sci. Agric.* 69, 327-335.
- La Mantia, M., Lain, O., Caruso, T., Testolin, R., 2005. SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 80, 628-632.
- Liu, K., Muse, S.V., 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinform* 21, 2128-2129.
- Lopes, M.S., Mendonca, D., Sefc, K.M., Sabino Gil, F., da Camara Machado, A., 2004. Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *HortScience* 39, 1562-1565.
- Marra, F.P., Caruso, T., Costa, F., Di Vaio, C., Mafra, R., Marchese, A., 2013. Genetic relationships, structure and parentage simulation among the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Southern Italy revealed by SSR markers. *Tree Genet. Genom.* 9, 961-973.
- Muleo, R., Colao, M.C., Miano, D., Cirilli, M., Intrieri, M.C., Baldoni, L., Rugini, E., 2009. Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome* 52, 252-260.
- Muzzalupo, I., Chiappetta, A., Stabile, G., Bucci, C., Perri, E., 2011. Intra-varietal difference of "Carolea" olive assessed by molecular markers. *Acta Hort.* 918, 771-776.
- Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., 2006. DARwin Software. <http://darwin.cirad.fr/>.
- Rallo, P., Dorado, G., Martin, A., 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101, 984e989.
- Roubos, K., Moustakas, M., Aravanopoulos, F.A., 2010. Molecular identification of Greek Olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite loci. *Genet. Mol. Res.* 9, 1865e1876.
- Rugini, E., De Pace, C., Gutierrez-Pesce, P., Muleo, R., 2011. *Olea*. In: Chittaranjan, K. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 79-117.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406e425.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendonça, D., Rodrigues Dos Santos, M., da Camara Machado, A., 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9, 1171e1173.
- Zohary, D., Hopf, M., 1994. *Olive: Olea europaea*. In: *Domestication of Plants in the Old World*, second ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 137e143.
- Zohary, D., Hopf, M., 2000. *Domestication of Plants in the Old World*, third ed. University Press, Oxford

CAPITOLO 3

INDAGINE SULLA VARIABILITÀ MORFOLOGICA INTER ED INTRA CULTIVAR DEL GERMOPLASMA OLIVICOLO SICILIANO

3.1. Abstract

L'olivo è una pianta allogama e prevalentemente autoincompatibile che presenta all'interno della specie un'ampia variabilità genetica, con numerose sinonimie ed omonimie che rendono difficile il lavoro dei breeder nei lavori di miglioramento genetico. La caratterizzazione molecolare del panorama olivicolo siciliano, già affrontata da diversi autori (La Mantia *et al.*, 2005, Caruso *et al.*, 2007; Las Casas *et al.*, 2014), rappresenta un aspetto molto importante per l'identificazione e valorizzazione varietale.

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo l'osservazione, lo studio e l'indagine delle differenze morfologiche e fenologiche tra 28 accessioni identificate e raggruppate all'interno delle più significative cultivar popolazioni di olivo della Sicilia Centro-Sud orientale, nello specifico di Biancolilla, Nocellara Etnea e Tonda Iblea. Negli ultimi anni la caratterizzazione basata sull'utilizzo di descrittori morfologici è passata in secondo piano rispetto alle tecniche di discriminazione mediante l'utilizzo di marcatori molecolari (ad es. AFLP, RAPD SSR, SNP, ecc.). I caratteri sono stati scelti in quanto sotto controllo genetico presentano una costante espressione fenotipica negli anni ed in diverse condizioni ambientali, colturali e pedoclimatiche, permettendo così di discriminare i diversi genotipi. L'elenco di questi caratteri sono in parte quantitativi, quindi facilmente misurabili (caratteri biometrici), altri qualitativi, quindi valutati mediante osservazioni visive dirette basate su opportune scale di classificazione.

3.1 Introduzione

L'olivo, *Olea europaea* L., è una delle piante più rappresentative del Mediterraneo, della sua agricoltura e dei popoli che nei secoli si sono avvicinati. Le variabili ambientali (suolo e clima), le peculiarità genetiche delle cultivar, e le condizioni legate alle tecniche colturali possono far variare il portamento dell'albero, la densità della chioma, la forma e dimensioni di foglie e frutti, nonché lo sviluppo complessivo della pianta, le cui dimensioni si riducono all'aumentare delle condizioni limitanti (temperature rigide, stress idrico, ecc.). L'enorme presenza di varietà e accessioni fa sì che ciascuna di esse differisce da un'altra in modo del tutto inequivocabile per proprie caratteristiche morfologiche, fisiologiche e agronomiche; spesso i nomi attribuiti alle cultivar, anche tramite la cultura e saggezza contadina, (es. Biancuzza, Verdisa, Moresca, Pendolino) ci svelano alcuni tratti specifici e caratteristici della pianta.

L'olivo è una specie polimorfa, in cui nello stesso individuo possono coesistere, in relazione all'età, al vigore di crescita e alle condizioni ambientali, foglie, all'interno di uno stesso ramo, con forma e dimensioni diverse, in relazione al periodo della loro formazione e sviluppo. La specie ha due caratteristiche peculiari che ne influenzano la crescita e quindi le pratiche agronomiche: i ricchi complessi gemmari e l'allungamento dei rami. In particolare, questi sono caratterizzati da internodi relativamente lunghi, di modesto diametro e con lenti processi di lignificazione. Questo fa sì che, per il peso stesso delle foglie e/o dei frutti, i rami si curvino, permettendo ad altre gemme, divenute dominanti e meglio illuminate, di schiudere e produrre nuovi rami con funzione di cima. Una caratteristica comune alle formazioni vegetative dell'olivo è rappresentata dalla basitonìa. Secondo questo modello vegetativo i germogli basali manifestano un ritmo di accrescimento maggiore di quelli mediani o apicali appartenenti allo stesso ramo. L'aspetto finale del ramo delle piante basitone si caratterizza, dunque, per una lunghezza dei germogli laterali crescente dall'apice verso la base dei rami (Baldini, 1986).

La caratterizzazione del germoplasma si è basata, sin dal XIX secolo, sulla descrizione della pianta nel suo insieme o in riferimento ai singoli organi (foglie, fiori, frutti); tuttavia, l'utilizzo di sistemi di classificazione e descrittori differenti ha reso nel tempo difficile la comparazione tra le diverse esperienze di descrizione. Il superamento di tale barriera è avvenuto con l'adozione di un unico sistema riferito ai parametri proposti dall'UPOV (Union Internationale pour la Protection de la Obtention Végétales).

L'olivo è una pianta allogama e prevalentemente autoincompatibile che presenta all'interno della specie un'ampia variabilità genetica, con numerose sinonimie ed omonimie che rendono difficile il lavoro dei breeder nei lavori di miglioramento genetico. La caratterizzazione molecolare del panorama olivicolo siciliano, già affrontata da diversi autori (La Mantia *et al.*, 2005, Caruso *et al.*, 2007; Las Casas *et al.*, 2014), rappresenta un aspetto molto importante per l'identificazione e valorizzazione varietale.

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo l'osservazione, lo studio e l'indagine delle differenze morfologiche e fenologiche tra 24 accessioni identificate e raggruppate all'interno delle più significative cultivar popolazioni di olivo della Sicilia Centro-Sud orientale, nello specifico di Biancolilla, Nocellara Etnea e Tonda Iblea. Negli ultimi anni la caratterizzazione basata sull'utilizzo di descrittori morfologici è passata in secondo piano rispetto alle tecniche di discriminazione mediante l'utilizzo di marcatori molecolari (ad es. AFLP, RAPD SSR, SNP, ecc.).

Le metodologie molecolari offrono un'analisi oggettiva delle differenze fra individui, perché fondata solo su base genetica a differenza di quanto accade con un'analisi morfologica; questa, difatti, fa riferimento alla valutazione dei caratteri della pianta nel suo complesso e dei propri organi, e dipende non solo dall'espressione genetica, ma anche dall'interazione pianta-ambiente.

Nel caso specifico, tale lavoro è stato svolto grazie a due presupposti che ne confermano la validità scientifica: la contenuta influenza, che ha potuto determinare l'ambiente di coltivazione delle accessioni autoctone, poiché sono state selezionate all'interno del Campo del Germoplasma di Olivo di Enna, in cui sono presenti piante coetanee poste alle medesime condizioni climatiche ed

edafiche; il metodo di indagine proposto dall'UPOV, standardizzato e accettato dalla comunità scientifica internazionale. Attraverso l'individuazione di differenze nell'espressione dei caratteri tra le accessioni in esame si ritiene di poter fornire un contributo al miglioramento genetico. Infatti, la fornitura di materiale di base per la ricerca scientifica contribuisce ad una positiva ricaduta sul tutto il territorio siciliano, con il presupposto di indagare su caratteristiche in grado di distinguere morfologicamente variabilità intracultivar.

Già a partire dal XIX secolo sono stati proposti diversi criteri per l'identificazione e la caratterizzazione delle varietà di olivo, con l'osservazione e lo studio di caratteri riguardanti l'intera pianta e dei singoli organi, quali foglie, infiorescenze, frutti ed endocarpo. Non tutti i lavori di caratterizzazione hanno utilizzato gli stessi descrittori e le stesse denominazioni o classificazioni per le caratteristiche esaminate e, quindi, nella maggior parte dei casi non è possibile avere un pieno confronto dei dati rilevati ed una valutazione uniforme dei genotipi considerati. La gran parte dei lavori di caratterizzazione varietale dell'olivo fanno riferimento a parametri e metodologie indicati dall'UPOV (Union Internationale pour la Protection de la Obtention Végétales).

I caratteri sono stati scelti in quanto sotto controllo genetico presentano una costante espressione fenotipica negli anni ed in diverse condizioni ambientali, colturali e pedoclimatiche, permettendo così di discriminare i diversi genotipi. Alcuni di questi caratteri sono quantitativi, quindi facilmente misurabili (caratteri biometrici), altri qualitativi, quindi valutati mediante osservazioni visive dirette basate su opportune scale di classificazione.

3.2. Materiali e metodi

Il lavoro è stato eseguito nel periodo compreso tra Ottobre 2013 e Giugno 2015. In questo periodo è stato possibile campionare e analizzare per due anni consecutivi 28 accessioni di *Olea europaea* L., presenti nel Campo Collezione di Germoplasma Olivicolo “ZAGARÌA”, sito nell’agro di Enna (37°30’53”N; 14°17’43”E). Il campo ospita circa 400 accessioni, tra cultivar italiane, siciliane e straniere suddivise in quattro lotti. Le piante hanno una distanza 4 x 5, ognuna di esse possiede un cartellino identificativo, che a secondo del colore indica il lotto di appartenenza e che riporta anche il numero di riconoscimento dell’ecotipo. In particolare, il campo ospita: 53 accessioni appartenenti a cultivar-popolazione campionate nella provincia di Enna, di cui 11 accessioni appartengono alla popolazione Biancolilla, 13 a Moresca, le restanti a Calatina, Giarraffa, Marmorigna, Minuta, Ogliarola Messinese, Nocellara Etnea, Vaddarica, Tonda Iblea, Santagatese e 3 accessioni non sono riconducibili a varietà note (*Lotto A*); 45 accessioni provenienti dalle restanti provincie della Sicilia (*Lotto B*); 180 varietà provenienti da altre regioni italiane (*Lotto C*); 126 varietà internazionali (*Lotto D*).

Il fine del lavoro è stato quello di caratterizzare piante riconducibili ai differenti ecotipi che mostrano variabilità intracultivar, in particolare afferenti alle principali varietà presenti nella Sicilia centro-orientale; sono state indagate le possibili variabili morfologiche all’interno di questi cloni, confrontando cioè le diverse osservazioni ottenute per singola accessione.

Il lavoro è stato svolto, prelevando e selezionando piante e porzioni vegetative sottoposte alle stesse condizioni pedo-climatiche, dando valore, sia dal punto di vista scientifico che colturale, ai campi di orientamento e conservazione del germoplasma e al mantenimento delle *Core Collection*.

3.2.1. Prelievo del materiale vegetale e rilevazione dei descrittori morfologici

Le piante, per un totale di 24 accessioni, sono state selezionate all'interno dei *Lotti A e B* del Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo sito in C.da Zagaria (EN). Il *Lotto A* raggruppa una serie di cloni afferenti alle principali cultivar siciliane, campionate agli inizi del 2000 nel territorio ennese. Nel *Lotto B*, invece, si ascrivono cloni di piante provenienti dai restanti areali siciliani, dove sono presenti sia omonimie sia sinonimie delle principali cultivar già descritte da Bottari e Spina (1952). Ad ogni pianta è stato fornito un *id* (identity document) di catalogazione interna, un identificativo che ci ha permesso di ricondurre e rintracciare la piante e le porzioni vegetative oggetto di studio campionati all'interno del campo (Tabella 3.1).

I rilevamenti dei principali caratteri morfologici sono stati effettuati nel biennio 2013-14 sulle 24 accessioni oggetto di studio, appartenenti alle popolazioni delle cultivar Biancolilla (10), Nocellara Etnea (5), Moresca (1), Tonda Iblea (4) e 3 cultivar sconosciute. I rilievi dei tratti bio-metrici sono stati eseguiti seguendo le indicazioni di descrittori primari in olivo (Bottari e Spina, 1952; Barranco *et al.*, 2000a; Bartolini *et al.*, 2005; Manuale COI) e integrati con la scheda riportata nel “Manuale per la Caratterizzazione Primaria delle Cultivar di Olivo del Germoplasma Siciliano” (Caruso *et al.*, 2007). Sono stati, ivi, analizzati caratteri morfologici di tipo quantitativo (dimensione) e qualitativo (forma), comprendenti variabili sia in scala numerica (lunghezza/larghezza), sia in scala ordinale (piccolo/medio/grande), che in scala binominale (presenza/assenza). I dati quantitativi sono stati trasformati in scala ordinale adottando le classi suggerite da Caruso *et al.* (2007), allo scopo di poter confrontare variabili qualitative e quantitative. La metodologia utilizzata per descrivere la biodiversità dell'olivo avanzata, già utilizzata dall'*UPOV (Union Internationale pour la Protection de la Obtention Végétales)* e adottata in questo lavoro, considera 24 caratteri morfologici ripartiti in 3 per l'albero, 3 per la foglia, 2 per l'infiorescenza, 8 per il frutto e 8 per l'endocarpo. Ulteriori 12 caratteri morfologici sono stati valutati facendo

riferimento alla metodologia proposta da Caruso *et al.* (2007). Sono stati presi in considerazione, quindi, 36 tratti morfologici e biometrici, tra cui 12 caratteri relativi al frutto, 11 relativi all'endocarpo e 10 relativi alla foglia (Tabella 3.2). I campioni, prima di essere analizzati, sono stati preventivamente selezionati in campo e/o successivamente in laboratorio. Infatti, col fine di ridurre eventuali errori di valutazione, sono stati esclusi fiori, frutti e foglie considerati anomali (per fitopatologie e fisiopatie). I prelievi delle 24 accessioni sono stati completati sempre nell'arco di una giornata, in modo da intercettare una precisa fase fenologica che interessasse tutte le piante, escludendo quindi variazioni morfologiche legate alle diverse fasi di sviluppo degli organi. I rilievi sulle foglie sono stati eseguiti, nel periodo invernale, su campioni di 30 foglie adulte prelevate nella porzione mediana di rami dell'anno inseriti su branche fruttifere. Le osservazioni sui frutti sono state eseguite su 30 drupe invaiate prelevate dalla zona intermedia dei rami fruttiferi, scelti nella porzione mediana della chioma. Anche i rilevamenti riguardanti l'endocarpo sono stati effettuati su 30 noccioli, derivanti dalla rimozione della polpa dei frutti utilizzati, per i rilievi sulla drupa. Per i frutti, come anche per alcune caratteristiche del endocarpo si è fatto riferimento a due posizioni, quella di massima asimmetria, che corrisponde alla parte in cui è visibile la sutura carpellare (posizione A), e quella che risulta dalla rotazione di 90° rispetto alla posizione precedente (posizione B).

3.2.2. Fasi fenologiche

I rilievi descritti sono stati effettuati in particolari fasi fenologiche, anch'esse convenzionalmente definite da opportune scale. Le scale utilizzate per definire gli stadi di sviluppo di una pianta spesso risultano diverse. Una scala infatti può, ad esempio, tenere conto di fasi rilevanti dal punto di vista botanico, e invece non dal punto di vista agronomico e viceversa. C'è anche da dire che diverse specie manifestano diversamente le loro fasi fenologiche.

Una scala diffusa è la BBCH (Meier, 2001) che considera gli stadi principali per le specie identificati con dieci numeri, ognuno corrispondente ad uno

stadio, dallo 0 al 9. Le fasi secondarie, cioè le sottofasi, vengono indicate con un ulteriore numero da far seguire al primo numero (Tabella 3.3).

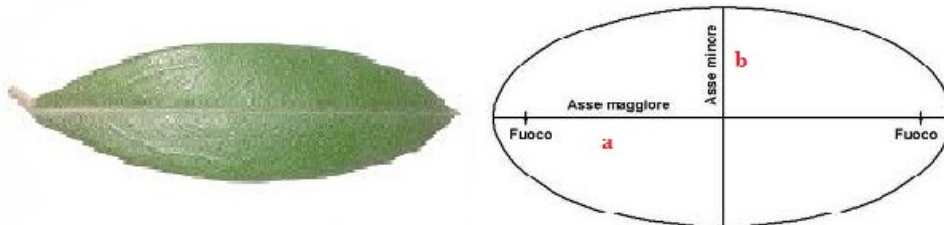
3.2.3. Rilevamenti in campo

I campionamenti di materiale vegetale presso il Campo Collezione di Germoplasma di Olivo di C.da Zagaria si sono svolti nell'arco dell'intero periodo di indagine. I frutti sono stati raccolti in tre diverse fasi fenologiche per due annualità, allo scopo di monitorare la fine dell'accrescimento del frutto (BBCH 77-79), il punto di inizio della invaiatura (BBCH 81) e la progressione della maturazione (BBCH 87). Il rilevamento delle mignole è avvenuto nel momento in cui i fiori apparivano bianchi e non ancora schiusi, cioè in fase di preapertura della corolla (BBCH 57-59). Sono state prelevate 30 mignole per accessione, da tutti i punti cardinali, per poi essere valutate in laboratorio.

3.2.4. Misurazioni e valutazioni

Per misurare le dimensioni di foglie, frutti e fiori è stato utilizzato un calibro digitale sensibile alle variazioni del centesimo di millimetro. Per quanto riguarda il peso, è stata utilizzata una bilancia digitale con percezione del centesimo di milligrammo. Successivamente dai singoli valori ottenuti sono stati ricavati dei valori medi, utilizzati per definire le forme dei singoli organi. L'area della foglia è stata calcolata, approssimando la sua forma a quella di un'ellisse; la sua area infatti è calcolabile applicando la formula $A = \pi ab$, dove a e b

sono i



semiassi maggiore e minore e corrispondono nella foglia alla semi-lunghezza e alla semi-larghezza, (cioè $a = L/2$, mentre $b = A/2$)

Quindi il calcolo finale svolto è stato: $A = \pi L/2 \cdot A/2$

3.2.5. **Analisi statistica**

Ad ogni parametro considerato, sia in termini quantitativi (es. numero fiori/mignola) che qualitativi (es. forma frutto), è stata attribuita una scala di valori (Caruso *et al.*, 2007), ordinale o binomiale, al fine di realizzare un prospetto complessivo relativo alla caratterizzazione morfologica delle accessioni studiate. La tabella riassuntiva è stata utilizzata per le successive analisi statistiche. Così facendo è stato possibile analizzare la matrice di dissimilarità, l'analisi sui Principal Component (PCA), sui Cluster (CA). Come supporto all'analisi statistica sono stati utilizzati due software di rielaborazione statistica quali R 3.2.2 e Minitab 16.2.4 (Minitab Inc.). Le analisi di correlazione e PCA sono state effettuate in R.3.2.2. (Core Team, 2015) usando le funzioni base di R e il package "Hmisc" (Harrell, 2015) mantenendo le opzioni di default. Il grafico dello score plot delle PC sono state preparate con il package "ggplot2" (Wickham, 2009).

Tabella 3.1 Accessioni del Campo di Germoplasma di Olivo di C.da Zagaria (Pergusa) oggetto di analisi.

Codice Pianta	Sezione	Nome accessione	Presunta cultivar
1	A	PIII	Biancolilla
13	A	P13	Biancolilla
24	A	P23	Biancolilla
27	A	P25	Biancolilla
33	A	XIII-80	Biancolilla
37	A	XXV-91	Biancolilla
41	A	Romana	Biancolilla
13	B	Biancolilla nana (992)	
28	B	Buscionetto	
168	A	Nocellara Etnea	
164	A	P08	Nocellara Etnea
157	A	P07	Nocellara Etnea
83	B	Marmorina	
177	B	Zaituna	
20	B	Biancolilla nana (962)	
148	B	Tonda Iblea	
204	A	P37	Sconosciuta
193	A	P35	Sconosciuta
139	A	Moresca	
177	A	PII	Tonda Iblea
180	A	PVII	Tonda Iblea
181	A	PVII	Tonda Iblea
183	A	P20	Tonda Iblea
197	A	P36	Sconosciuta

Tabella 3.2 Caratteri morfologici e biometrici analizzati su cultivar di olivo: 12 caratteri relativi al frutto, 11 relativi all'endocarpo e 10 relativi alla foglia

Caratteri Morfologici	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Foglia					
Lunghezza (cm)	corta (< 5,0 cm)	media (5,0 - 7,0 cm)	lunga (>7,0 cm)		
Larghezza (cm)	stretta (< 1,2 cm)	media (1,2 - 1,5 cm)	larga (>1,5 cm)		
Forma (L/A)	ellittica (< 4)	ellittico-lanceolata (4 - 6)	lanceolata (> 6)		
Curvatura longitudinale della lamina	epinastica	piana	iponastica	elicoidale	
Angolo apicale	molto acuto	acuto	aperto		
Angolo basale	molto acuto	acuto	aperto		
Posizione ampiezza massima	centro apicale	centrale	centro basale		
Colore pagina superiore	verde chiaro	verde grigio	verde intenso		
Colore pagina inferiore	verde chiaro	verde grigio	verde intenso		
Superficie fogliare	piccola (< 3 cm ²)	media (3 - 6 cm ²)	elevata (> 6 cm ²)		
Frutto					
Peso (g)	basso (<2,0 g)	medio (2,1-4,0 g)	medio-alto (4,1-6,0 g)	alto (6,1-8,0)	molto alto (>8,0 g)
Forma (L/A)	sferica (<1,25)	ellittica (1,25-1,50)	allungata (>1,50)		
Lunghezza (cm)					
Larghezza max (cm)					
Simmetria	simmetrico	leggermente asimmetrico	asimmetrico		
Posizione diametro max	basale	centrale	apicale		
Forma apice	appuntito	subconico	arrotondato		
Forma base	arrotondata	troncata	incavata		
Umbone	presente	assente			
Presenza di lenticelle	rare	numerose			
Dimensioni delle lenticelle	piccole	grandi			
Inizio invaiatura	basale	uniforme	apicale		
Endocarpo					
Peso (g)	basso (<0,30 g)	medio (0,30 - 0,45 g)	alto (>0,45 g)		
Forma (L/A)	sferica (<1,4)	ovoidale (1,4 - 1,8)	ellittica (1,8 - 2,2)	allungata (>2,2)	
Simmetria	simmetrico	leggermente asimmetrico	asimmetrico		
Posizione diametro max	basale	centrale	apicale		
Rugosità superficie	liscia	rugosa	scabrosa		
Numero solchi fibrovasc.	basso (<7)	medio (7-10)	alto (>10)		
Distribuzione solchi	uniforme	non uniforme			
Andamento solchi	regolare	irregolare			
Forma apice	appuntito	arrotondato			
Forma base	appuntita	arrotondata	troncata		
Mucrone	presente	assente			
Infiorescenza					
Lunghezza (cm)	corta (< 2,5 cm)	media (2,5-3,5 cm)	lunga (>3,5 cm)		
Numero di Fiori	basso (<18)	medio (18-25)	alto (>25)		
Struttura	compatta	rada			
Albero					
Vigoria	bassa	media	alta		
Portamento	pendulo	espanso	assurgente		
Densità della chioma	bassa	media	elevata		

Tabella 3.3 Fasi fenologiche dell'olivo secondo la classificazione BBCH (00-89), che ha permesso di individuare il momenti ottimali per effettuare i rilievi in campo per i caratteri biometrici e qualitativi oggetto di analisi

Fase fenologica	BBCH	Attività fenologica
Riposo vegetativo	(BBCH 00)	la pianta termina attività di accrescimento dei germogli e si mantiene in riposo fino alla ripresa vegetativa.
Ripresa vegetativa	(BBCH 01)	gemme apicali e gemme laterali si ingrossano.
Comparsa nuove foglie	(BBCH 10-19)	rivestimento delle gemme si apre e compaiono le nuove foglie. Le nuove foglie fuoriescono e raggiungono due centimetri di lunghezza.
Formazione dei grappoli fiorali	(BBCH 51)	all'ascella delle foglie compaiono gli abbozzi fiorali.
Mignolatura	(BBCH 53-56)	dalle gemme a frutto compaiono le infiorescenze a grappolo; i bocci fiorali si rigonfiano ed iniziano a distanziarsi.
Differenziazione delle corolle	(BBCH 57-59)	le corolle prima di aprirsi virano di colore dal verde al bianco.
Inizio fioritura	(BBCH 60)	il primo bottone florale si apre e si distinguono gli organi riproduttivi.
Piena fioritura	(BBCH 65)	almeno il 50% dei fiori è aperto.
Caduta petali	(BBCH 67-69)	dopo l'imbrunimento, i primi petali cominciano a cadere.
Allegazione	(BBCH 71)	i petali sono completamente caduti e si distinguono gli ovari ingrossati sulla parte calicina.
Accrescimento dei frutti	(BBCH 72)	le giovani drupe cominciano ad ingrossarsi.
Inizio indurimento nocciolo	(BBCH 75)	il nocciolo comincia ad offrire resistenza al taglio.
Completo indurimento nocciolo	(BBCH 77-79)	la drupa non è più sezionabile con in taglierino.
Invaiatura	(BBCH 81)	le drupe iniziano a virare dal colore verde al viola cupo.
Maturazione di raccolta	(BBCH 87)	le drupe hanno raggiunto la maturazione idonea alla raccolta.
Cascola naturale	(BBCH 89)	una parte delle drupe tende naturalmente a cadere al suolo.

3.3. Risultati

3.3.1. Analisi dei parametri morfologici: qualitativi e quantitativi

Le analisi morfologiche condotte su 28 accessioni del Campo di Germoplasma di Olivo hanno riguardato la misurazione di foglie, drupe, endocarpo (nocciolo), infiorescenze e dell'*habitus* vegetativo della pianta. Sono stati in totale misurati e valutati ben 39 caratteri degli organi sopracitati.

Le misurazioni delle foglie hanno preso in considerazione la lunghezze e la larghezza delle stesse, funzionali per il calcolo del rapporto tra i parametri succitati. Tale analisi è stata utile al fine di determinare le caratteristiche morfologiche delle foglie (lanceolate, ellittiche o intermedie). Studiando le diverse accessioni, in particolare quelle afferenti alla cultivar Biancolilla, si è rilevata una discreta disomogeneità in lunghezza e larghezza, rispettivamente con un massimo di 6,21 cm per "PIII" ed un minimo di 4,70 per "Buscionetto"; i valori di larghezza hanno mostrato un range da un valore massimo di 1,18 cm per "PIII" ad uno minimo di 0,82 per "P25". Questo ha portato ad una elevata variabilità nella definizione della foglia, con presenza di foglie lanceolate ed ellittico-lanceolate; tale variabilità non è stata riscontrata nelle altre cultivar popolazione di Nocellara Etnea e Tonda Iblea. La varianza rilevata ha svolto un ruolo significativo nel discriminare le diverse accessioni delle cultivar popolazioni studiate (Tabella 3.4).

Dall'analisi della Tabella 3.5 in cui sono riportate le misurazioni carpometriche, si evince una variabilità diffusa all'interno delle accessioni analizzate; in particolare, tutti i frutti hanno riportato una maggiore frequenza di forma ellittica ad eccezione delle accessioni P37 (sferoidale) e P36 (allungata). Uno dei parametri più interessanti al fine della individuazione delle cultivar popolazione è stato il carattere presenza/assenza dell'umbone nel frutto. Molte accessioni di Biancolilla hanno mostrato frutti perfettamente umbonati (PIII, XIII-80, XXV-91), mentre altre ne hanno mostrato una parziale presenza o talvolta una totale assenza (P13, P25, P23). L'accoppiamento di due o più caratteri osservati in campo in campo (quali per esempio forma del frutto, umbone, posizione diametro massimo e punto di

inizio invaiatura) risulta essere una condizione sufficiente per una identificazione rapida dell'accessione.

È d'obbligo citare l'esempio dell'accessione 'Romana', identificata in campo come clone di 'Biancolilla', il cui frutto, tuttavia, si discosta per forma e simmetria in modo chiaro dalle altre accessioni della cultivar alla quale è stata attribuita.

In riferimento ai caratteri qualitativi e quantitativi dell'endocarpo (Tabella 3.6 e Tabella 3.9), anche questi hanno mostrato un'ampia variabilità all'interno delle accessioni oggetto di analisi. Per quanto riguarda i cloni di Biancolilla, questi hanno mostrato una frequenza di noccioli di forma ovoidale nelle accessioni (PIII, P23, XIII-80), mentre sono risultati di forma ellittica i noccioli di Buscionetto, P25 e P13. Riguardo la presenza o assenza del mucrone, essa è da considerarsi un carattere determinante per la variabilità inter cultivar, come riportato da altri autori (Bottari e Spina, 1952), ma risulta essere stabile tra i cloni della stessa cultivar.

Le misurazioni effettuate sugli organi principali hanno permesso la costruzione di una tabella con valori ordinali e binomiali per le successive analisi statistiche, come la matrice di correlazione, l'analisi dei Principal Component e l'analisi dei Cluster. Oltre alle analisi sulle foglie, in cui sono stati considerati ben 8 parametri qualitativi (Tabella 3.8), sono stati valutati 10 parametri riguardanti i frutti (Tabella 3.9), 12 relativi all'endocarpo (Tabella 3.10), l'habitus dell'albero (chioma, vigore, portamento) e 3 parametri dell'infiorescenza (Tabella 3.11).

I dati, riportati nelle Tabelle citate, hanno consentito di elaborare schede pomologiche per ogni singola accessione in esame, presenti in appendice alla tesi.

3.3.2. **Analisi di Correlazione**

L'interdipendenza delle variabili è stata investigata mediante un'analisi di correlazione (Tabella 3.12), dove sono state messe in evidenza le interazioni dei caratteri in analisi. La tabella considera le correlazioni di alcuni parametri che presentano un *p-value* $\leq 0,05$, $\leq 0,01$ e $\leq 0,001$. Le correlazioni con

maggiore significatività sono state registrate nei caratteri morfologici dell'endocarpo e dell'infiorescenza. Questo risultato conferma ciò che è stato già riportato da alcuni autori (Trujillo *et al.*, 2013), i quali affermano che i caratteri dell'endocarpo risultano essere i più rappresentativi per la discriminazione delle accessioni rispetto agli altri parametri analizzati.

3.3.3. **Analisi dei Principal Component (PCA) e dei Cluster (CA)**

Mediante l'analisi effettuata dal software di elaborazione statistica R.3.2.2. è stato possibile studiare i Principal Component ed effettuare l'analisi dei cluster.

Lo studio dei Principal Component è stato utilizzato per stabilire le relazioni tra i caratteri, carpometrici e delle foglie, utilizzati per lo studio di caratterizzazione morfologica delle accessioni in analisi. La variabilità totale è stata spiegata da 26 Principal Component (Tabella 3.13); i primi 7 PC spiegano il 78,8% della variabilità totale. In particolare, la Tabella 3.14 mostra la correlazione tra le variabili originali e i primi 3 Principal Component. Il PC1, rappresentato principalmente dai caratteri dell'endocarpo (forma, sezione trasversale, forma apice, forma base, mucrone) e del frutto (forma, posizione diametro massimo, forma apice, umbone), spiega il 23,1% della varianza totale. Il PC2 è rappresentato da alcuni caratteri della foglia (curvatura longitudinale della lamina fogliare, angolo apicale, angolo basale) e altri caratteri dell'endocarpo (superficie, numero solchi fibrosi, distribuzione solchi), i quali spiegano il 19,0% della varianza totale. Infine, il PC3 è stato correlato principalmente, alla forma della foglia, alla forma della base del frutto, al punto di inizio di invaiatura e alla grandezza delle lenticelle, i quali spiegano l'11,4% della varianza totale. I restanti componenti spiegano infatti una minore variabilità.

Dallo studio dei Principal Component è stato possibile effettuare l'analisi dei Cluster. Dalla combinazione delle prime due PC è stato creato uno Score Plot che spiega la variabilità delle accessioni clonali oggetto di studio. Come mostra la Figura 3.1, vi è la presenza di 4 cluster distinti. Nel primo troviamo la presenza delle accessioni Nocellara Etnea, P08, P07 e Romana. Proprio questa

accessione è stata indicata come una accessione appartenente alla popolazione clonale di Biancolilla, ma risulta essere perfettamente distinta dalle accessioni Biancolilla del Lotto A del Campo di Conservazione del Germoplasma di Zagaria. A questo riguardo l'elaborazione dei dati e le analisi statistiche hanno confermato le nostre prime valutazioni in campo, e difatti la Romana si è sempre discostata dalle altre per alcune caratteristiche del frutto, come la forma e l'abbondante presenza di lenticelle. Un risultato interessante è stato la differente clusterizzazione di Nocellara Etnea, Marmorina e Zaituna (queste ultime simili tra loro), che a loro volta hanno presentato caratteristiche del frutto e delle foglie simili alle accessioni di Tonda Iblea. Questo potrebbe confermare da una parte che Zaituna sia una cultivar vicina, ma ben distinta dalla Nocellara Etnea, e dall'altra che Marmorina, da sempre considerata sinonimo di Nocellara Etnea, abbia una maggiore vicinanza con Zaituna. Se Zaituna e Marmorina si sono distinte dalla Nocellara Etnea, ciò non si può dire per le accessioni clonali di Tonda Iblea che si sono raggruppate nelle stesso cluster. Invece, sono stati individuati due cluster per le accessioni di Biancolilla; già Bottari e Spina (1952) consideravano Biancolilla e Buscionetto (Biancolilla di Caltabellotta) come due varietà autoctone distinte. Infatti, se in un cluster accessioni come XIII-80, XXV-91 e P25 si sono raggruppate insieme alla Buscionetto, le accessioni PIII, P23 e P13 hanno mostrato la presenza di differenti caratteri per le foglie ed i frutti. In questo caso potremmo essere davanti ad un problema di omonimia, che necessiterebbe di ulteriori studi ed approfondimenti mediante una indagine molecolare.

Caruso *et al.* (2007) hanno considerato nel loro studio morfologico di cultivar di olivo siciliane solo la Buscionetto, che risulta essere diffusa principalmente nella Sicilia Occidentale (agringentino e trapanese), non considerando in analisi la Biancolilla diffusa nella Sicilia Centro Orientale (ennese e ragusano). Infine, le accessioni P36 e P37 hanno mostrato delle caratteristiche del tutto differenti dalle accessioni analizzate. Dalle indicazioni dei responsabili del Campo di Germoplasma di Zagaria le due accessioni

risultavano non appartenere a nessuna popolazione clonale, rappresentando così ecotipi locali unici del territorio ennese.

Tabella 3.4 Medie e dev. standard di lunghezza, larghezza, rapporto (L/A) e superficie della foglia delle accessioni analizzate.

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Lunghezza Media Foglia (cm)	Dev. Standard Lunghezza Foglia (cm)	Larghezza Media Foglia (cm)	Dev. Standard Larghezza Foglia (cm)	Rapporto (Lungh/Larg) Foglia	Dev. Standard Rapporto (Lungh/Larg) Foglia	Superficie Foglia (cm ²)	Dev. Standard Superficie Foglia (cm ²)
PIII	Biancolilla	6,28	0,52	1,23	0,17	5,17	0,57	6,10	1,24
P13	Biancolilla	5,58	0,73	1,27	0,21	4,50	0,86	5,57	1,16
P23 (1)	Biancolilla	5,23	0,82	1,01	0,23	5,32	0,98	4,24	1,27
P25	Biancolilla	5,99	0,70	1,20	0,32	5,27	1,25	5,76	1,95
XIII-80	Biancolilla	5,89	0,66	1,12	0,23	5,43	1,07	5,23	1,33
XXV-91	Biancolilla	5,90	0,70	1,18	0,25	5,16	0,87	5,54	1,51
Romana	Biancolilla	6,24	1,02	1,13	0,18	5,58	0,78	5,63	1,57
Biancolilla nana (992)	Biancolilla	5,13	0,62	1,16	0,27	4,56	0,84	4,76	1,48
Biancolilla nana (1064)		5,81	0,85	1,51	0,16	3,86	0,63	6,88	1,43
Buscionetto		4,91	0,51	1,08	0,21	4,68	0,76	4,19	1,13
Nocellara Etnea	Nocellara Etnea	5,53	0,58	1,00	0,16	5,61	0,79	4,35	0,99
P08	Nocellara Etnea	6,21	0,72	1,14	0,17	5,50	0,77	5,57	1,17
P07	Nocellara Etnea	5,08	0,61	1,09	0,15	4,69	0,58	4,39	0,99
PVI	Nocellara Etnea	5,23	0,38	1,38	0,14	3,82	0,40	5,68	0,85

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Lunghezza Media Foglia (cm)	Dev. Standard Lunghezza Foglia (cm)	Larghezza Media Foglia (cm)	Dev. Standard Larghezza Foglia (cm)	Rapporto (Lungh/Larg) Foglia	Dev. Standard Rapporto (Lungh/Larg) Foglia	Superficie Foglia (cm ²)	Dev. Standard Superficie Foglia (cm ²)
Marmorina		4,46	0,43	1,04	0,28	4,51	0,91	3,68	1,23
Zaituna	Zaituna	4,99	0,45	0,86	0,16	5,98	1,12	3,36	0,81
Biancolilla nana (962)	Biancolilla	4,79	0,37	0,99	0,17	4,94	0,85	3,74	0,77
Tonda Iblea	Tonda Iblea	5,05	0,77	1,11	0,25	4,69	0,89	4,46	1,40
P37	Sconosciute	6,13	1,00	1,15	0,37	5,71	1,44	5,68	2,28
P35	Sconosciute	4,28	0,30	0,97	0,20	4,62	0,96	3,26	0,73
P23 (2)		4,73	0,46	1,32	0,22	3,65	0,55	4,96	1,14
Moresca	Moresca	5,13	0,62	1,48	0,21	3,49	0,50	6,00	1,32
PII	Tonda Iblea	4,43	0,33	0,98	0,25	4,81	1,30	3,40	0,80
PVII (1)	Tonda Iblea	4,59	0,64	1,18	0,31	4,08	0,85	4,37	1,57
PVII (2)	Tonda Iblea	4,23	0,39	0,86	0,22	5,13	0,93	2,90	0,94
P20	Tonda Iblea	4,15	0,23	1,01	0,20	4,25	0,85	3,30	0,70
P36	Sconosciute	5,44	0,64	1,01	0,13	5,43	0,59	4,35	0,92

Tabella 3.5 Medie e dev. standard di lunghezza, larghezza e rapporto (L/A) del frutto delle accessioni analizzate.

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Peso Frutto (g)	Dev. Standard Frutto	Media Lunghezza Frutto (cm)	Dev. Standard Lunghezza Frutto (cm)	Media Larghezza Frutto (cm)	Dev. Standard Larghezza Frutto (cm)	Rapporto Lungh./Larg. Frutto	Dev. Standard Rapporto Lungh./Larg. Frutto
P111	Biancolilla	3,70	0,72	2,23	0,24	1,65	0,15	1,35	0,09
P13	Biancolilla	2,90	0,73	2,39	0,19	1,64	0,18	1,46	0,14
P23 (1)	Biancolilla	2,24	0,85	2,23	0,29	1,70	0,21	1,32	0,11
P25	Biancolilla	4,20	0,78	2,50	0,17	1,81	0,13	1,39	0,1
XIII-80	Biancolilla	4,36	0,79	2,42	0,18	1,85	0,15	1,31	0,09
XXV-91	Biancolilla	3,72	0,86	2,35	0,26	1,68	0,16	1,4	0,12
Romana	Biancolilla	4,32	0,61	2,36	0,17	1,78	0,13	1,33	0,05
Biancolilla nana (992)	Biancolilla	2,75	0,98	2,02	0,26	1,56	0,17	1,29	0,1
Biancolilla nana (1064)		1,61	0,28	1,86	0,13	1,27	0,09	1,46	0,07
Buscionetto		4,44	0,71	2,23	0,33	1,68	0,23	1,33	0,06
Nocellara Etnea	Nocellara Etnea	3,36	0,73	2,33	0,21	1,59	0,11	1,47	0,08
P08	Nocellara Etnea	3,00	0,65	2,42	0,21	1,58	0,11	1,53	0,09
P07	Nocellara Etnea	2,93	0,65	2,11	0,30	1,52	0,18	1,38	0,08
PVI	Nocellara Etnea	1,99	0,38	1,87	0,14	1,35	0,11	1,38	0,07
Marmorina		4,97	0,67	2,47	0,14	1,97	0,11	1,25	0,06
Zaituna	Zaituna	5,76	0,91	2,69	0,20	2,04	0,13	1,32	0,07

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Peso Frutto (g)	Dev. Standard Frutto	Media Lunghezza Frutto (cm)	Dev. Standard Lunghezza Frutto (cm)	Media Larghezza Frutto (cm)	Dev. Standard Larghezza Frutto (cm)	Rapporto Lungh./Larg. Frutto	Dev. Standard Rapporto Lungh./Larg. Frutto
Biancolilla nana (962)	Biancolilla	2,80	1,13	2,02	0,23	1,45	0,17	1,39	0,09
Tonda Iblea	Tonda Iblea	5,85	1,19	2,47	0,20	2,01	0,20	1,23	0,08
P37	Sconosciute	6,38	1,13	2,66	0,21	2,19	0,16	1,21	0,06
P35	Sconosciute	4,36	0,99	2,27	0,19	1,80	0,18	1,27	0,07
P23 (2)		1,92	0,29	1,83	0,14	1,34	0,11	1,36	0,07
Moresca	Moresca	4,34	1,22	2,45	0,22	1,76	0,18	1,40	0,08
PII	Tonda Iblea	5,03	0,67	2,32	0,20	1,87	0,19	1,24	0,07
PVII (1)	Tonda Iblea	3,69	0,85	2,24	0,19	1,76	0,16	1,27	0,07
PVII (2)	Tonda Iblea	3,86	0,55	2,26	0,15	1,71	0,13	1,33	0,07
P20	Tonda Iblea	3,90	0,74	2,27	0,19	1,85	0,15	1,23	0,08
P36	Sconosciute	4,72	0,80	2,70	0,17	1,79	0,13	1,51	0,07

Tabella 3.6. Medie e dev. standard di lunghezza, larghezza e rapporto (L/A) dell'endocarpo delle accessioni analizzate.

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Media Lunghezza Endocarpo (cm)	Dev. Standard Larghezza Endocarpo (cm)	Larghezza Endocarpo Media (cm)	Dev. Standard Larghezza Endocarpo (cm)	Rapporto Lung/Larg Endocarpo	Dev. Standard Rapporto Lung/Larg Endocarpo
PIII	Biancolilla	1,57	0,15	0,90	0,08	1,75	0,17
P13	Biancolilla	1,68	0,14	0,86	0,08	1,97	0,23
P23 (1)	Biancolilla	1,51	0,20	0,90	0,11	1,69	0,17
P25	Biancolilla	1,72	0,14	0,91	0,09	1,91	0,20
XIII-80	Biancolilla	1,63	0,10	0,88	0,07	1,87	0,15
XXV-91	Biancolilla	1,66	0,17	0,85	0,08	1,95	0,17
Romana	Biancolilla	1,64	0,12	0,90	0,06	1,82	0,14
Biancolilla nana (992)	Biancolilla	1,43	0,20	0,80	0,09	1,79	0,16
Biancolilla nana (1064)		1,49	0,15	0,80	0,07	1,87	0,10
Buscionetto		1,54	0,16	0,79	0,07	1,94	0,18
Nocellara Etnea	Nocellara Etnea	1,75	0,16	0,73	0,05	2,41	0,20
P08	Nocellara Etnea	1,83	0,17	0,76	0,06	2,42	0,18
P07	Nocellara Etnea	1,54	0,20	0,72	0,06	2,13	0,26
PVI	Nocellara Etnea	1,43	0,11	0,84	0,05	1,70	0,08
Marmorina		1,55	0,07	0,97	0,06	1,60	0,10
Zaituna	Zaituna	1,76	0,15	0,96	0,06	1,84	0,17
Biancolilla nana (962)	Biancolilla	1,48	0,16	0,81	0,08	1,85	0,21
Tonda Iblea	Tonda Iblea	1,47	0,10	1,00	0,07	1,47	0,11
P37	Sconosciute	1,68	0,18	1,02	0,08	1,65	0,13

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Media Lunghezza Endocarpo (cm)	Dev. Standard Larghezza Endocarpo (cm)	Larghezza Endocarpo Media (cm)	Dev. Standard Larghezza Endocarpo (cm)	Rapporto Lung/Larg Endocarpo	Dev. Standard Rapporto Lung/Larg Endocarpo
P35	Sconosciute	1,48	0,11	0,95	0,06	1,56	0,10
P23 (2)		1,42	0,10	0,86	0,06	1,66	0,08
Moresca	Moresca	1,75	0,15	0,88	0,07	2,00	0,15
PII	Tonda Iblea	1,48	0,12	0,96	0,06	1,54	0,11
PVII (1)	Tonda Iblea	1,44	0,10	0,99	0,07	1,46	0,10
PVII (2)	Tonda Iblea	1,49	0,10	0,98	0,06	1,52	0,11
P20	Tonda Iblea	1,45	0,15	1,00	0,08	1,46	0,12
P36	Sconosciute	2,06	0,13	0,87	0,05	2,38	0,12

Tabella 3.7 Prospetto complessivo di 8 parametri qualitativi delle foglie osservati nelle accessioni di olivo analizzate.

Nome Accessione	Cultivar Popolazio ne	Foglia Forma (L/A)	Curvatura long. lamina fogliare	Foglia Angolo apicale	Foglia Angolo basale	Foglia Posizione ampiezza max	Foglia Colore pagina sup.	Foglia Colore pagina inf.	Superficie fogliare
PIII	Biancolilla	2	2	2	2	3	1	3	2
P13	Biancolilla	2	2	2	2	3	3	2	2
P23 (1)	Biancolilla	3	2	2	2	1	1	2	2
P25	Biancolilla	3	2	2	2	1	1	3	3
XIII-80	Biancolilla	3	2	2	2	3	3	2	3
XXV-91	Biancolilla	3	2	2	2	3	3	3	2
Romana	Biancolilla	4	1	2	2	1	1	3	2
Biancolilla nana (992)	Biancolilla	2	2	2	2	1	1	2	2
Biancolilla nana (1064)	Biancolilla	2	3	3	2	3	3	3	1
Buscionett o		2	2	2	2	3	3	2	2
Nocellara Etnea	Nocellara Etnea	2	1	1	2	1	1	2	2
P08	Nocellara Etnea	2	2	1	2	3	1	2	2
P07	Nocellara Etnea	3	2	2	2	3	3	2	2
PVI	Nocellara Etnea	2	3	3	3	3	3	2	1
Marmorina		2	2	2	2	2	2	2	3
Zaituna	Zaituna	3	2	1	2	3	3	2	3

TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DELLE PRINCIPALI VARIETÀ DI OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) ED OLI EXTRAVERGINE DI OLIVA SICILIANI

Biancolilla nana (962)	Biancolilla	2	2	2	2	3	3	2	2
Tonda Iblea	Tonda Iblea	2	2	2	2	3	3	2	3
P37	Sconosciut e	2	2	1	2	2	1	3	4
P35	Sconosciut e	3	1	2	2	3	3	2	2
P23 (2)	Biancolilla	3	3	3	3	3	3	2	1
Moresca	Moresca	2	3	2	2	3	1	3	2
PII	Tonda Iblea	3	2	2	2	3	3	2	2
PVII (1)	Tonda Iblea	3	2	2	2	2	2	2	2
PVII (2)	Tonda Iblea	3	2	2	2	3	1	2	2
P20	Tonda Iblea	2	2	2	2	2	2	2	2
P36	Sconosciut e	1	2	1	2	2	2	2	3

Tabella 3.8 Prospetto complessivo di 10 parametri qualitativi dei frutti osservati nelle accessioni di olivo analizzate.

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Frutto Peso	Frutto Forma (L/A)	Frutto Simmetrica	Frutto Posizione diametro max.	Frutto Forma apice	Frutto Forma base	Frutto Umbone	Presenza di lenticelle nel frutto	Dimensioni delle lenticelle	Punto inizio invaiaatura
PIII	Biancolilla	2	2	2	2	2	3	1	3	2	2
P13	Biancolilla	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3
P23 (1)	Biancolilla	3	3	2	2	2	1	1	2	2	2
P25	Biancolilla	3	3	2	2	2	1	1	3	3	2
XIII-80	Biancolilla	3	3	2	2	2	3	3	2	3	2
XXV-91	Biancolilla	2	3	2	2	2	3	3	3	2	2
Romana	Biancolilla	2	4	1	2	2	1	1	3	2	2
Biancolilla nana (992)	Biancolilla	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
Biancolilla nana (1064)	Biancolilla	1	2	3	3	2	3	3	3	1	2
Buscionetto		2	2	2	2	2	3	3	2	2	2
Nocellara Etnea	Nocellara Etnea	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2
P08	Nocellara Etnea	3	2	2	1	2	3	1	2	2	3
P07	Nocellara Etnea	2	3	2	2	2	3	3	2	2	2
PVI	Nocellara Etnea	1	2	3	3	3	3	3	2	1	2
Marmorina		2	2	2	2	2	2	2	2	3	2
Zaituna	Zaituna	3	3	2	1	2	3	3	2	3	2
Biancolilla nana (962)	Biancolilla	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2
Tonda	Tonda Iblea	2	2	2	2	2	3	3	2	3	2

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Frutto Peso	Frutto Forma (L/A)	Frutto Simmetrica	Frutto Posizione diametro max.	Frutto Forma apice	Frutto Forma base	Frutto Umbone	Presenza di lenticelle nel frutto	Dimensioni delle lenticelle	Punto inizio invasatura
Iblea											
P37	Sconosciute	3	2	2	1	2	2	1	3	4	1
P35	Sconosciute	2	3	1	2	2	3	3	2	2	2
P23 (2)	Biancolilla	1	3	3	3	3	3	3	2	1	2
Moresca	Moresca	1	2	3	2	2	3	1	3	2	2
PII	Tonda Iblea	2	3	2	2	2	3	3	2	2	2
PVII (1)	Tonda Iblea	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
PVII (2)	Tonda Iblea	3	3	2	2	2	3	1	2	2	2
P20	Tonda Iblea	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
P36	Sconosciute	2	1	2	1	2	2	2	2	3	3

Tabella 3.9 Prospetto complessivo di 12 parametri qualitativi dell'endocarpo osservati nelle accessioni di olivo analizzate.

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Endocarpo Forma (Lu/La)	Endocarpo Simmetria	Endocarpo Posizione diametro massimo	Endocarpo Superficie	Endocarpo Numero di solchi fibrovascolari	Distribuzione solchi	Andamento solchi fibrovascolari	Linea di sutura	Endocarpo Forma della sezione trasversale	Endocarpo Forma apice	Endocarpo Forma base	Mucrone
PIII	Biancolilla	3	2	2	3	2	2	2	1	1	1	2	1
P13	Biancolilla	3	3	2	3	2	2	2	1	1	2	2	2
P23 (1)	Biancolilla	2	2	2	3	1	2	2	2	1	2	3	1
P25	Biancolilla	3	2	2	3	2	2	2	1	1	1	2	1
XIII-80	Biancolilla	3	2	2	3	2	1	2	1	1	1	2	1
XXV-91	Biancolilla	3	2	2	3	2	1	1	2	1	1	2	1
Romana	Biancolilla	3	1	3	3	2	1	1	2	1	2	2	1
Biancolilla nana (992)	Biancolilla	3	2	2	2	2	1	2	2	1	2	3	2
Biancolilla nana (1064)		3	1	3	2	2	1	2	1	1	2	1	2
Buscione tto		3	1	2	3	2	1	1	1	1	2	2	2
Nocellara Etnea	Nocellara Etnea	4	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1
P08	Nocellara Etnea	4	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1
P07	Nocellara Etnea	4	2	2	2	3	1	1	1	1	1	2	1
PVI	Nocellara Etnea	2	1	3	1	2	1	2	2	2	2	2	1
Marmorina		2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2

TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DELLE PRINCIPALI VARIETÀ DI OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) ED OLI EXTRAVERGINE DI OLIVA SICILIANI

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Endocarpo Forma (Lu/La)	Endocarpo Simmetria	Endocarpo Posizione diametro massimo	Endocarpo Superficie	Endocarpo Numero di solchi fibrovascolari	Distribuzione solchi	Andamento solchi fibrovascolari	Linea di sutura	Endocarpo Forma della sezione trasversale	Endocarpo Formal apice	Endocarpo Forma base	Mucrone
Zaituna	Zaituna	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Biancolilla nana (962)	Biancolilla	3	1	2	3	2	2	1	1	2	2	3	1
Tonda Iblea	Tonda Iblea	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	3	2
P37	Sconosciute	2	2	2	3	2	1	1	1	2	2	3	2
P35	Sconosciute	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2
P23 (2)		2	1	3	2	1	1	1	2	2	2	2	1
Moresca	Moresca	3	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1
PII	Tonda Iblea	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	3	2
PVII (1)	Tonda Iblea	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	3	2
PVII (2)	Tonda Iblea	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	3	2
P20	Tonda Iblea	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	3	2
P36	Sconosciute	4	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1	1

Tabella 3.10 Prospetto complessivo di 3 parametri relativi all’habitus delle piante e 3 all’infiorescenza osservati nelle accessioni di olivo analizzate.

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Vigore	Portamento	Chioma	Fiore Struttura	Lunghezza Media Infiorescenze	Numero medio fiori
P111	Biancolilla	2	2	1	1	2	1
P5	Biancolilla	3	1	2	1	1	1
P13	Biancolilla	2	2	1	2	1	1
P23 (1)	Biancolilla	2	2	2	2	1	1
P25	Biancolilla	3	2	2	1	1	1
XIII-80	Biancolilla	3	2	3	2	1	1
XXV-91	Biancolilla	3	1	2	1	1	1
Romana	Biancolilla	3	1	2	2	1	2
Biancolilla nana (992)	Biancolilla	2	2	2	2	1	1
Biancolilla nana (1064)		3	1	3	1	1	1
Buscionetto		3	1	2	2	1	1
Nocellara Etnea	Nocellara Etnea	3	1	2	2	1	1
P08	Nocellara Etnea	3	1	2	2	1	2
P07	Nocellara Etnea	3	1	2	1	1	1
PVI	Nocellara Etnea	3	2	2	1	1	1
Marmorina		3	1	2	2	1	2
Zaituna	Zaituna	3	3	2	2	1	1

Nome Accessione	Cultivar Popolazione	Vigore	Portamento	Chioma	Fiore Struttura	Lunghezza Media Infiorescenze	Numero medio fiori
Biancolilla nana (962)		2	3	1	1	1	1
Tonda Iblea	Biancolilla	2	3	1	2	1	1
P37	Tonda Iblea	3	3	3	2	1	2
P35	Sconosciute	2	2	1	2	1	1
P23 (2)	Sconosciute	3	2	2	1	2	1
Moresca	Moresca	3	1	1	2	1	1
PII	Tonda Iblea	2	2	1	2	1	1
PVII (1)	Tonda Iblea	1	2	1	2	1	1
PVII (2)	Tonda Iblea	3	2	2	2	1	1
P20	Tonda Iblea	2	2	1	2	1	1
P36	Sconosciute	3	1	3	2	1	1

Tabella 3.11 Matrice delle correlazioni lineari semplici dei 36 parametri morfologici considerati. *, **, ***, rappresentano, rispettivamente la significatività per $p\text{-value} \leq 0,05$, $p\text{-value} \leq 0,01$, $p\text{-value} \leq 0,001$.

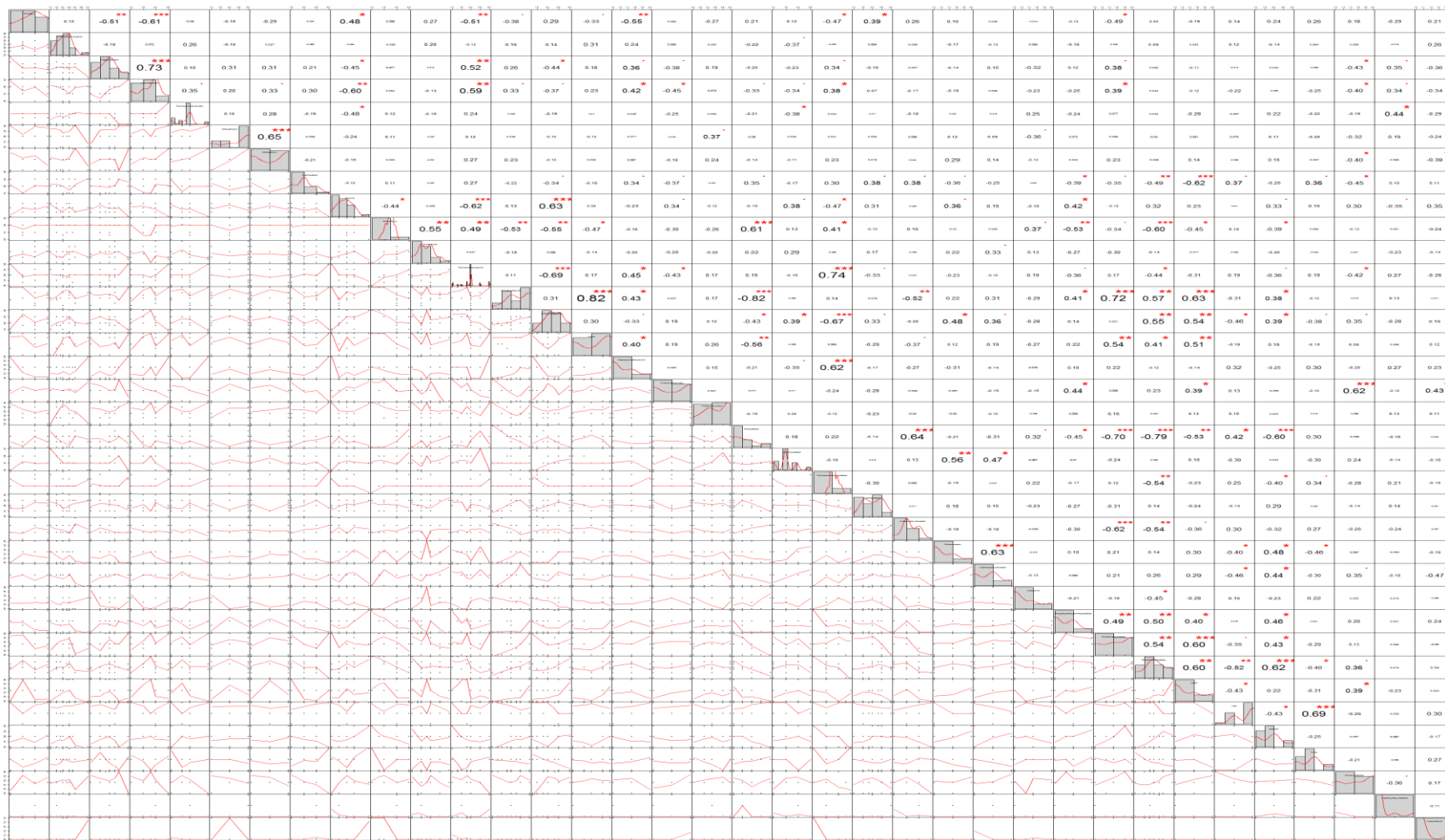


Tabella 3.12 Percentuale della varianza spiegata e cumulativa tra le accessioni di
olivo analizzate riscontrata nei primi 26 principal components (PC).

Componente principale	Deviazione Standard	Varianza spiegata (%)	Cumulativa (%)
PC1	1,446	23,1%	23,1%
PC2	1,314	19,0%	42,1%
PC3	1,014	11,4%	53,4%
PC4	0,846	7,9%	61,3%
PC5	0,783	6,8%	68,1%
PC6	0,732	5,9%	74,0%
PC7	0,662	4,8%	78,8%
PC8	0,589	3,8%	82,7%
PC9	0,527	3,1%	85,7%
PC10	0,445	2,2%	87,9%
PC11	0,423	2,0%	89,9%
PC12	0,391	1,7%	91,6%
PC13	0,375	1,6%	93,1%
PC14	0,343	1,3%	94,4%
PC15	0,312	1,1%	95,5%
PC16	0,285	0,9%	96,4%
PC17	0,257	0,7%	97,1%
PC18	0,228	0,6%	97,7%
PC19	0,215	0,5%	98,2%
PC20	0,207	0,5%	98,7%
PC21	0,182	0,4%	99,1%
PC22	0,170	0,3%	99,4%
PC23	0,165	0,3%	99,7%
PC24	0,121	0,2%	99,8%
PC25	0,094	0,1%	99,9%
PC26	0,078	0,1%	100,0%

Tabella 3.13. Correlazione tra le variabili originarie e le prime tre principal components (PC).

Variabili	PC1	PC2	PC3
Forma foglia	0,0588	0,2370	-0,2247
Curvatura long lamina fogliare	0,0200	0,0400	0,1780
Angolo apicale foglia	0,0466	-0,2858	0,1426
Angolo basale foglia	0,0557	-0,2448	0,1718
Posizione ampiezza max foglia	0,0179	-0,0650	0,0140
Colore pagina sup	0,1013	-0,3984	-0,4206
Colore pagina inf	0,1734	-0,5386	-0,3614
Superficie fogliare	-0,1438	-0,0386	0,0644
Peso frutto	0,1039	0,2764	-0,1567
Forma frutto L A	-0,1363	-0,0608	-0,0716
Simmetria frutto	-0,0587	0,0327	-0,1229
Posizione diametro max frutto	-0,1078	-0,2632	0,1788
Forma dell apice frutto	0,3189	-0,0875	0,2587
Forma della base frutto	0,2044	0,2040	-0,1330
Umbone	0,1706	-0,0225	0,2430
Presenza di lenticelle nel frutto	-0,0122	-0,1050	0,2461
Dimensioni delle lenticelle	0,0433	0,1283	0,0149
Punto d'inizio invaiatura	0,0352	-0,0856	-0,0002
Forma endocarpo	-0,4096	0,0189	-0,1984
Simmetria endocarpo	0,0220	0,0892	-0,1869
Posizione diametro max endocarpo	-0,0743	-0,1285	0,1113
Superficie endocarpo	0,0401	0,0767	-0,1953
Numero di solchi fibrovascolari	-0,1413	-0,0062	-0,1224
Distribuzione solchi	0,1212	0,0230	-0,1807
Andamento solchi fibrovascolari	0,1188	0,0104	-0,0879
Linea di sutura	-0,1165	0,0294	0,0469
Forma della sezione trasversale Endocarpo	0,1179	0,0307	0,0329
Forma dell'apice endocarpo	0,2005	-0,0858	0,1694

Variabili	PC1	PC2	PC3
Forma della base endocarpo	0,3602	0,1347	0,0797
Mucrone	0,1976	0,0349	0,0264
Vigore	-0,2472	-0,0456	0,0586
Portamento	0,3464	0,0650	-0,1652
Chioma	-0,2514	0,0125	0,1447
Struttura infiorescenza	0,0644	0,1965	0,0252
Lunghezza media infiorescenza	0,0071	-0,0538	0,0375
Numero medio fiori	-0,0149	0,0563	0,0446

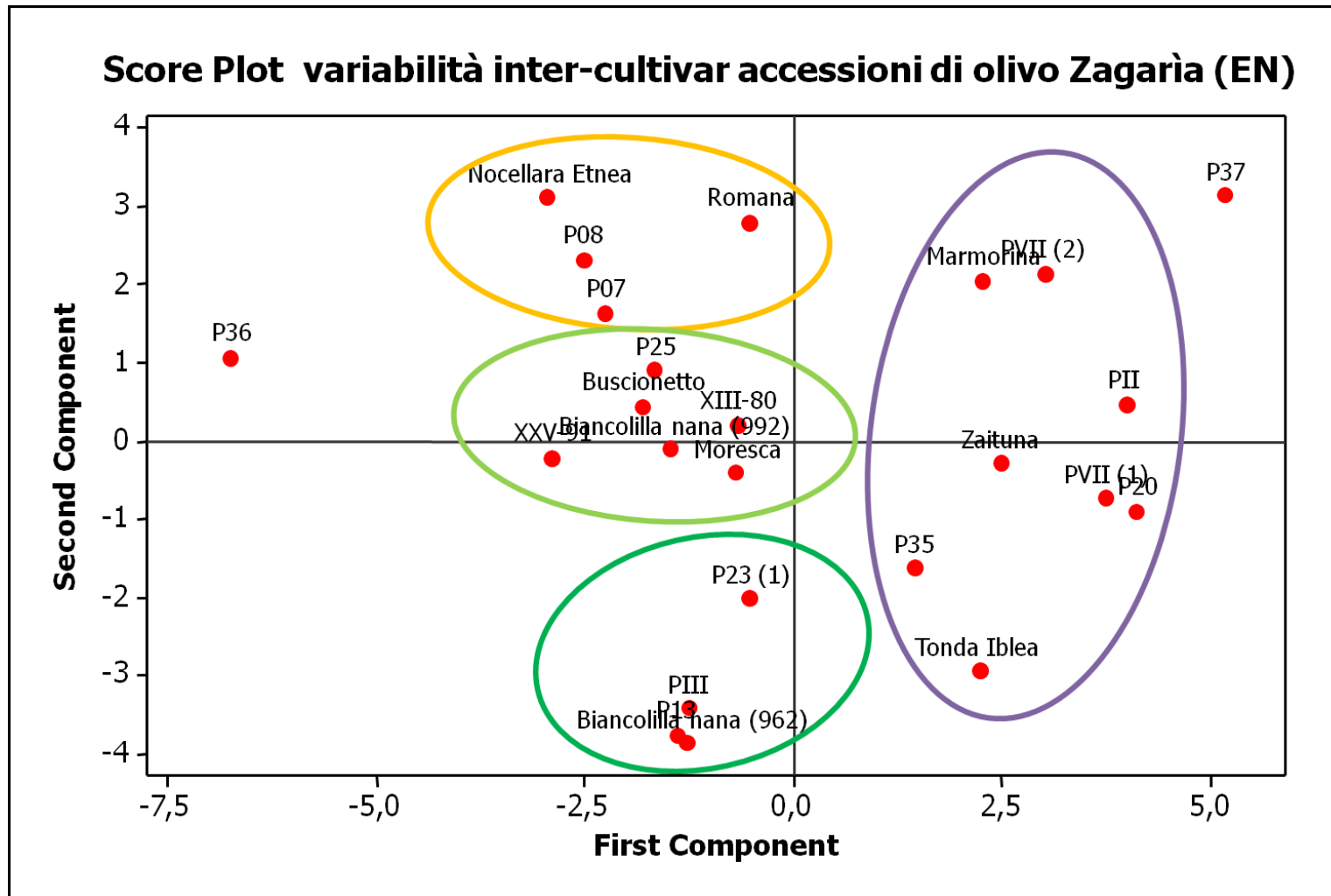


Figura 3.4 Score plot delle accessioni di olivo analizzate in riferimento alle prime 2 principal components (PC).

3.4. Conclusioni

Le osservazioni di carattere morfologico effettuate eseguiti nel Campo di Collezione di Germoplasma di Olivo di “Zagaria” – Enna hanno consentito di discriminare le accessioni delle cultivar popolazione in esame. La variabilità riscontrata è stata sufficiente per poter distinguere le accessioni anche all’interno delle cultivar popolazione, confermando l’elevata varianza epigenetica riconosciuta nel germoplasma siciliano. Difatti le tre cultivar, Biancolilla, Nocellara Etnea e Tonda Iblea, si sono separate in cluster diversi; aspetto di ulteriore rilievo è stato il fatto che la Biancolilla si è distinta in due differenti cluster. Le valutazioni morfologiche hanno confermato la presenza di una accessione, Buscionetto, distinta dalla Biancolilla, e spesso denominata Biancolilla di Caltabellotta. Inoltre, la accessione Romana, precedentemente attribuita alla popolazione clonale di Biancolilla, si è perfettamente distinta da quest’ultima. Un altro interessante risultato è stata la possibilità di distinguere la Zaituna dalla Marmorina, in cui i caratteri maggiormente discriminanti sono stati quelli carpologici.

Tali risultati, anche se preliminari, appaiono di rilievo; la caratterizzazione morfologica delle accessioni e ecotipi locali, difatti apre la possibilità di selezionare tali individui per programmi di breeding e miglioramento genetico. Infatti, al fine di poter validare le osservazioni morfologiche analizzate, sarà affrontato nel prossimo capitolo una caratterizzazione morfologica con queste accessioni per confermare la variabilità morfologica riscontrata; le analisi di *genotyping* e di individuazione varietale in combinazione con lo studio dei caratteri morfologici con elevato indice di correlazione, per esempio caratteri dell’endocarpo, si sono già rilevate di grande interesse (Belaj *et al.*, 2011); l’identificazione di caratteri specifici per ciascuna cultivar possono permettere un riconoscimento immediato e di grande utilità dal tecnico in campo al ricercatore in programmi di miglioramento genetico.

3.5. Bibliografia

- Baldini E., Marangoni B. 1993. Coltivazioni arboree, Loescher editore.
- Baldoni L. 2007. Recupero conservazione e valorizzazione del germoplasma olivicolo. Progetto Interregionale OLVIVA - Convegno Nazionale. Valenzano (BA) 26 Febbraio 2007.
- Barone E, Di Marco L, Motisi A & Caruso T (1994) The Sicilian olive genoplasm and its characterization by using statistical methods. *Acta Horticulturae* 356: 66-69.
- Barone E., Motisi A., Zappia R., Di Marco L. (1995) - *Utilizzazione del legno di olivo nella Piana di Gioia Tauro*. Atti Convegno su Arboricoltura da legno e politiche
- Bass DA, Crossman ND, Lawrie SL, Lethbridge MR (2006). The importance of population growth, seed dispersal and habitat suitability in determining plant invasiveness. *Euphytica* 148: 97-109.
- Bottari V and Spina P. (1952). Le varietà di olivo coltivate in Sicilia. *Annuario Sper. Agric.* 7: 937-1004.
- Breton C., Tersac M. and Bervillè A. (2006). Olive and oleaster (*Olea europaea*) in the Mediterranean. *Journal of Biogeography*. 33: 1916-1928.
- Caruso, T., Cartabellotta, D., and Motisi, A. (2007). Cultivar di Olivo Siciliane. Identificazione, validazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e qualità degli oli. Regione Siciliana Assessorato Agricoltura e Foreste - Dipartimento Culture Arboree Università degli Studi di Palermo.
- Cimato A. 2006. Olivicoltura & biodiversità dell'area naturale protetta d'interesse locale (ANPIL) del Monteferrato.
- Cimato A., Cantini C., Sani G., Marranci M. (1997) - *Il germoplasma dell'olivo in Toscana*. Arsia-Regione Toscana.
- Cimato A., Sani G., De Rinaldis G., Calogiuri L.A, 2001. Il germoplasma olivicolo in Provincia di Lecce. Recupero, conservazione, selezione e caratterizzazione delle varietà autoctone. Industria Grafica, Matino (Le).
- Fontanazza G., 2005. Studio del germoplasma olivicolo e valutazione qualitativa degli oli della Provincia di Enna. CNR e Provincia Regionale di Enna. Tipografia Arti Grafiche Jesus, Leonforte.
- Green PS (2002). A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bull.* 57: 91-140.
- Harrell Jr F.E, Charles Dupont C. *et al.* (2015). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 3.17-0. <http://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
- La Mantia, M., Lain, O., Caruso, T., and Testolin, R. (2005). SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80 (5), 628-632.
- Lavee S. (1996) - *Biologia e fisiologia dell'olivo*. In: *Enciclopedia mondiale dell'olivo*. COI, Madrid. Pp. 61-110.
- Lombardo N., Iannotta N., Rizzuti B. (1986) - *Ristrutturazione di oliveti tradizionali calabresi*. *Annali Ist. Sperim. Oliv.*, vol. 8.
- Meier U (2001) *Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants*, 2nd edn. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- Morettini A. (1972) - *Olivicoltura*. REDA, Roma.

- Muzzalupo, I. and ; Perri, E. (2008). Genetic Characterization of Olive Germplasm by Molecular Markers. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2: 1 60-68.
- Pisante M., Inglese P., Lercker G., (Eds)2009. Germoplasma e varietà. In L'ulivo e l'olio. Ed Script, Bologna. Bayer Crop Science.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rapoport H.F. (1998) - *Botanica y morfologia*. In: Barranco D., Fernandez-Escobar R., Rallo L. (Ed.). El cultivo del olivo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. Pp. 37-60.
- Tous J., Romero A. (1993) - *Variedades del olivo*. Ed. Fundacion "la Caixa", Barcelona.
- Trujillo, I., Ojeda, M.A., Urdiroz, N.M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., Diez, C.M. Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers (2014) *Tree Genetics and Genomes*, 10 (1), pp. 141-155
- Wickham H. (2009). ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer New York, 2009
- Zohary D, and P. Spiegel-Roy. (1975). Beginning of fruit growing in the old world. *Science* 188: 319-327.

CAPITOLO 4

CARATTERIZZAZIONE GENETICO MOLECOLARE DI GERMOPLASMA OLIVICOLO SICILIANO

4.1. Abstract

L'olivo è una delle più importanti colture arboree da frutto a vivere nel bacino del Mediterraneo. Il germoplasma olivicolo in Sicilia si caratterizza per la presenza di un'ampia diversità genetica, per l'antica domesticazione e distribuzione geografica, e anche per caratteristiche biologiche quali allogamia e incompatibilità fiorale. Sessantadue accessioni provenienti dalle più importanti regioni olivicole italiane e spagnole, tra cui alcuni presunti cloni di quattro principali cultivar della Sicilia Sud-Orientale, sono stati inclusi in questo studio. Queste accessioni sono state analizzate con otto microsatelliti nucleari (nuSSR), sei marcatori SCAR-derivati e sei marcatori microsatelliti cloroplasti (cpSSR) mediante analisi *High Resolution Melting* (HRM) ed elettroforesi capillare (EC) al fine discriminare la massima variabilità genetica tra le accessioni anche a livello intracultivar. I marcatori nucleari, tra cui i microsatelliti, sono stati altamente informativi e hanno permesso di discriminare tutte le varietà con poche eccezioni. Questi marcatori hanno permesso anche l'identificazione univoca di alcuni cloni appartenenti alle cultivar di "Tonda Iblea", "Biancolilla", "Moresca" e "Nocellara Etnea". Come previsto, i marcatori plastidiali hanno rilevato un basso livello di polimorfismo in confronto con agli altri marcatori molecolari utilizzati. Nel complesso, l'individuazione di risorse genetiche utili, così come il polimorfismo riscontrato all'interno delle cultivar popolazioni, potrebbe aprire interessanti prospettive per programmi di selezione clonale e studio di popolazioni. L'analisi in HRM ha mostrato un elevato potere discriminante se paragonato alla elettroforesi

capillare (EC), fornendo informazioni utili nella definizione della variabilità genetica all'interno della specie e delle varietà.

4.2. Introduzione

L'olivo è una tra le più antiche specie arboree coltivate nel bacino del Mediterraneo e l'unica tra le circa 30 specie appartenenti al genere *Olea* (ordine *Ligustrales*, famiglia *Oleaceae*,) con frutto edule. L'ampia variabilità genetica all'interno della specie è data da molteplici fattori tra i quali sembrano giocare un ruolo chiave la allogamia e l'auto-incompatibilità.

Per la caratterizzazione genetica dell'olivo sono stati utilizzati differenti tipologie di marcatori molecolari, sia su DNA estratto da tessuto vegetale di olivo, che su DNA da olio d'oliva: RAPD (Besnard *et al.*, 2001b; Belaj *et al.*, 2003; Ganino *et al.*, 2007), AFLP (Angiolillo *et al.*, 1999), SCARs (Busconi *et al.*, 2006), ISSRs (Gemmas *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2009), SSR (Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2006; Belaj *et al.*, 2007; Breton *et al.*, 2008; Muzzalupo *et al.*, 2009; Erre *et al.*, 2010), e SNP (Reale *et al.*, 2006; Muleo *et al.*, 2009; Hakim *et al.*, 2010).

Per la facilità di analisi, la riproducibilità e la variabilità presente, i marcatori maggiormente utilizzati negli ultimi anni nell'ambito della caratterizzazione genetica e molecolare delle piante arboree da frutto, sono stati gli SSR. I microsatelliti sono stati e sono tutt'ora i marcatori maggiormente utilizzati in studi molecolari nell'olivo, in quanto sono altamente polimorfici e riproducibili. Diversi autori hanno sviluppato marcatori SSR in olivo e sono tutt'ora ampiamente utilizzati per l'analisi molecolare (Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002). In *Olea europaea* L., questi marcatori hanno avuto applicazione per individuazione e discriminazione di cultivar (Sarri *et al.*, 2006), studi di filogenesi di olivo e olivastro (Belaj *et al.*, 2007), costruzione di mappe di associazione (De la Rosa *et al.*, 2003), paternity test (Mookerjee *et al.*, 2005) e identificazione della composizione varietale in olio d'oliva.

Recentemente hanno trovato applicazione per lo studio della variabilità genetica in olivo marcatori molecolari come gli SNP. Essi prendono in

riferimento lo studio di mutazioni puntiformi (sostituzioni, inserzioni e delezioni) all'interno di una sequenza nota di DNA. Sono abbondanti all'interno del genoma, altamente riproducibili ma richiedono un alto livello d'informazione nella sequenza genica. Alcuni autori definiscono gli SNP come marcatori di nuova generazione (Reale *et al.*, 2006), essi sono stati utilizzati in olivo anche mediante analisi High Resolution Melting (HRM) che ha permesso di identificare la presenza di mutazioni per sostituzione sia in stato eterozigote che omozigote (Muleo *et al.*, 2009). L'utilizzo dei marcatori molecolari è servito a caratterizzare buona parte della variabilità genetica in olivo verificando la presenza di cloni geneticamente differenti all'interno della stessa cultivar in modo da massimizzare l'efficienza dei programmi di selezione clonale.

La caratterizzazione molecolare del panorama olivicolo siciliano, già affrontata da diversi autori (La Mantia *et al.*, 2005, Caruso *et al.*, 2007, Las Casas *et al.*, 2014) rappresenta un aspetto molto importante per l'identificazione e valorizzazione varietale dei fruttiferi.

Il presente lavoro ha come obiettivo di realizzare una caratterizzazione genetica delle più importanti cultivar presenti nel panorama olivicolo regionale ed internazionale, utilizzando marcatori cloroplastici e nucleari Tali marcatori sono stati analizzati mediante una tecnica di analisi innovativa ed altamente performante nota come High Resolution Melting (HRM) ponendo particolare attenzione alle diverse accessioni appartenenti alla stessa cultivar-popolazione di Biancolilla, Tonda Iblea, Moresca e Nocellara Etnea allo scopo di validare le potenzialità della tecnica per identificare variabilità a livello clonale.

4.3. Materiali e metodi

4.3.1. Prelievo del materiale vegetale e estrazione del DNA

Il germoplasma di olivo investigato (Tabella 4.1) ha incluso 44 accessioni di olivo originarie della Sicilia, 2 accessioni italiane, riconosciute ed apprezzate a livello mondiale, e 16 cultivar internazionali (Tabella 4.1.) Il materiale vegetale delle varietà di olivo analizzate è stato campionato presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania in C.da Primosole e dal Campo Collezione di Germoplasma di Olivo, realizzato dal CNR- ISAFOM e Provincia Regionale di Enna, sito in C.da Zagaria (Enna-Pergusa) (Tabella 4.1). Le foglie sane sono state raccolte, lavate con acqua, congelate e conservate alla temperatura di -80°C , fino al momento dell'analisi. Tutte le accessioni sono state confrontate con altre varietà di olivo ed un olivastro (n.b. *acebuchina*), provenienti dal CSIC-IAS (Istituto di Agricoltura Sostenibile) di Cordoba (Spagna); essi comprendono le cultivar più rappresentative e di maggiore diffusione per importanza colturale ed economica nella penisola iberica (Tabella 4.2). I campioni sono stati conservati a -80°C fino all'estrazione del DNA, effettuata con l'aiuto del *Qiagen TissueLyser*, uno strumento che permette la frantumazione del tessuto vegetale senza l'impegno di azoto liquido (N_2). Nell'apposito supporto dello strumento sono stati sistemati un tubo eppendorf per ogni campione, contenente 0,1 g di tessuto vegetale, 450 μl di *Lysis Buffer PD* del kit di estrazione della *Bioline ISOLATE PLANT DNA MINI KIT* e la biglia metallica necessaria alla frantumazione. La macchina è stata programmata con una frequenza di 30 Hz per 5 minuti; dopo l'avvenuta frantumazione i campioni sono stati incubati a 65°C per 1 h e 30 min, o fin quando i campioni non sono stati completamente lisati. Quindi, si è proceduto con l'estrazione secondo il protocollo del kit. La concentrazione del DNA, il rapporto 260/280 e il rapporto 230/260 dei campioni di olivo ottenuti sono stati verificati mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro, Nanodrop 2000. I campioni sono stati diluiti fino ad ottenere una concentrazione di circa 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ e conservati a -20°C .

4.3.2. **Analisi HRM con marcatori molecolari plastidiali e nucleari**

Per l'analisi HRM, sono stati utilizzati 9 marcatori plastidiali (Tabella 4.3), 8 nucleari SCAR-derivati (Tabella 4.4) e 8 primer microsatelliti nucleari (nuSSR) (Tabella 4.5). Le amplificazioni di PCR sono state ottenute in un volume totale di 15 μ l utilizzando il termociclatore Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany). Per le reazioni di amplificazione sono stati impiegati 25-30 ng di DNA, HRM PCR Master Mix 1X contenente EvaGreen® 0,7 μ M di primer, con un ciclo di 5 min di denaturazione iniziale a 95 °C e 40 cicli di 10s a 95 °C, 30 s di temperatura di annealing per singolo primer, e 12 s a 72 °C e poi un'estensione finale di 2 minuti a 72 °C. I campioni sono stati sottoposti ad un incremento di temperatura tra 65-85°C di 0,1°C ogni due secondi, così facendo i campioni sottoposti a denaturazione hanno permesso la formazione delle curve di *melting* specifiche per ogni tratto di sequenza. I dati dell'analisi HRM sono stati analizzati con software Rotor-Gene Q Pure Detection (Version 2.1).

4.3.3. **Analisi statistica e variabilità genetica**

Dai risultati ottenuti è stata costruita una matrice di similarità, elaborata con il software PowerMarker Versione 3.25 (Liu e Muse, 2005). Tale software è stato utilizzato dapprima per generare, dalla matrice binaria, una matrice delle distanze, utilizzando il coefficiente *Nei1983*, e poi per costruire un albero filogenetico utilizzando l'algoritmo Neighbor-joining (Saitou e Nei, 1987). Per la visualizzazione del dendrogramma è stato utilizzato il software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

Tabella 4.1 Accessioni di olivo analizzate con marcatori plastidali e nucleari mediante HRM.

id	Nome Accessione	Origine	Provenienza	Core Collection
1	Biacollilla (2)	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
2	Cerasuola	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
3	Giarfara	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
4	Manzanilla	Spagna	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
5	Marmorina (2)	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
6	Moresca (2)	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
7	Nocellara del Belice	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
8	Nocellara Etnea (2)	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
9	Ogliarola messinese	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
10	Passalunara	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
11	Tonda Iblea (2)	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
12	Zaituna (2)	Sicilia	Catania	Azienda Agraria Sperimentale Università di Catania
13	Biancolilla nana (1064)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
14	Biancolilla nana (962)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
15	Biancolilla nana (992)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
16	Buscionetto	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
17	Calamignara	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
18	Castriciana	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
19	Chemlali	Tunisia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
20	Chetoui	Tunisia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)

id	Nome Accessione	Origine	Provenienza	Core Collection
21	Frantoio	Italia (Toscana)	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
22	Giarraffa	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
23	Koroneiki	Grecia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
24	Leccino	Italia (Toscana)	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
25	Leucocarpa	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
26	Marmorina (1)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
27	Moresca (1)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
28	Nocellara Etnea (1)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
29	PII (<i>Tonda Iblea</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
30	PIII (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
31	PVI (<i>Nocellara Etnea</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
32	PVII (1) (<i>Tonda Iblea</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
33	PVII (2) (<i>Tonda Iblea</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
34	P07 (<i>Nocellara Etnea</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
35	P08 (<i>Nocellara Etnea</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
36	P13 (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
37	P20 (<i>Tonda Iblea</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
38	P23 (1) (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
39	P23 (2) (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
40	P25 (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
41	P35 (<i>Sconosciuta</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
42	P36 (<i>Sconosciuta</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)

id	Nome Accessione	Origine	Provenienza	Core Collection
43	P37 (<i>Sconosciuta</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
44	P5 (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
45	Picholine marocaine	Marocco	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
46	Picudo	Spagna	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
47	Romana (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
48	Tonda Iblea (1)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
49	Verdese	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
50	XIII-80 (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
51	XXV-91 (<i>Biancolilla</i>)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
52	Zaituna (1)	Sicilia	Enna	Campo Collezione di Germoplasma di Olivo Zagaria (Enna)
53	Arbequina	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
54	Hojiblanca	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
55	Galega Vulgar	Portogallo	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
56	Gordal	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
57	Blanqueta	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
58	Villalonga	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
59	Lechín de Sevilla	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
60	Acebuchina	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
61	Farga Milenaria	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)
62	Farga Canetera	Spagna	Cordoba	CSIC-IAS (Cordoba - Spagna)

Tabella 4.2 Aplotipi cloroplastici di discriminati da Perez-Jimenez et al., (2013), varietà elencate sono state utilizzate come controllo per per la caratterizzazione delle cultivar popolazione.

Nome Accessione	Aplotipo	Peso Molecolare (bp) Locus 51	Peso Molecolare (bp) Locus 27	Peso Molecolare (bp) Locus 38	Peso Molecolare (bp) Locus 46	Peso Molecolare (bp) Locus 57	Peso Molecolare (bp) Locus 11
Arbequina	<i>E1-1</i>	125	107	104	109	224	103
Hojiblanca	<i>E1-1</i>	125	107	104	109	224	103
Galega Vulgar	<i>E1-2</i>	124	107	104	109	224	103
Gordal	<i>E1-2</i>	124	107	104	109	224	103
Blanqueta	<i>E1-3</i>	124	107	104	109	224	103
Villalonga	<i>E1-3</i>	124	107	104	109	224	103
Lechín de Sevilla	<i>E2-3</i>	117	107	105	108	221	114
Acebuchina	<i>E2-3</i>	117	107	105	108	221	114
Farga Milenaria	<i>E3-1</i>	125	108	105	109	222	112
Farga Canetera	<i>E3-1</i>	125	108	105	109	222	112

Tabella 4.5 Primer SSR utilizzati, sequenza dei primer, motivo ripetuto e range di lunghezza.

Locus SSR	Sequenza Primer (5'-3')	Motivo Ripetuto	Range (bp)
ssrOeUA-DCA3 ¹	CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC TGCTTTTGTCTGTTTGAGATGTTG	(GT) ₁₉	246-274
ssrOeUA-DCA9 ¹	AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG GATCCTTCCTCAAAGTATAACCTCTC	(GT) ₂₃	181-231
ssrOeUA-DCA16 ¹	TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	140-250
GAPU59 ²	CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA CAAAGGTGCACTTTCTCTCG	(CT) ₉	220-248
GAPU101 ²	CATGAAAGGAGGGGGACATA GGCACTTGTGTGCAGATTG	(GA) ₈ (GA) ₃ (AG) ₃	201-238
UDO99-008 ³	AAAAACACAACCCGTGCAAT AAATTCCTCCAAGCCGATCT	(AC) ₁₃	174-188
UDO99-012 ³	TCACCATTCTTAACTTCACACCA TCAAGCAATTCCACGCTATG	(GT) ₁₀	174-186
UDO99-024 ³	GGATTTATTTAAAAGCAAAACATACAAA CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA	(CA) ₁₁ (TA) ₂ (CA) ₄	184-218

¹ Sefc et al., 2000

² Carriero et al., 2002

³ Cipriani et al., 2002

4.4. Risultati e discussione

4.4.1. Analisi HRM con marcatori molecolari plastidiali e nucleari

L'analisi ha riguardato la caratterizzazione molecolare di locus plastidiali e nucleari su varietà di olivo mediante High Resolution Melting (HRM). Tra le 25 coppie di primer selezionate solo 20 hanno prodotto profili genetici di chiara interpretazione ed analisi.

In particolare, per quanto riguarda i marcatori cloroplastici sono stati altamente discriminanti per l'analisi HRM i marcatori L51, L27, L38, L46, L57, L11 (Figura 4.1). Questi hanno mostrato curve di *melting* chiare e definite permettendo una migliore distinzione dei profili. Invece, i loci L1, L10, L19 sono stati scartati in quanto presentavano prodotti aspecifici. I primer cloroplastici, infatti, presentano come caratteristica quella di essere ereditati per via materna, e di conseguenza si trovano generalmente in condizione omozigote.

I primer cloroplastici hanno mostrato una bassa variabilità rispetto ai valori attesi, basati sul lavoro di Perez-Jimenez *et al.* (2013); gli autori avevano discriminato la presenza di ben 5 complessivi diversi aplotipi che solo in parte sono stati riscontrati in tutti i loci oggetto della nostra analisi.

I marcatori cloroplastici, analizzati mediante HRM, hanno così evidenziato la presenza di una media di 2 alleli, con un massimo di 3 per il primer L11 e solo 1 per il primer L27. Gli stessi hanno presentato una "Maggiore Frequenza Allelica" media di 0,84 con un massimo di 1 (primer L27) e un minimo di 0,61 (primer L57). Per quanto riguarda invece il PIC (*Polymorphism Information Content*) si è osservato un massimo di 0,36 (primer L57) e un minimo di 0,06 (primer L51), con una media pari a 0,19 (Tabella 4.6). Nel lavoro di Perez-Jimenez *et al.*, gli autori avevano dimostrato la presenza di variabilità attraverso l'analisi degli amplificati in elettroforesi capillare. I nostri risultati hanno evidenziato problemi nel verificare la differenza del profilo genico di genotipi conosciuti che presentavano una variazione del peso molecolare dell'amplificato compresa tra 1-2 bp (Tabella 4.7). Questo potrebbe essere dovuto a diversi fattori: dalla natura stessa del plastidioma di olivo, ovvero

alla presenza di regioni molto conservate con un accumulo di mutazioni rare nel tempo oppure dalle caratteristiche genetiche dove si riscontra un'elevata percentuale di A:T rispetto G:C. In particolare, non è stato possibile discriminare accessioni come "Farga C." e "Farga M." (aplotipo E 3-1) che presentavano un peso molecolare di 108 bp rispetto a quello degli altri aplotipi (107 bp) riferiti allo stesso primer (Tabella 4.7). Il primer L11 ha permesso una perfetta identificazione di diversi aplotipi caratterizzati in precedenza da Perez-Jimenez *et al.*, (Figura 4.1).

Per quanto riguarda lo studio delle medesime accessioni con primer di origine nucleare, essi si sono mostrati fin da subito molto polimorfici rispetto ai primer cloroplastici. I profili analizzati sono stati facilmente interpretati e mediante l'analisi HRM, con l'ausilio del software Screen Clust è stato possibile assegnare e definire a ciascuna accessione il genotipo corrispondente. L'HRM è stata impiegata per l'analisi di sequenze SCAR (Hernandez *et al.*, 2001): le accessioni che hanno mostrato l'amplificato sono state solo 4 tra cui "Arbequina", "Blanqueta", e "Frantoio". Invece, il primer Q6, disegnato su "Gordal", ha presentato l'amplificazione di solo una parte delle accessioni tra cui la cultivar popolazione Biancolilla, con la sola eccezione di "P23 (2)" e "Romana" (Figura 4.2). Questo primer si ritiene molto interessante, poiché ha permesso di discriminare quasi perfettamente i cloni della cultivar-popolazione di "Biancolilla" da quelli di "Tonda Iblea" e "Nocellara dell'Etna", che invece hanno mostrato la presenza di amplificazione (Figura 4.2). Nonostante ciò, il primer Q6 ha permesso la discriminazione di ben 4 diversi genotipi; in particolare, l'accessione "Verdese" (in rosa) ha mostrato una curva con un doppio punto di flesso rispetto alle altre accessioni amplificate; il doppio punto di flesso coincide ad una condizione di eterozigosi dell'allele (Figura 4.3). I primer nucleari utilizzati hanno mostrato per la "Maggiore Frequenza Allelica" una media di 0,8 con un massimo di 1,0 per i primer Q2 e Q8 e un minimo di 0,32 nel primer Q3. Per quanto riguarda il PIC si è avuto un massimo di 0,691 nel primer Q2 e un minimo 0,166 nel primer Q4 con una media di 0,258 (Tabella 4.8).

Invece, i primer nuSSR utilizzati, in High Resolution Melting, hanno dato risultati soddisfacenti e determinanti per l'analisi di genotipizzazione. Hanno permesso, infatti, di discriminare in modo alquanto preciso le cultivar popolazioni di Biancolilla, Tonda Iblea e Nocellara Etnea. L'utilizzo dell'HRM in combinazione con l'elevato potere discriminante degli nuSSR, hanno permesso di caratterizzare e genotipizzare numerose accessioni in breve tempo e con costi contenuti (Distefano *et al.*, 2012). Gli nuSSR si sono mostrati altamente informativi (Figura 4.4), soprattutto in confronto con la loro utilizzazione in elettroforesi capillare (EC). Infatti si sono mostrati altamente riproducibili (0,964) e hanno permesso di discriminare una media di 15,125 aplotipi con un massimo di 18 aplotipi discriminati (DCA9) e un minimo di 10 aplotipi (GAPU59). La frequenza allelica, infatti, in correlazione all'alto potere discriminante si è attestata a valori medi di 0,274; il PIC si è invece attestato con un minimo di 0,770 (UDO99-024) e un massimo di 0,892 (UDO99-008) (Tabella 4.9 – 4.10).

Dall'analisi HRM sono stati individuati per ogni locus uno o più aplotipi differenti in base allo studio delle curve di denaturazione. Le curve normalizzate per fluorescenza sono state discriminate, in base alla forma e alla T_m , assegnando per ciascuna curva differente un valore, da questo è stata costruita una matrice di dissimilarità (Tabella 4.11) delle 62 accessioni analizzate. I risultati derivati dai primer citoplasmatici e nucleari (SCAR derivati e nuSSR) sono stati combinati insieme per la costituzione di un dendrogramma Neighbor-joining (Figura 4.5). Dall'analisi del dendrogramma si evince una variabilità diffusa, dove le cultivar siciliane sono state raggruppate in maniera, alquanto, precisa. Infatti, si possono riscontrare tre differenti cluster: A, B, C. Nel Cluster A si sono raggruppate la maggior parte delle accessioni appartenenti alla cultivar popolazione di "Biancolilla" e "Nocellara Etnea", All'interno di questo cluster sono state distinte due diversi raggruppamenti di Biancolilla: uno molto omogeneo dove i diversi cloni hanno mostrato vicinanza genetica a Biancolilla (2), un altro simile a Buscionetto (sin. Biancolilla di Caltabellotta). Sempre nello stesso cluster sono state raggruppate la gran parte delle accessioni di Nocellara Etnea o simili (vedi Zaituna e Marmorina), ad

eccezioni delle accessioni PVI, dove invece si è raggruppata nel cluster C insieme a P23 (2) e Biancolilla nana (1064); queste accessioni già in fase di campionamento presentavano caratteristiche morfologiche dissimili nel confronto delle altre accessioni. Questa diversità morfologica fin da subito ci ha indotto a pensare a un'erronea attribuzione o di etichettatura all'interno del Campo di Germoplasma o a delle possibili omonimie. Il problema delle omonimie è, sicuramente, quello più importante quando si affrontano studi su una *Core Collection*, specialmente su accessioni reperite in diversi territori, infatti, possono essere indicate talvolta con lo stesso nome, rappresentando, però, accessioni diverse. Caso diverso è quello dell'accessione Romana, infatti, benché dalle indicazioni del Campo di Germoplasma di Olivo di Zagaria, dove era stata indicata come appartenente alla cultivar popolazione di Biancolilla, la stessa ha mostrato caratteristiche e profili genici unici tanto da poter supporre di essere un'entità genetica assestante.

Nel cluster B, si sono raggruppate delle cultivar siciliane geneticamente molto simili tra di loro. Le accessioni appartenenti alla cultivar popolazione di Tonda Iblea si sono distribuite uniformemente tra di loro. Essendo un gruppo di accessioni che presenta una limitata ma diffusa variabilità interna, non si può escludere la presenza di altri genotipi nei diversi distretti olivicoli. Sempre in questo cluster si sono raggruppate un gruppo di accessioni molto simile tra di loro, come Ogliarola messinese e i suoi sinonimi (vedi Capitolo 2), dove sono state tutte discriminate. Infine, nel cluster C sono state raggruppate la maggior parte della accessioni straniere ed altre di confronto alla analisi, dimostrando la validità dell'utilizzazione dell'HMR nell'identificazione varietale (Xanthopoulou *et al.*, 2014). I risultati hanno confermato la presenza di alcune omonimie e sinonimie per le cultivar siciliane (Bottari e Spina, 1952; La Mantia *et al.*, 2005; Marra *et al.*, 2013; Las Casas *et al.*, 2014). In particolare, "Marmorina" è considerata come sinonimo di "Nocellara Etnea", in riferimento alla compattezza della polpa, dagli *antichi paragonata al marmo*; diversamente i cloni "Verdese" e "Zaituna" hanno mostrato una stretta vicinanza a "Nocellara Etnea" pur essendo considerate da alcuni autori cultivar distinte da "Nocellara Etnea" (Bottari e Spina, 1952).

Tabella 4.6 Comparazione di alleli e informazioni genotipiche dei primer cloroplastici utilizzati.

Primer	Maggiore Frequenza Allelica	Numero di Osservazioni	Numero di alleli	Riproducibilità	Diversità Genetica	PIC
cp olea L51	0,967	61	2	0,984	0,063	0,061
cp olea L27	1,000	62,	1	1,000	0,000	0,000
cp olea L38	0,820	61	2	0,984	0,296	0,252
cp olea L46	0,742	62	2	1,000	0,383	0,310
cp olea L57	0,607	61	2	0,984	0,477	0,363
cp olea L11	0,919	62	3	1,000	0,151	0,146
Media	0,842	61,50	2,00	0,992	0,228	0,189

Tabella 4.7 Confronto tra peso molecolare discriminato da in EC (numero) e aplotipo verificato con HRM (lettera)

Accession		Peso Molecolare (bp)		Peso Molecolare (bp)		Peso Molecolare (bp)		Peso Molecolare (bp)		Peso Molecolare (bp)		
		Locus 51	107	Locus 27	104	Locus 38	109	Locus 46	224	Locus 57	103	Locus 11
Arbequina	125	A	107	A	104	A	109	B	224	B	103	C
Hojiblanca	125	A	107	A	104	B	109	B	224	B	103	C
Galega Vulgar	124	A	107	A	104	A	109	B	224	B	103	C
Gordal	124	A	107	A	104	A	109	B	224	B	103	C
Blanqueta	124	A	107	A	104	A	109	B	224	B	103	C
Villalonga	124	A	107	A	104	A	109	B	224	B	103	C
Lechín de Sevilla	117	B	107	A	105	A	108	A	221	A	114	A
Acebuchina	117	B	107	A	105	A	108	A	221	A	114	A
Farga Milenaria	125	A	108	A	105	A	109	B	222	A	112	B
Farga Canetera	125	A	108	A	105	A	109	B	222	A	112	B

Tabella 4.8 Comparazione di alleli e informazioni genotipiche dei primer nucleari SCAR-derivati utilizzati.

Primer	Maggiore Frequenza Allelica	Numero di Osservazioni	Numero di alleli	Riproducibilità	Diversità Genetica	PIC
Q2	0,317	60	4	0,968	0,739	0,691
Q3	1,000	4	1	0,065	0,000	0,000
Q4	0,909	55	4	0,887	0,171	0,166
Q6	0,760	25	4	0,403	0,400	0,374
Q7	0,797	59	3	0,952	0,344	0,317
Q8	1,000	60	1	0,968	0,000	0,000
Media	0,797	43,83	2,83	0,707	0,276	0,258

Tabella 4.9 Comparazione di alleli e informazioni genotipiche dei primer nucleari nuSSR utilizzati.

Primer	Maggiore Frequenza Allelica	Numero di Osservazioni	Numero di alleli	Riproducibilità	Diversità Genetica	PIC
ssrOeUA-DCA3	0,172	58	16	0,935	0,896	0,887
ssrOeUA-DCA9	0,213	61	18	0,984	0,887	0,877
ssrOeUA-DCA16	0,424	59	15	0,952	0,787	0,773
GAPU59	0,393	61	10	0,984	0,785	0,764
GAPU101	0,230	61	15	0,984	0,883	0,873
UDO99-008	0,172	58	17	0,935	0,900	0,892
UDO99-012	0,230	61	17	0,984	0,871	0,860
UDO99-024	0,356	59	13	0,952	0,793	0,770
Media	0,274	59,75	15,13	0,964	0,850	0,837

Tabella 4.10 Comparazione di alleli e informazioni genotipiche dei primer cloroplastici e nucleari utilizzati.

Primer	Maggiore Frequenza Allelica	Numero di Osservazioni	Numero di alleli	Riproducibilità	Diversità Genetica	PIC
cp olea L51	0,967	61	2	0,984	0,063	0,061
cp olea L27	1,000	62	1	1,000	0,000	0,000
cp olea L38	0,820	61	2	0,984	0,296	0,252
cp olea L46	0,742	62	2	1,000	0,383	0,310
cp olea L57	0,607	61	2	0,984	0,477	0,363
cp olea L11	0,919	62	3	1,000	0,151	0,146
Q2	0,317	60	4	0,968	0,739	0,691
Q3	1,000	4	1	0,065	0,000	0,000
Q4	0,909	55	4	0,887	0,171	0,166
Q6	0,760	25	4	0,403	0,400	0,374
Q7	0,797	59	3	0,952	0,344	0,317
Q8	1,000	60	1	0,968	0,000	0,000
ssrOeUA-DCA3	0,172	58	16	0,935	0,896	0,887
ssrOeUA-DCA9	0,213	61	18	0,984	0,887	0,877
ssrOeUA-DCA16	0,424	59	15	0,952	0,787	0,773
GAPU59	0,393	61	10	0,984	0,785	0,764
GAPU101	0,230	61	15	0,984	0,883	0,873
UDO99-008	0,172	58	17	0,935	0,900	0,892
UDO99-012	0,230	61	17	0,984	0,871	0,860
UDO99-024	0,356	59	13	0,952	0,793	0,770
Mean	0,601	55,81	7,24	0,900	0,469	0,448

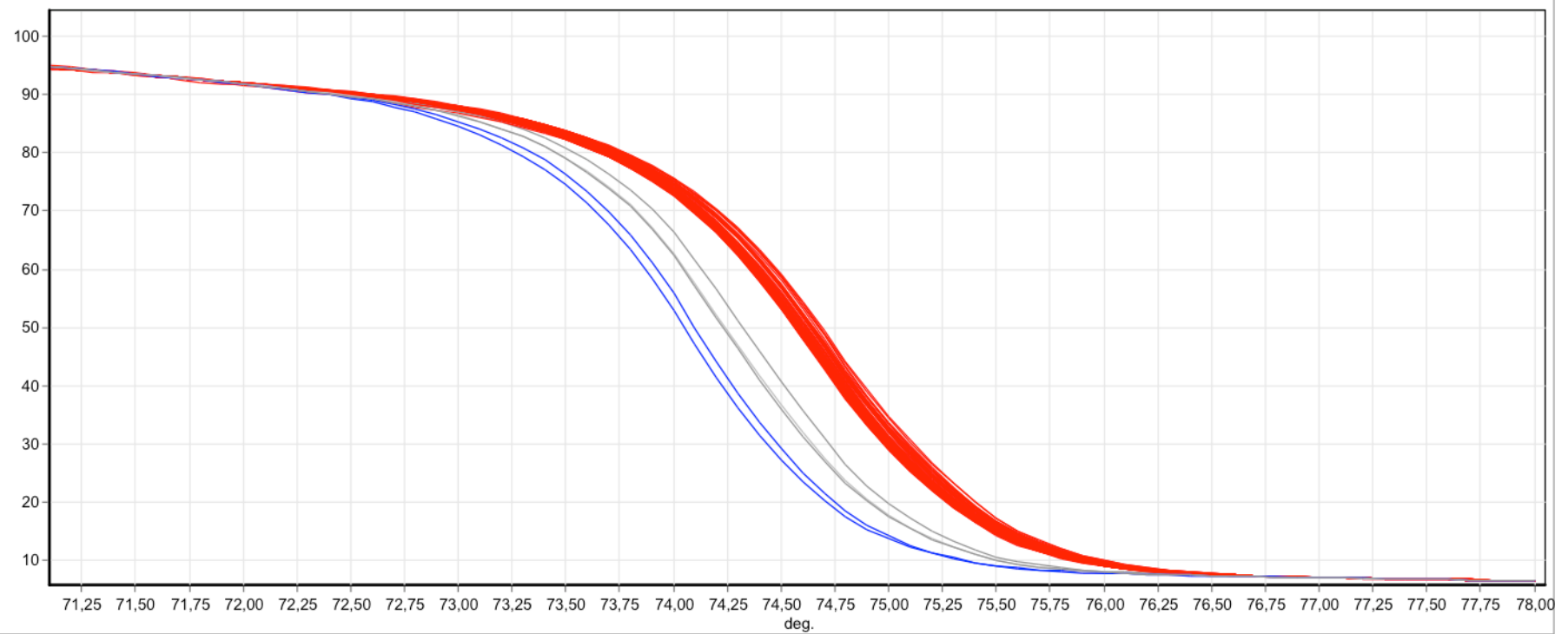


Figura 4.1. profilo HRM di 62 genotipi di *Olea europaea* analizzati con il primerpladiale L11, Aplotipo A (blu), Aplotipo B (grigio) e Aplotipo C (rosso).

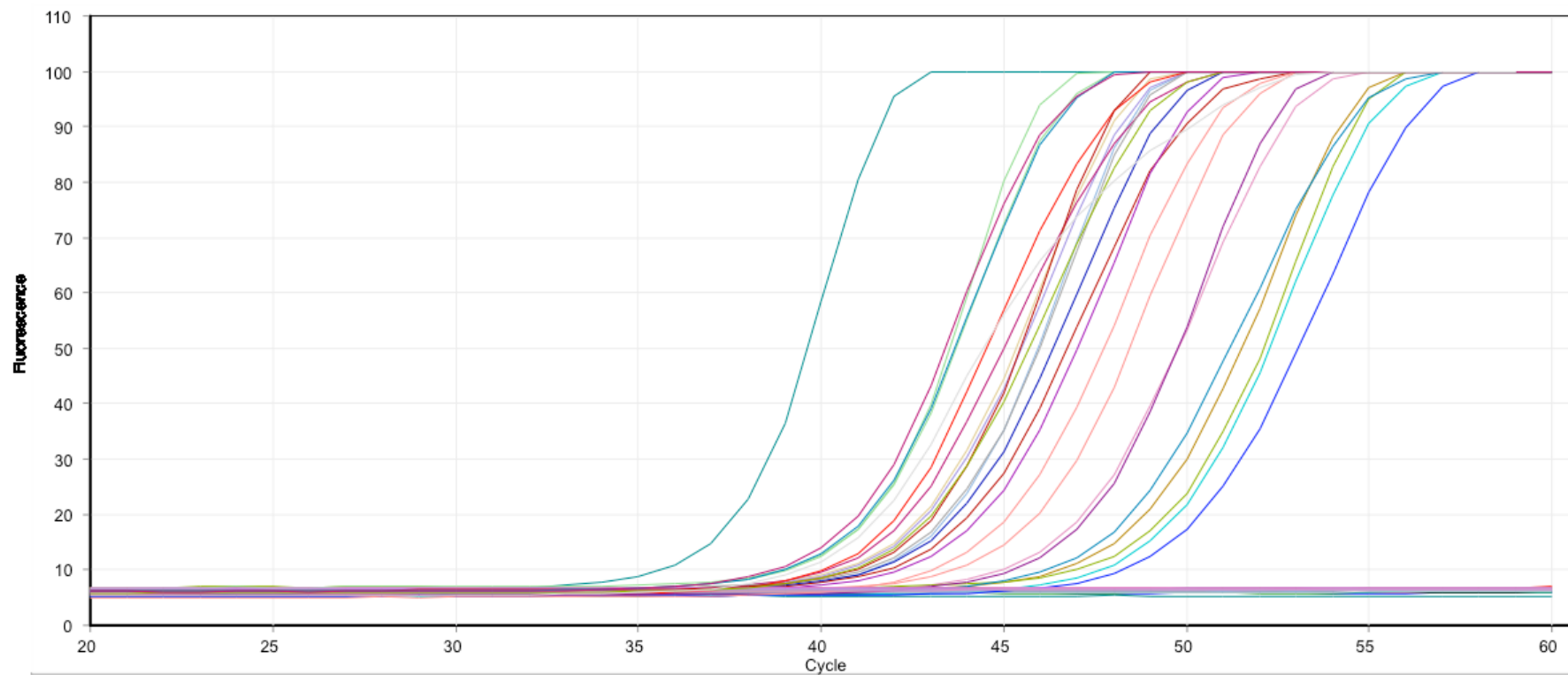


Figura 4.2. Curve di amplificazione di 62 accessioni di olivo, nelle quali si è osservata la presenza di solo 29 accessioni amplificate e di 31 accessioni con alleli nulli.

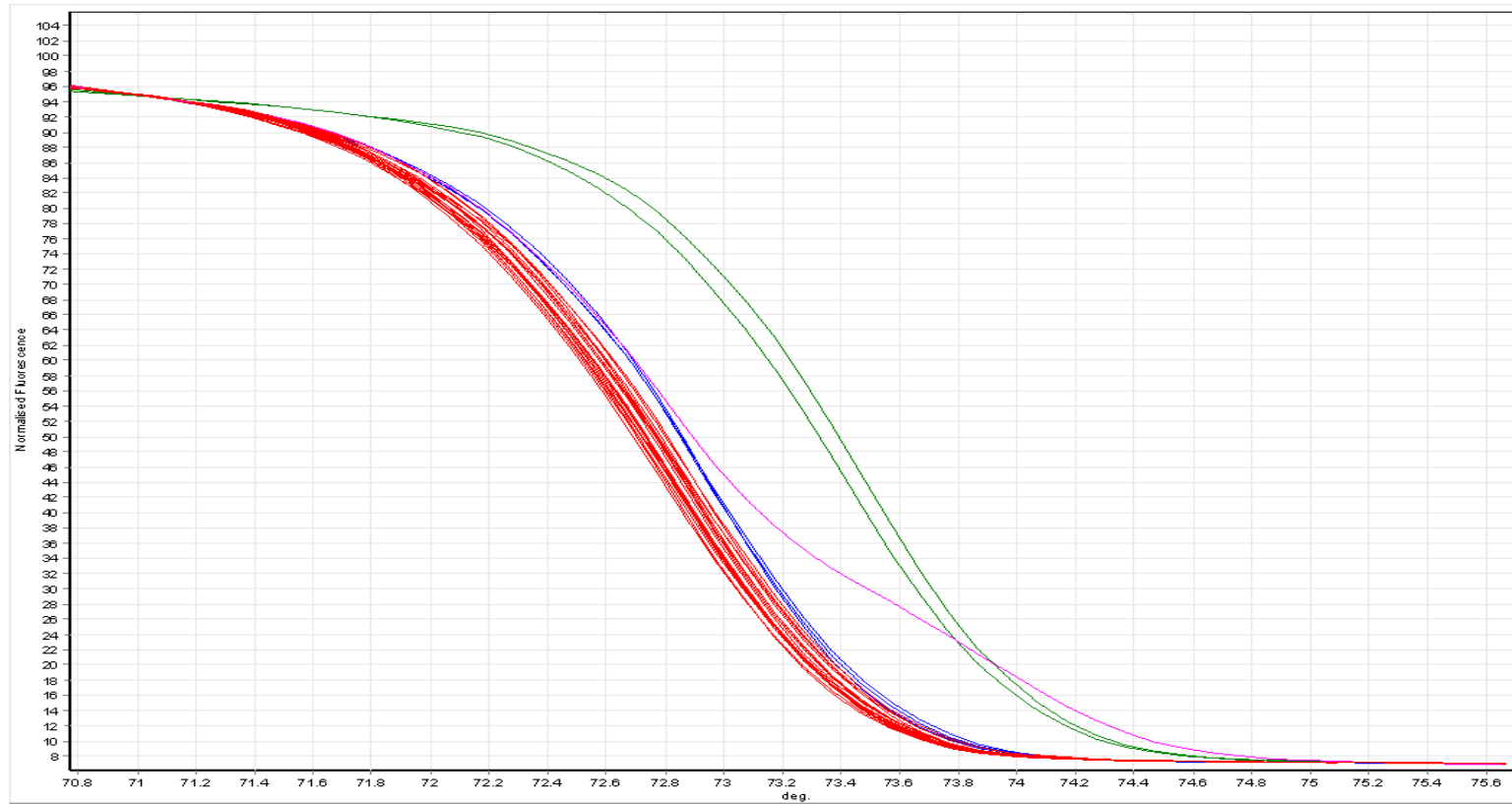


Figura 4.3 Profilo HRM di accessioni di *Olea europaea* amplificate con il marcatore Q6. La curva HRM, normalizzata, mostra la presenza 4 genotipi indicati con colori diversi

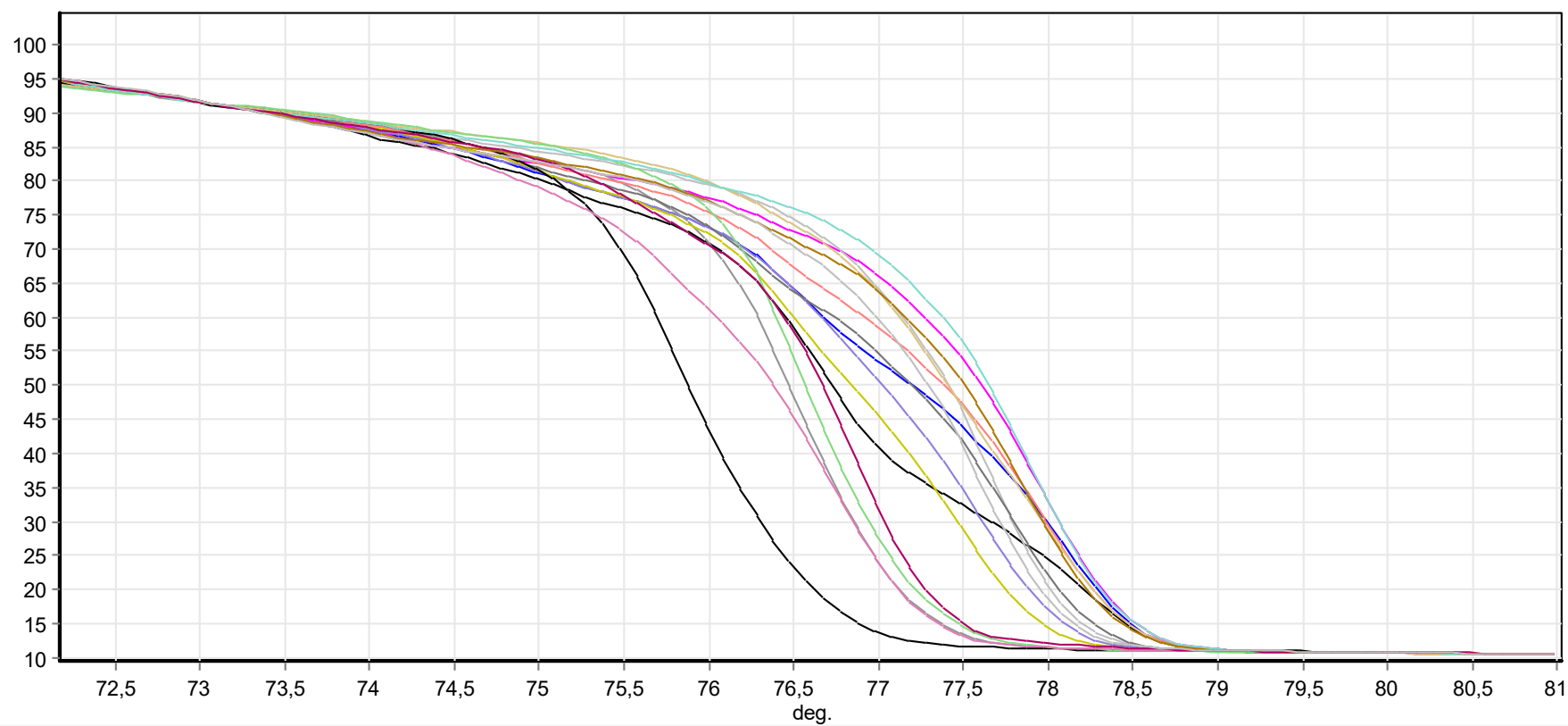


Figura 4.4. Profilo HRM di accessioni di *Olea europaea* che mostrano, per marcatore nu(SSR) UDO99-012, le curve di *melting* si sono differenziate, mostrando la presenza di genotipi diversi.

Tabella 4.11 Genotipi caratterizzati mediante la combinazione di marcatori molecolari plastidiali e nucleari di cultivar di olivo italiane e straniere

Id	cp olea L51	cp olea L27	cp olea L38	cp olea L46	cp olea L57	cp olea L11	Q 2	Q 3	Q 4	Q 6	Q 7	Q 8	ssrOeUA- DCA3	ssrOeUA- DCA9	ssrOeUA- DCA16	GAP U59	GAPU 101	UDO99 -008	UDO99 -012	UDO99 -024
PIII (Biancolilla)	A	A	B	B	B	C	A	?	A	?	C	A	I	K	N	H	D	J	Q	G
P5 (Biancolilla)	A	A	B	B	A	C	A	?	A	?	C	A	C	K	N	B	D	J	Q	E
P13 (Biancolilla)	A	A	A	B	B	C	A	?	B	?	C	A	I	J	N	H	D	J	B	E
P23 (1) (Biancolilla)	A	A	B	B	A	C	A	?	A	?	C	A	I	K	N	H	D	J	Q	G
P25 (Biancolilla)	A	A	B	B	B	C	A	?	A	?	C	A	I	K	N	H	A	D	Q	G
XIII-80 (Biancolilla)	A	A	A	B	A	C	A	?	?	?	C	A	I	K	N	H	D	J	B	E
XXV-91 (Biancolilla)	A	A	A	B	B	C	A	?	D	?	?	A	I	K	N	H	D	J	Q	E
Romana (Biancolilla)	A	A	A	B	B	C	C	?	D	C	C	A	P	J	A	H	Q	A	Q	A
Biancolilla nana (992)	A	A	A	B	B	C	B	?	A	?	C	A	K	N	H	H	L	N	Q	J
Biancolilla nana (1064)	A	A	A	B	B	C	A	?	A	?	C	A	M	D	H	D	J	B	C	B
Buscionetto	A	A	A	B	?	C	B	?	A	?	C	A	N	R	H	E	L	N	A	J
Nocellara Etnea (1)	A	A	B	B	B	C	B	?	?	D	C	?	L	O	C	H	Q	E	Q	E
P08 (Nocellara Etnea)	A	A	B	A	B	C	D	?	A	C	C	A	L	O	J	H	L	J	B	E
P07 (Nocellara Etnea)	A	A	A	B	A	C	D	?	A	C	C	A	L	O	C	H	L	E	P	E
PVI (Nocellara Etnea)	A	A	A	B	B	C	D	?	C	?	C	A	?	C	?	D	J	B	C	C
Marmorina (1)	A	A	A	B	B	C	C	?	A	C	C	A	L	J	N	G	F	K	M	J
Zaituna (1)	A	A	A	B	A	C	C	?	A	C	C	A	?	J	C	F	F	J	D	E
Biancolilla nana (962)	A	A	A	B	A	C	C	?	A	?	C	A	K	N	H	H	Q	N	Q	J

TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DELLE PRINCIPALI VARIETÀ DI OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) ED OLI EXTRAVERGINE DI OLIVA SICILIANI

Id	cp olea L51	cp olea L27	cp olea L38	cp olea L46	cp olea L57	cp olea L11	Q 2	Q 3	Q 4	Q 6	Q 7	Q 8	ssrOeUA- DCA3	ssrOeUA- DCA9	ssrOeUA- DCA16	GAP U59	GAPU 101	UDO99 -008	UDO99 -012	UDO99 -024
Tonda Iblea (1)	A	A	A	B	A	C	C	?	C	C	C	A	O	R	N	F	F	?	D	J
P37 (Sconosciuta)	A	A	A	B	A	C	C	?	A	C	B	A	O	L	K	H	P	P	H	J
P35 (Sconosciuta)	?	A	B	B	B	C	C	?	A	C	C	A	D	J	N	F	F	F	M	J
P23 (2) (Biancolilla)	A	A	A	B	A	C	B	?	A	A	C	A	M	D	H	D	J	C	R	B
Moresca (1)	A	A	A	B	A	C	C	?	A	?	C	A	I	R	N	F	F	J	M	J
PII (Tonda Iblea)	A	A	A	B	A	C	C	?	A	?	C	A	M	J	N	F	F	K	M	J
PVII (1) (Tonda Iblea)	A	A	A	B	A	C	C	?	A	C	C	A	D	J	N	F	F	F	M	J
PVII (2) (Tonda Iblea)	A	A	B	B	B	C	C	?	A	C	C	A	D	J	N	F	F	E	M	J
P20 (Tonda Iblea)	A	A	A	B	A	C	D	?	A	C	C	A	L	J	N	F	F	K	M	I
P36 (Sconosciuta)	A	A	A	B	B	C	C	?	A	?	C	A	O	L	D	D	L	B	B	?
Biacollilla (2)	A	A	B	B	B	C	A	?	A	?	C	A	I	K	N	H	D	J	N	E
Cerasuola	A	A	A	B	A	B	D	?	A	A	C	A	H	M	P	J	E	O	I	H
Giarfara	A	A	A	B	B	C	A	?	?	?	C	A	M	J	M	C	N	M	P	K
Manzanilla	A	A	A	A	B	C	?	?	?	?	?	A	?	L	L	H	M	Q	L	E
Marmorina (2)	A	A	A	B	A	C	D	?	?	C	C	A	M	O	J	H	Q	E	P	E
Moresca (2)	A	A	A	B	B	C	B	?	A	?	C	A	O	S	N	G	K	F	M	I
Nocellara del Belice	A	A	A	B	B	C	A	?	A	D	C	A	L	J	N	H	N	L	Q	J
Nocellara Etnea (2)	A	A	A	B	B	C	B	?	A	D	A	A	L	O	J	H	Q	F	Q	E
Ogliarola messinese	A	A	A	A	B	C	A	?	A	?	C	A	O	R	N	G	F	K	M	J
Passalunara	A	A	A	B	B	C	?	?	?	?	C	?	P	R	N	G	K	K	M	J
Tonda Iblea (2)	A	A	A	B	B	C	D	?	A	C	C	A	L	J	N	G	F	G	M	J
Zaituna (2)	A	A	A	B	B	C	B	?	A	C	C	A	L	O	C	H	Q	F	Q	E

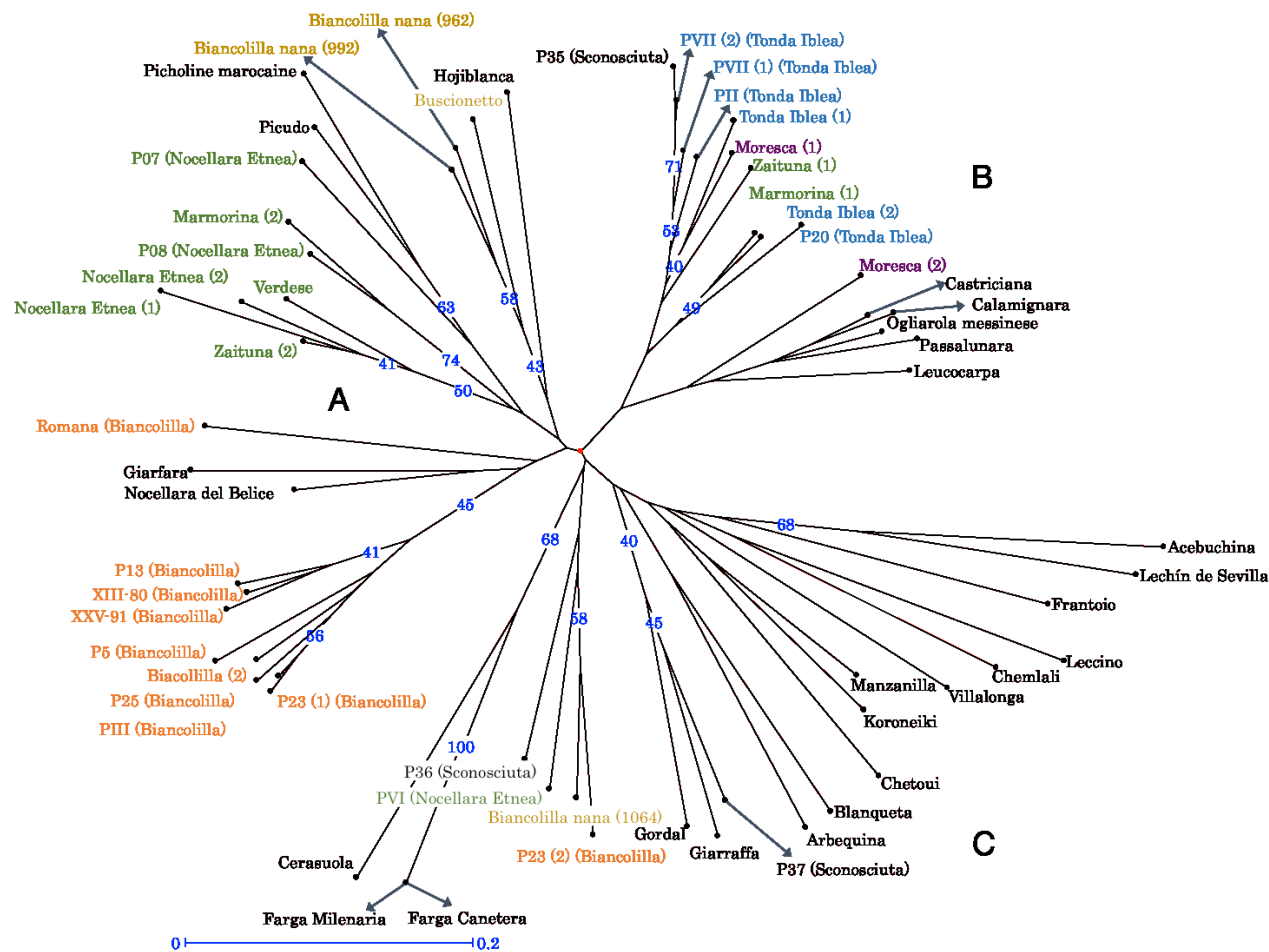
CAPITOLO 4 - CARATTERIZZAZIONE GENETICO MOLECOLARE DI GERMOPLASMA OLIVICOLO SICILIANO

Id	cp olea L51	cp olea L27	cp olea L38	cp olea L46	cp olea L57	cp olea L11	Q 2	Q 3	Q 4	Q 6	Q 7	Q 8	ssrOeUA- DCA3	ssrOeUA- DCA9	ssrOeUA- DCA16	GAP U59	GAPU 101	UDO99 -008	UDO99 -012	UDO99 -024
Calamignara	A	A	A	B	A	C	A	?	A	?	C	A	P	R	N	G	F	K	M	I
Castriciana	A	A	A	B	A	C	A	?	A	?	C	A	O	R	N	G	F	K	M	J
Chemlali	A	A	A	A	A	C	D	A	A	?	A	A	H	O	G	A	G	H	K	J
Chetoui	A	A	A	A	B	C	A	?	A	?	?	A	G	N	H	J	H	L	R	M
Frantoio	A	A	A	A	A	C	B	?	A	?	B	A	J	P	L	G	K	E	S	H
Giarraffa	A	A	A	A	B	C	D	?	A	C	B	A	P	L	K	H	P	P	H	I
Koroneiki	A	A	A	A	B	C	D	?	A	?	B	A	J	F	L	H	H	?	R	L
Leccino	A	A	A	A	A	C	D	A	A	?	B	A	P	L	N	J	J	H	Q	I
Leucocarpa	A	A	A	A	B	C	A	?	A	?	C	A	P	R	N	F	F	F	M	I
Picholine marocaine	A	A	B	A	B	C	A	?	A	?	C	A	K	T	O	I	L	R	L	G
Picudo	A	A	?	A	B	C	D	?	A	?	C	A	O	Q	O	I	L	Q	L	E
Verdese	A	A	A	A	B	C	B	?	A	B	C	A	L	O	C	H	Q	?	Q	G
Arbequina	A	A	A	B	B	C	B	A	A	?	A	A	B	A	G	A	H	L	F	F
Hojiblanca	A	A	B	B	B	C	B	?	A	C	C	A	N	G	L	H	J	R	L	J
Galega Vulgar	A	A	A	B	B	C	D	?	A	?	C	A	?	?	?	?	?	?	?	?
Gordal	A	A	A	B	B	C	D	?	A	C	A	A	O	H	K	E	P	P	I	J
Blanqueta	A	A	A	B	B	C	A	A	A	?	A	A	A	F	E	A	D	F	K	L
Villalonga	A	A	A	A	B	C	D	?	A	?	B	A	E	J	B	G	B	K	C	J
Lechin de Sevilla	B	A	A	A	A	A	B	?	?	C	C	A	I	L	F	H	H	Q	E	J
Acebuchina	B	A	A	A	A	A	A	?	A	C	B	A	J	B	?	E	C	D	E	?
Farga Milenaria	A	A	A	B	A	B	D	?	A	?	C	A	F	D	A	I	B	K	G	D
Farga Canetera	A	A	A	B	A	B	D	?	A	?	C	A	F	D	A	I	B	K	G	D

Tabella 4.12 Confronto tra aplotipi discriminati in HRM e il confronto con il profilo allelico verificato in EC di alcune accessioni di olivo delle 62 caratterizzate.

Cultivar	ssrOeUA-DCA3		ssrOeUA-DCA9		ssrOeUA-DCA16		GAPU59		GAPU101		UDO99-008	UDO99-012	UDO99-024			
Biacollilla (2)	I	257/261	K	181/203	N	167/196	H	231/231	D	207/234	J	179/184	N	176/186	E	186/205
Calamignara	P	257/267	R	203/211	N	167/196	G	227/231	F	207/217	K	179/184	M	176/184	I	205/205
Castriciana	O	257/267	R	203/213	N	167/192	G	227/231	F	207/217	K	179/184	M	176/184	J	205/205
Giarfara	M	257/263	J	181/190	M	167/192	C	231/231	N	217/223	M	182/182	P	176/186	K	205/205
Marmorina (2)	M	257/263	O	190/211	J	142/167	H	231/231	Q	223/234	E	174/184	P	176/186	E	186/205
Moresca (2)	O	259/263	S	203/211	N	167/192	G	227/231	K	207/217	F	174/184	M	176/184	I	205/205
Nocellara del Belice	L	257/263	J	181/190	N	167/192	H	231/231	N	217/223	L	182/184	Q	176/186	J	205/205
Nocellara Etnea (2)	L	257/263	O	190/211	J	142/167	H	231/231	Q	223/234	F	174/184	Q	176/186	E	186/205
Ogliarola messinese	O	257/267	R	203/211	N	167/196	G	227/231	F	207/217	K	179/184	M	176/184	J	205/205
Passalunara	P	257/267	R	203/211	N	167/192	G	227/231	K	207/217	K	179/184	M	176/184	J	205/205
Tonda Iblea (2)	L	257/263	J	181/190	N	167/192	G	227/231	F	207/217	G	174/184	M	176/184	J	205/205
Verdese	L	257/263	O	190/211	C	142/167	H	231/231	Q	223/234	?	174/184	Q	176/186	G	186/205
Zaituna (2)	L	257/263	O	190/211	C	142/167	H	231/231	Q	223/234	F	174/184	Q	176/186	E	186/205

Figura 4.5. Dendrogramma Neighbor-joining delle 62 accessioni di *Olea europaea* ottenuto mediante la combinazione di primer plastidiali e nucleari.



4.5. Conclusioni

Il lavoro è stato incentrato sulla caratterizzazione molecolare attraverso lo studio delle curve di denaturazione in HRM di 62 accessioni di *Olea europaea* L. con l'utilizzo di primer plastidiali e nucleari. Le 62 accessioni prese in considerazione comprendono le principali varietà siciliane, alcune cultivar d'interesse italiane e straniere, nonché alcuni presunti cloni delle cultivar "Biancolilla", "Nocellara Etnea" e "Tonda Iblea", considerate cultivar popolazione. La tecnica HRM ha permesso di discriminare le principali cultivar analizzate e quelle accessioni considerate cloni di alcune delle più importanti cultivar popolazioni del germoplasma siciliano con specifico riferimento a quelle diffuse nella Sicilia orientale, aprendo interessanti prospettive per quanto riguarda possibili applicazioni dei risultati per programmi di selezione clonale.

Nel complesso, lo studio della variabilità del germoplasma siciliano, realizzato tramite HRM, rappresenta, sia per la metodologia applicata sia per la tipologia di marcatori analizzati, il primo studio condotto con particolare attenzione alla composizione policlonale di alcune tra le più importanti cultivar siciliane, consentendo di aggiungere informazioni utili per la definizione della struttura genetica della specie in Sicilia e per l'identificazione varietale.

4.6. Bibliografia

- Angiolillo A., Mencuccini M. and Baldoni L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *TAGTheoretical and Applied Genetics* 98: 411-421.
- Angiolillo A., Mencuccini M. and Baldoni L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *TAGTheoretical and Applied Genetics* 98: 411-421.
- Arthofer W, Steiner FM, Schlick-Steiner BC (2011) Rapid and cost-effective screening of newly identified micro satellite loci by high resolution melting analysis. *Mol Genet Genomics* 286: 225–235.
- Baldoni L., Cultrera N.G., Mariotti R., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin G.G., Buonamici A., Porceddu A., Sarri V., Ojeda M.A., Trujillo I., Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimonti A., Muzzalupo I., Casagrande A., Lain O., Messina R., Testolin R. (2009) A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Molecular Breeding* 24(3) 213-231.
- Barkley N.A., Roose M.L., Krueger R.R., Federici C.T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 112 (8), pp. 1519-1531
- Belaj A., Munoz-Diez C., Baldoni L., Porceddu A., Barranco D. and , Satovic Z. (2007). Genetic diversity and population structure of wild olives from the North-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann Bot* 100:449-458.
- Belaj A., Munoz-Diez C., Baldoni L., Porceddu A., Barranco D. and , Satovic Z. (2007). Genetic diversity and population structure of wild olives from the North-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann Bot* 100:449-458.
- Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., et al. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics* , 107 (4), 736-744.
- Besnard G., Hernández P., Khadari B., Dorado G. and Savolainen A. (2011). Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology* 11:80.
- Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B., & B. A. (2001b). Cultivar identification in the olive *Olea europaea* L. based on RAPDs. *J Am Hort Sci* , 126, 668–675.
- Bottari V and Spina P. (1952). Le varietà di olivo cultivate in Sicilia. *Annuario Sper. Agric.* 7: 937-1004.
- Breton C, Pinatel C, Medail F and Bonhomme F (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. *Plant. Sci.* 175: 524-532.
- Breton C., Tersac M. and Bervillè A. (2006). Olive and oleaster (*Olea europaea*) in the Mediterranean. *Journal of Biogeography*. 33: 1916-1928.
- Busconi M., Sebastiani L. and , Fogher C. (2006). Development of SCAR markers for germplasm characyerisation in olive tree. *Mol Breed* 17:59-68.
- Caruso, T., Cartabellotta, D., and Motisi, A. (2007). Cultivar di Olivo Siciliane. Identificazione, validazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e qualità degli oli. Regione Siciliana Assessorato Agricoltura e Foreste - Dipartimento Colture Arboree Università degli Studi di Palermo.
- Chagne D, Gasic K, Crowhurst RN, Han Y, Bassett HC, et al. (2008). Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics* 92: 353–358.
- Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., & Cimato, A. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within

- ancient cultivars. *Theor Appl Genet*, 104, 223-228.
- Dangl G.S., Mendum M.L., Prins B.H., Walker M.A., Meredith C.P. and Simon, C.J. (2001). Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: A tool for managing a grape germplasm collection. *Genome*, 44 (3), pp. 432-438
- De La Rosa R, James CM and Tobutt KR (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Mol. Ecol. Notes* 2: 265-267.
- Diaz, A.; Martin, A.; Rallo, P.; Barranco, D. & De la Rosa, R. (2006). Self-incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' olive assessed by SSR markers, *J Am Soc Hortic Sci*. Vol.131, pp. 250–255
- Distefano G., Caruso M., La Malfa S., Gentile A., Wu S-B. (2012) High Resolution Melting Analysis is a more sensitive and effective alternative to gel-base platforms in analysis of SSR – An example in Citrus. *Plos One* 7:(8) e44202. Doi:10.1371/journal.pone.0044202
- Erre, P., Chessa, I., Munoz-Diez, C., Belaj, A., Rallo, L., & Trujillo, I. (2010). Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR marker. *Genet Resour Crop Evol*, 57, 41-54.
- Fabbri A., Hormazy J.J. and Polito V.S. (1995). Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*O. europaea* L.) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 538-542.
- Ganino T, Beghè D, Valenti S, Nisi R, Fabbri A (2007). RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region, Northern Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54(7): 1531-1540.
- Ganopoulos I, Argiriou A, Tsaftaris A (2011) Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control* 22: 532–541.
- Gemas VJV, Almadanim MC, Tenreiro R, Martins A, Fevereiro P (2004). Genetic diversity in the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 51:501-511.
- Gomes, S., Martins-Lopes, P., Lopes, J., & Guedes-Pinto, H. (2009). Assessing Genetic Diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers. *Plant Mol Biol Rep*, 27, 365-373.
- Gundry C.N., Dobrowolski S.F., Martin Y.R., Robbins T.C., Nay L.M., Boyd N., Coyne T., Wall M.D., Wittwer C.T. and Teng D.H. (2008). Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Res* 36:3401–3408.
- Hakim, I. R., Kammoun, N. G., Makhloufi, E., & Rebai, A. (2010). Discovery and Potential of SNP Markers in Characterization of Tunisian Olive Germplasm. *Diversity* (2), 17-27.
- Hernández P., De La Rosa R., Rallo L., Dorado G. Martin A. (2001). Development of SCAR makers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: application in olive germoplasm evaluation and mapping. *Theor Appl Genet* 103:1417-1426.
- Herrmann M.G., Durtschi J.D., Wittwer C.T. and Voelkerding K.V. (2007). Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 53:1544–1548.
- La Mantia, M., Lain, O., Caruso, T., and Testolin, R. (2005). SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80 (5), 628-632.
- Las Casas G., Scollo F., Distefano G., Continella A., Gentile A., La Malfa S. (2014) Molecular characterization of olive (*Olea europaea* L.) Sicilian cultivars using SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 57, 15-19.
- Lehmensiek A, Sutherland M, McNamara R (2008) The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to

- a covered smut resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 117: 721–728.
- Liu K. and Muse S.V. (2005). Power marker: integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21:2128-2129.
- Mackay JF, Wright CD, Bonfiglioli RG (2008) A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods* 4: 8.
- Mader E, Lukas B, Novak J (2008) A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC Genet* 9: 69.
- Marra F.P., Caruso T., Costa F., Di Vaio C., Mafra R., Marchese A., (2013). Genetic relationship, structure and parentage simulation among the olive tree (*O. europaea* L.) cultivated in Southern Italy revealed by SSR markers. *Tree Genet Genomes* 9: 961-973.
- Mookerjee S., Guerin S., Collins G., Ford C. and Sedgley M. (2005). Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. *Theor Appl Genet* 111:1174-1182.
- Muleo R., Colao M.C., Miano D., Cirilli M., Intriери M.C., Baldoni L. and Rugini E. (2009). Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome*, 52 (3), pp. 252-260.
- Muleo, R., Colao, M.C., Miano, D., Cirilli, M., Intriери, M.C., Baldoni, L., & Rugini, E. (2009). Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm, *Genome* 52: 252-260
- Muleo, R., Colao, M.C., Miano, D., Cirilli, M., Intriери, M.C., Baldoni, L., & Rugini, E. (2009). Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm, *Genome* 52: 252-260
- Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Salimonti, A., Falabella, R., & Perri, E. (2009). Microsatellite Markers for Identification of a Group of Italian Olive Accessions., *66*, pp. 685-690. Piracicaba, Braz.
- Oliver RE, Lazo GR, Lutz JD, Rubenfield MJ, Tinker NA, et al. (2011) Model SNP development for complex genomes based on hexaploid oat using highthroughput 454 sequencing technology. *BMC Genomics* 12: 77.
- Pérez-Jiménez M., Besnard G., Dorado G. and Hernandez P. (2013). Varietal Tracing of Virgin Olive Oils Based on Plastid DNA Variation Profiling. *PLoS ONE*, 8 (8), art. no. e70507.
- Reale S., Doveri S., Diaz A., Angiolillo A., Lucentini L., Pilla F., Martìn A., Domini P. and Lee D. (2006). SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* 49:1193-1205.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sarri V., Baldoni L., Porceddu A., Cultrera N.G.M., Contento A., Frediani M., Belaj A., Trujillo T. and Conini P.G. (2006). Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome* 49:1606-1615.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendonica, D., Rodrigues Dos Santos, M., Laimer Da Camara Machado, M., and Da Camara Machado, A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9 : 1171–1173. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.00954, x. PMID:10964237.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- White HE, Hall VJ, Cross NCP (2007) Methylation-sensitive high resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clin Chem* 53: 1960–1962.
- Wittwer C.T. (2009). High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations, 2009. *Human Mutation*, 30 (6), pp. 857-859.

Wu S-B, Tavassolian I, Rabiei G, Hunt P, Wirthensohn M, et al. (2009) Mapping SNP-anchored genes using high-resolution melting analysis in almond. *Mol Genet Genomics* 282: 273–281.

Wu, Y., Chen, Y., Ge, Y., Wang, J., Xu, B., Huang, W., & Yuan, F. (2008). Detection of olive oil using the EvaGreen real-time PCR method. *European Food Research and Technology*, 227, 1117-1124.

Xanthopoulou A, Ganopoulos I, Koubouris G, Tsaftaris A, Sergen-dani C, Kalivas A, Madesis P (2014) Microsatellite high-resolution melting (SSR-HRM) analysis for genotyping and molecular characterization of an *Olea europaea* germplasm collection. *Plant Genet Resour* 12:273–277

CAPITOLO 5

QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA DI DNA ESTRATTO DA OLIO DI OLIVA MEDIANTE DDPCR (DROPLET DIGITAL PCR): CONFRONTO TRA PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE E METODOLOGIE DI AMPLIFICAZIONE

5.1. ABSTRACT

L'olio di oliva è considerato un prodotto dalle elevate qualità per il suo valore nutrizionale, salutistico e nutraceutico, la possibilità di definirne l'origine e la composizione varietale rappresenta, oggi, un aspetto fondamentale per garantire la tracciabilità del prodotto. Tuttavia l'estrazione del DNA da questa matrice è piuttosto difficile. In questo studio, è stata eseguita con l'aiuto di una analisi in qRT-PCR e ddPCR (digitale droplet - PCR) una quantificazione assoluta di DNA estratto da olio di oliva, isolato con quattro differenti protocolli di estrazione. I risultati ottenuti hanno permesso di ottenere importanti indicazioni sui protocolli di estrazione utilizzati, in particolare quelli basati sul CTAB hanno mostrato le performance migliori su campioni di olio non-filtrato, sebbene i protocolli di estrazione basati sul kit commerciali NucleoSpin hanno, invece, mostrato una maggiore riproducibilità. L'uso combinato delle due metodologie, qRT-PCR e ddPCR (quest'ultima utilizzata per la prima volta su DNA estratto da olio d'oliva), ha permesso di effettuare una quantificazione assoluta dei campioni analizzati. I risultati hanno chiaramente dimostrato l'importanza della scelta del protocollo di estrazione da utilizzare, al fine di poter così ottenere un DNA di qualità e quantità sufficienti da essere impiegato in analisi di caratterizzazione genetica.

5.2. Introduzione

L'olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) è una delle colture arboree economicamente più importanti e diffuse nel bacino del Mediterraneo. Uno degli usi principale dell'olivo consiste nell'utilizzazione dei frutti (drupe) per la produzione di olio. L'olio extravergine di oliva è considerato un alimento di eccellenza per il suo valore nutrizionale e per i numerosi benefici nei confronti della salute (Wahrburg *et al.*, 2002). Per proteggere l'origine geografica e la qualità dell'olio extravergine di oliva, l'Unione Europea ha emanato diversi regolamenti per la classificazione ed etichettatura. In particolare, le certificazioni DOP e IGP sono legate all'applicazione di specifici protocolli di produzione, pertanto affinché un l'olio possa essere certificato come tale i processi di produzione, trasformazione ed imbottigliamento devono ricadere all'interno di una specifica area geografica, e rispettare stringenti standard qualitativi. Finora, le analisi genetiche non state prese in considerazione per la determinazione della composizione varietale di un olio. Tuttavia, la possibilità di definire l'origine, così come la composizione genetica, è stato valutato come un aspetto fondamentale per garantirne la tracciabilità e l'autenticità del prodotto (Marmiroli *et al.*, 2009; Pérez-Jiménez *et al.*, 2013).

L'olio d'oliva è una matrice grassa, in cui il DNA generalmente è poco solubile e difficilmente recuperabile (Hellebrand *et al.*, 1998). Il DNA estratto dall'olio presenta elevati livelli di degradazione, dove la dimensione dei frammenti amplificati non supera le 300 bp (Testolin & Lain, 2005). Pertanto, risulta essere talmente degradato ed altamente difficile da caratterizzare da dover essere trattato e analizzato con particolare cura e attenzione.

Diversi autori hanno dimostrato l'efficienza e l'utilizzazione di specifici protocolli di estrazione al fine di isolare materiale genetico dall'olio di oliva e utilizzare il DNA estratto in analisi di caratterizzazione molecolare (review in Agrimonti *et al.*, 2011 e in Costa *et al.*, 2012). Questi lavori hanno avuto come

obiettivo quello di caratterizzare differenti tipologie di olio mediante l'impiego di diverse tipologie di marcatori molecolari: AFLP (Busconi *et al.*, 2003; Montemurro *et al.*, 2008), SCAR (Pafundo *et al.*, 2007), SSR o microsatelliti (Ben-Ayed *et al.*, 2009; Vietina *et al.*, 2011), SNP (Consolandi *et al.*, 2008) e marcatori plastidiali Pérez-Jiménez *et al.*, 2013).

Nel corso degli ultimi decenni, sono stati implementati e pubblicati vari protocolli per l'estrazione di DNA da olio d'oliva (Busconi *et al.*, 2003; Breton *et al.*, 2004; Consolandi *et al.*, 2008; Giménez *et al.*, 2010; Pérez-Jiménez *et al.*, 2013). Tuttavia, la quantità e la qualità del DNA estratto non sempre risultano soddisfacenti. In molti casi, le analisi di amplificazione e quantificazione attraverso spettrofotometria non sono affidabili. Alcuni agenti inquinanti, come ad esempio residui di polisaccaridi e polifenoli, sono in grado di inibire l'attività della DNA polimerasi (Testolin & Lain, 2005), e alterano le rilevazioni di fluorometria e spettrometria, fornendo valori spesso non veritieri e di dubbia interpretazione. Per queste ragioni, è estremamente importante utilizzare un metodo di estrazione altamente efficace, che possa consentire una sua ulteriore utilizzazione in analisi caratterizzazione molecolare e che possa permettere di effettuare una quantificazione assoluta del campione di DNA. Negli ultimi anni, sono stati sviluppati e messi a punto diversi metodi per l'analisi sia qualitative che quantitative del DNA estratto da olio d'oliva. La maggior parte di questi metodi di quantificazione comprende l'uso della Real-Time PCR (qRT-PCR), che si è dimostrato strumento valido per rilevare e quantificare il DNA estratto da olio di diverse specie vegetali, come olio di oliva (Wu *et al.*, 2008; Ramos-Gómez *et al.*, 2014), di mais (Rønning *et al.*, 2006) e di soia (Bogani *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010). Più recentemente, la droplet digital-PCR (ddPCR) è stata proposta al fine di superare alcuni limiti della qRT-PCR (Hindson *et al.*, 2011). In particolare la ddPCR permette: una misurazione quantitativa digitale in *end-point*, quantificando il numero assoluto delle molecole target di DNA presente in un campione, attraverso l'utilizzo di *limiting dilution* (Sykes *et al.*, 1992); senza la creazione di curve standard di riferimento o l'utilizzo di controlli esterni/interni (Hindson *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012). La ddPCR, definita

anche come PCR di terza generazione, ha già trovato applicazione in diagnostica molecolare soprattutto nel campo medico, dove ha rivelato di essere un metodo valido per quantificare specifiche sequenze di DNA e per individuare la presenza di alleli rari all'interno di una popolazione (Li *et al.*, 2006). Inoltre, la ddPCR ha mostrato una sensibilità maggiore di circa dieci volte rispetto alla qRT-PCR, come riportato in uno studio di quantificazione assoluta di DNA batterico in campioni di suolo (Kim *et al.*, 2014), o per il monitoraggio di geni transgenici in alimenti prodotti con mais OGM (Morisset *et al.*, 2013).

Sulla base dei studi sopracitati, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare la qualità e la quantità di DNA estratto da una matrice particolarmente complessa e difficile come l'olio d'oliva (usando quattro diversi protocolli di estrazione), mediante analisi di qRT-PCR e ddPCR, confrontando e comparando entrambe le metodologie.

5.3. Materiali e metodi

5.3.1. Estrazione DNA da tessuto vegetale

Il DNA utilizzato come riferimento, per la costruzione di diluzione seriali, è stato isolato da foglie della varietà di olivo spagnola "Picual", applicando un protocollo di estrazione a base di CTAB (cetiltrimetilammonio bromuro) (Murray *et al.*, 1980) con modifiche (Hernández *et al.*, 2001a, b).

5.3.2. Campionamento olio d'oliva

Gli oli extravergine di oliva monovarietalì sono stati ottenuti da tre varietà autoctone del sud-est Sicilia e presenti nei disciplinari di produzioni delle principali DOP siciliane: "Biancolilla", "Nocellara Etnea" e "Tonda Iblea". Inoltre, sono stati inclusi nell'analisi un campione di olio d'oliva estratto dalla varietà spagnola "Picudo" e un olio commerciale semi-filtrato, prodotto dalla Cooperativa 'Nuestra Señora de la Salud' (Castro del Rio, Cordoba, Spagna). Le olive sono state trattate, secondo i metodi standard di produzione, usando un'estrazione a freddo a ciclo continuo in un piccolo frantoio da laboratorio

(Pérez-Jiménez *et al.*, 2013). Subito dopo il trattamento e la produzione dell'olio, gli stessi sono stati conservati al buio a 4 ° C fino al momento dell'estrazione.

5.3.3. Estrazione di DNA da olio d'oliva

Il DNA è stato estratto dai diversi oli entro un periodo di conservazione di circa quattro mesi. I protocolli di estrazione di DNA utilizzati, sono stati scelti in base alle caratteristiche del protocollo di estrazione, al tempo di estrazione, all'utilizzo di solventi organici: **a)** CTAB con colonne di purificazione (Breton *et al.*, 2004) del kit di estrazione DNeasy Plant Maxi Kit con i rispettivi reagenti prodotti dalla Qiagen (Hilden, Germania); **b)** protocollo sperimentare a base di CTAB con purificazione a base di cloroformio (Busconi *et al.*, 2003); **c)** kit di estrazione NucleoSpin Plant II da Macherey-Nagel (Düren, Germania) (Vietina *et al.*, 2011).; e il kit di estrazione NucleoSpin Plant II Maxi con modifiche minori. I protocolli sono stati adattati in base alle quantità di campione di olio di oliva e delle attrezzature a disposizione in laboratorio (Tabella 1):

a) Venticinque ml di campione di olio di oliva sono stati miscelati con 10 ml di tampone CTAB [100 mM Tris-HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM di acido etilendiamminotetracetico, sale disodico (Na₂EDTA), 9% (w/v) cetiltrimetilammonio bromuro CTAB, 5% (w/v) polivinilpirrolidone-40 (PVP-40)] preriscaldato a 65 °C. I campioni sono stati incubati a 65 °C per 2 h. Dopo una prima centrifugazione a 4.600 g per 10 min, le fasi sono state miscelate per inversione con 7,5 ml di tampone AP3. Un totale di 15 ml di questa soluzione è stata caricata sulla Spin Column DNeasy Maxi e i campioni centrifugati a 1900 g per 5 min. Dopo aver lavato membrana delle colonne con il tampone AW, i campioni sono stati ulteriormente centrifugati a 1900 g per 5 min. Il DNA è infine stato eluito aggiungendo 1 ml di tampone AE direttamente sulla membrana. L'eluato filtrato è stato trasferito in una provetta sterile, miscelati con 0,6 v/v di isopropanolo ed incubato a -20 °C *over night*. Dopo una centrifugazione a 14.000 g per 15 minuti, il surnatante è stato

scartato e il pellet, così ottenuto, è stato lavato in etanolo (76%), essiccato a temperatura ambiente per 15-30 minuti e diluito in 50 µl di acqua distillata ultra-pura.

b) centoventi ml di olio d'oliva sono stati distribuiti in quattro provette da 50 ml. Un totale di 10 ml di tampone CTAB (vedi sopra) sono stati addizionati per ciascuna provetta da 50 ml e incubati a 65 °C per 2 ore e 30 minuti. Dopo centrifugazione a 4.600 *g* per 15 min, la fase inferiore è stata trasferita in un nuovo. Poi, un volume di cloroformio-alcool isoamilico (24:1; v/v) è stato aggiunto alla soluzione e centrifugato a 4.600 *g* per 10 min. Il surnatante è stato così trasferito in un nuovo tubo, dove sono stati versati 2 volumi di tampone precipitazione [0,5% (w/v) CTAB, 40 mM NaCl]. Questa soluzione è stata incubata a temperatura ambiente per 2 ore e centrifugata a 4600 *g* per 10 min. Il surnatante ottenuto è stato scartato, sono stati aggiunti subito dopo 350 µl di NaCl [1,2 M] per sciogliere il precipitato. La soluzione risultante è stata trasferita in un nuovo tubo 2 ml. Un totale di 350 µl di cloroformio-alcool isoamilico (24:1; v/v) sono stati aggiunti e il tubo a 9000 *g* per 10 min. La fase acquosa superiore ottenuta è stata trasferita in una nuova provetta da 2 ml contenente un volume di isopropanolo freddo e conservato a -20 ° C *over night*. Il campione è stato, dunque, nuovamente centrifugato a 16.000 *g* per 15 minuti e il pellet recuperato è stato lavato con 0,5 ml di etanolo (76%; v/v). La soluzione è stata mescolata per inversione per 5 minuti, poi centrifugata a 16.000 *g* e il surnatante scartato. Il pellet ottenuto è stato poi essiccato a temperatura ambiente e diluito in 20 µl di acqua distillata ultra-pura.

c) Un ml di tampone PL1 è stato miscelato con un ml di olio di oliva. Dopo essere stato mescolato mediante vortex, il campione è stato incubato a 65 °C sotto agitazione per 30 min. La soluzione è stata quindi centrifugata a 13.000 *g* per 30 minuti a 4 ° C. Dopo la fase di estrazione con il fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1; v/v/v), il surnatante è stato centrifugato a 13.000 *g* a 4 ° C per 5 min. Un'aliquota di 400 µl di questa soluzione è stata trasferita in una

provetta pulita da 1,5 ml, miscelata con 450 µl di Binding buffer e 300 µl di etanolo assoluto, la soluzione così ottenuta è stata mescolata gentilmente per 30 s. La soluzione è stata, quindi, addizionata direttamente sulla membrana della colonna di purificazione NucleoSpin Plant II. Il protocollo è stato continuato secondo le raccomandazioni consigliate dalla casa produttrice. Il DNA è stato infine eluito in 100 µl di acqua ultra-pura distillata e ivi conservato a -20 °C.

d) Un totale di circa 12,5 ml di ogni campione di olio è stato trattato come indicato nel protocollo NucleoSpin Plant II (vedi sopra), con opportune correzioni dovute all'utilizzo di una mole maggiore di partenza di olio. I campioni sono stati eluiti in 500 µl di acqua ultra-pura distillata e, ivi, conservati a -20 °C fino al momento delle successive amplificazioni.

5.3.4. Primer oligonucleotidi

I primer utilizzati per le analisi di quantificazione e purezza del DNA sono stati disegnati sul *locus* cloroplastico 11C (forward: 5'-AGATAAAGGAAGGGCTCGAACG-3'; reverse: 5'-CAGGCCATCAGAATAAGAAGGG-3'). Questa coppia di primer amplifica un frammento di DNA cloroplastico di 103-114 bp di lunghezza (*indel* di 10 bp e poli A₁₁₋₁₄, Besnard *et al.*, 2011); questo primer è stato impiegato sia per le analisi in qRT-PCR che ddPCR.

5.3.5. Quantificazione assoluto con qRT-PCR

Le reazioni di qRT-PCR sono state effettuate su un volume totale di 20 µl contenente 6 µl di DNA isolato da campioni di olio extravergine d'oliva, 1X SensiMix SYBR No-ROX (Bioline, Taunton, MA, USA), e 200 nM di ciascun primer11C. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato. Al fine di monitorare qualsiasi contaminazione, sono stati inclusi nella reazione PCR due controlli negativi. Le analisi qRT-PCR sono state effettuate con un termociclatore Rotor-Gene Q (Qiagen), con le seguenti condizioni: 94 °C per 5 minuti [denaturazione iniziale], 45 cicli [94 °C per 20 s (denaturazione) e 53 °

C per 30 s (*annealing*)] e una incubazione finale a 72 °C per 30 s (estensione). Alla fine di ogni ciclo di amplificazione veniva effettuata la lettura della fluorescenza presente nel campione (SYBR Green I). Il profilo di *melting* è stato esaminato mediante un innalzamento della temperatura, alla fine dei cicli di amplificazione, di 0,1 °C/s in un range di temperatura compreso tra 68°C a 85 °C. I dati sono stati raccolti e analizzati utilizzando il software "Rotor-Gene Q-Pure Detection 2.1.0". Le diluizioni seriali di "Picual" (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} ng/ μ l) sono state utilizzate ed introdotte nell'analisi, al fine di creare una regressione lineare per la quantificazione assoluta del DNA estratto e determinare il grado di quantità del DNA.

5.3.6. Quantificazione assoluta mediante ddPCR

La mix di reazione ddPCR (20 μ l) è stata composta da 1X QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), primer 11C forward e reverse (250 nM concentrazione finale di ciascun primer) e 6 μ l di DNA. Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato. Le miscele di reazione della ddPCR sono state caricate all'interno della QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) e trattate secondo le indicazioni della casa produttrice (Hindson *et al.*, 2011) per la generazione di una emulsione di acqua-in-olio, composta dalla miscela di reazione e un olio emulsionante (Bio-Rad). In particolare, la miscela di reazione di ddPCR (20 μ l) è stata caricata su una cartuccia monouso a otto canali (Bio-Rad). Sempre sulla stessa cartuccia monouso sono stati aggiunti 70 μ l di droplet generation oil (Bio-Rad) in ognuno degli otto canali. Dopodiché la cartuccia è stata posizionata all'interno della Droplet Generator (Bio-Rad). L'emulsione acqua-in-olio, così generata, è stata trasferita manualmente usando una pipetta multicanale in una piastra da 96 pozzetti in polipropilene (Eppendorf, Amburgo, Germania). La piastra è stata termosaldata con un foglio di alluminio e inserito all'interno del termociclatore MyCycler (Bio-Rad) a 95 °C per 2 minuti (denaturazione), seguito da 36 cicli 95 °C per 30 s (denaturazione), 57 °C per 30 s (*annealing*), e una estensione di 72 °C per 1 minuto. La reazione ha avuto una estensione finale a 72 °C per 20 min. Dopo

l'amplificazione PCR, la piastra a 96 pozzetti è stata caricata all'interno della QX200 Droplet Reader (Bio-Rad), la quale legge automaticamente la fluorescenza delle gocce presenti in ogni singolo pozzetto della piastra (32 pozzetti/h), al fine di verificare quanti eventi (gocce) presentassero amplificato e quali no. Le analisi dei dati sono state eseguite con il software "QuantaSoft" 1.7 (Bio-Rad).

5.4. Risultati e Discussioni

5.4.1. Confronto di Protocolli di estrazione

L'utilizzo della tracciabilità genetica per l'analisi di matrici alimentari complesse, come l'olio d'oliva, richiede che la quantità e la qualità del DNA estratto (compresa la sua integrità) soddisfi alcuni requisiti: la assenza di sostanze inibitrici delle DNA polimerasi, l'assenza di contaminazioni incrociate con altre fonti di DNA e ottime condizioni di amplificazione PCR (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013).

Nel corso dell'ultimo decennio, sono stati elaborati un elevato numero di protocolli di estrazione di DNA, nonostante tutto non è stata ancora riscontrata una metodologia univoca ed affidabile per quantificare il DNA estratto da olio extravergine di oliva. Il problema della quantificazione assoluta del DNA estratto è stato già affrontato da vari autori (Wu *et al.*, 2008; Ramos-Gomez *et al.*, 2014), evidenziando come i metodi tradizionali di quantificazione, analisi spettrofotometriche ed elettroforetiche (ad esempio, elettroforesi in gel di agarosio o poliacrilammide), non consentono una valutazione attendibile del campione di DNA isolato (Ramos Gomez *et al.*, 2014).

In questo lavoro, sono stati adottati e confrontati quattro diversi protocolli di estrazione del DNA, tra quelli più utilizzati in bibliografia I risultati sono stati valutati attraverso quantificazione assoluta con analisi in qRT-PCR e ddPCR, al fine di individuare le quantità effettivamente estraibili da un campione di olio extravergine di oliva. Tra i protocolli di estrazione esaminati, il CTAB-cloroformio ha richiesto una maggiore attenzione e manodopera nelle fasi più critiche e delicate dell'estrazione, un maggior quantitativo di olio di partenza e l'utilizzazione di sostanze tossiche, quali fenolo e cloroformio, impiegate in condizione di sicurezza sotto cappa chimica a flusso verticale. Al contrario, i metodi basati sul kit di estrazione NucleoSpin si sono dimostrati relativamente più veloci e semplici (anche se sostanzialmente più costosi). L'approccio basato sul CTAB e le colonne di purificazione della Qiagen, può essere considerato come un compromesso tra i metodi precedenti; infatti,

prevedeva la combinazione di una lisi con un solvente organico (CTAB, utilizzato ampiamente per la lisi delle cellule vegetali) e una purificazione attraverso le membrane di silice delle colonne di purificazione del kit commerciale. Naturalmente, si deve anche considerare che la quantità dell'olio teoricamente estraibile dipende anche da alcune caratteristiche intrinseche del campione, difatti i vari processi di filtrazione o chiarificazione dell'olio possono irreparabilmente influenzare sia l'efficienza della analisi di quantificazione che di caratterizzazione genetica.

5.4.2. **Quantificazione assoluta del DNA estratto e valutazione della qualità**

Per comparare le analisi in qRT-PCR e ddPCR sono stati utilizzati, gli stessi campioni di DNA e le medesime condizioni di amplificazione. La prima quantificazione del DNA estratto è stata effettuata attraverso l'amplificazione del *locus* plastidiale 11C in qRT-PCR. Questo tipo di analisi ha permesso di quantificare il DNA isolato attraverso il confronto e la comparazione con le curve di *standard dilution* a concentrazioni nota (da 10^0 a 10^{-4} ng/ μ l) di DNA fogliare. Le analisi delle curve di amplificazione in qRT-PCR hanno dimostrato che le concentrazioni note delle *standard dilution* si comportano secondo un andamento progressivo previsto in fase sperimentale, che ha permesso attraverso lo studio delle curve di amplificazione l'associazione di una determinata concentrazione iniziale di DNA a un determinato ciclo-soglia (threshold cycle – Ct value), permettendo di effettuare una quantificazione dei campioni di olio di oliva oggetto di analisi (Figura 1). L'approccio CTAB-Qiagen column ha permesso generalmente di misurare una maggior quantitativo di DNA, rispetto a i due metodi basati sul kit commerciale NucleoSpin. Tuttavia, il primo si è rilevato non avere una efficacia soddisfacente per l'isolamento di DNA da olio d'oliva con caratteristiche simili ai più comuni *brand* commerciali.

È interessante sottolineare come le quantità maggiori di DNA quantificato siano state estratte da olio della varietà "Picudo", indipendentemente dal

protocollo di estrazione scelto, indicando una presenza di elevate quantità/qualità DNA all'interno del campione di olio di questa cultivar. Infatti, l'olio d'oliva in esame ha generato i maggiori quantitativi di DNA estratto in termini di resa per i diversi protocolli utilizzati, con $51,5 \pm 8,5$ ng/ml (*NucleoSpin Plant II*), 445 ± 27 ng/ml (*NucleoSpin Plant II Maxi*), 720 ± 18 ng/ml (*CTAB-Qiagen column*) e $169,2 \pm 4,8$ ng/ml (*CTAB-cloroformio*) (Tabella 2).

D'altra parte, la quantità di DNA isolato dai due oli monovarietali delle varietà "Nocellara Etnea" e "Tonda Iblea" (rispettivamente campione 1 e 2) ha mostrato una maggiore variabilità rispetto agli altri, confermando una stretta correlazione della varietà dell'olio sulla resa potenziale di DNA estratto (data not shown). Infatti, l'olio di "Tonda Iblea" (campione 2) ha permesso di isolare un maggiore quantitativo di DNA, rispetto agli altri oli siciliani, indipendentemente dal protocollo di estrazione adottato. Invece, l'olio d'oliva commerciale è stata una delle matrici più difficili da analizzare, probabilmente a causa di alcune specifiche procedure di trattamento o le differenti condizioni di conservazione.

Nel complesso, i risultati di quantificazione assoluta mediante qRT-PCR hanno indicato che il protocollo CTAB-Qiagen column è stato il metodo più efficace. Tuttavia, i protocolli di estrazione basati sul kit NucleoSpin hanno mostrato una maggiore riproducibilità permettendo di isolare una maggiore quantità di DNA. Dalle analisi di *melting* (Figura 5.2) è stato possibile rivelare la presenza di una inaspettata e diversa temperatura di denaturazione dei campioni di DNA isolati con il protocollo NucleoSpin Plant II Maxi (75 °C); diversamente, gli oli estratti con gli altri protocolli di estrazione così come i controlli delle *standard dilution* hanno avuto una temperatura di *melting* intorno 77 °C. Ciò sembra suggerire la presenza di qualche contaminante inibitore. Infatti, come è noto, alcune sostanze chimiche possono ed interferire negativamente nei confronti della temperatura di *melting* e sulla efficienza di amplificazione in PCR creando frammenti di dimensioni inferiori o artefatti (Spiess *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2014; Tateishi-Karimata & Sugimoto, 2014).

La ddPCR è una analisi efficiente e altamente discriminate, di recente introduzione, che effettua una quantificazione assoluta del DNA, essa ha trovato ampia applicazione in diversi campi scientifici, consentendo oltretutto di effettuare analisi quantitative di target specifici di DNA senza la necessità di ricorrere alla costituzione di *standard* di riferimento esterni o interni (Pinheiro *et al.*, 2012; Hayden *et al.*, 2013; Morisset *et al.*, 2013). In questo lavoro, tre diversi campioni di DNA estratti da olio (vale a dire, "Picudo", "Tonda Iblea" e "Nocellara Etnea"), isolati con i quattro protocolli, sono stati utilizzati per la quantificazione assoluta del locus *L11*. Il più alto numero di copie è stato rilevato sui campioni di DNA estratti da olio della varietà "Picudo" (Tabella 5.3), indipendentemente dal protocollo di estrazione adottato, con un massimo di $15,305 \pm 495$ copie DNA/ μ l col protocollo NucleoSpin Plant II Maxi. Contrariamente, il protocollo di estrazione NucleoSpin Plant II ha permesso di estrarre un numero di copie inferiori rispetto agli altri protocolli, con un minimo di $22,5 \pm 1,5$ copie DNA/ μ l per l'olio di "Nocellara Etnea".

All'interno della mix di reazione equamente distribuita su circa 20,000 gocce di emulsione mix-olio, la QX200 Droplet Reader effettua una conta delle gocce formate causate dal fluoroforo intercalante del DNA presente all'interno della miscela di reazione (SyberGreen). Questo permette di ottenere un'approfondita conoscenza della efficienza di amplificazione distinguendo in eventi positivi (massima fluorescenza) e negativi (assenza o parziale fluorescenza) sia per le *standard dilution* di controllo che per i campioni di olio in analisi (Figura 5.3). I campioni di DNA delle cultivar "Picudo", "Tonda Iblea" (campioni 1 e 2) e "Nocellara Etnea" hanno mostrato dei profili di amplificazione, in base al protocollo di estrazione impiegato, simile a quelli derivati dall'analisi in qRT-PCR. I risultati della ddPCR hanno così confermato che il contenuto di DNA estraibile dipende non solo dal protocollo di estrazione utilizzato, ma anche da alcune caratteristiche dell'olio, nel quale si possono includere non solo l'identità varietale, ma anche le condizioni di produzione, conservazione e stoccaggio dell'olio.

Inoltre, si deve considerare che il protocollo di estrazione NucleoSpin Plant II Maxi ha generato per la maggior parte dei casi eventi inefficienti di amplificazione (puntini grigi). Essi sono probabilmente dovuti alla presenza di contaminanti inibitori della DNA polimerasi (Figura 5.4). Questo, infatti, ha perciò confermato quanto era stato osservato dalle analisi della curva di *melting* in qRT-PCR (Figura 5.2), esibendo un profilo diverso per i campioni di DNA estratti con tale kit. Quindi aumentando i quantitativi di olio di partenza si può incorrere nel rischio di avere in concentrazione maggiore polifenoli, carboidrati ed altre sostanze inibitrici che ridurrà la temperatura di *melting* creando frammenti non corrispondenti rispetto ai controlli positivi.

5.4.3. qRT-PCR, ddPCR e diluizione limite

Oltre la quantificazione assoluta del DNA estratto da olio d'oliva, abbiamo voluto mettere a confronto la sensibilità di rilevazione delle tecnologie qRT-PCR e ddPCR per la più piccola concentrazione iniziale di DNA rilevabile.

Le curve di amplificazione ottenute mediante qRT-PCR, sono state ottenute secondo le impostazioni e i settaggi del Rotor-GeneQ con una saturazione del fluoroforo con un valore di *gain* pari a 9. In questa maniera, tenuto anche conto delle condizioni assolute di sterilità, i soli controlli negativi (H₂O) hanno mostrato delle curve di amplificazione che non sono arrivate a saturazione. All'intero delle curve di amplificazione si riconosce un momento in cui il campione inizia la sua amplificazione esponenziale (*ciclo soglia – Ct value*), infatti le diverse *standard dilution* hanno mostrato un inizio della fase esponenziale intorno al 20° ciclo per il controllo più concentrato (10⁰ ng/μl) e al 35° ciclo per quella con concentrazione minore (10⁻⁴ ng/μl). I controlli negativi non hanno mostrato amplificazione se superato il 45° ciclo (Figura 5.4a). La diluizione limite che è stata riscontrata per l'analisi in qRT-PCR è stata la concentrazione 10⁻². Tutti i valori calcolati simili o inferiori alle concentrazioni calcolate per i controlli negativi sono stati considerati statisticamente non significativi (unpaired t-test p-value = 0.8378, t = 0.2325, df = 2, SE of difference = 0.000), (Tabella 5.4). È stata realizzata una regressione lineare della curva standard (R² = 0.9965; F = 2263 on 1 and 8 df and p-value = 4.213e⁻¹¹). Per quanto riguarda le curve di denaturazione, tutti i campioni hanno mostrato lo stesso *pattern*, così com'era atteso in quanto tutti i campioni erano costituiti dalla medesima diluizione seriale (Figura 5.4b).

L'analisi ddPCR è stata eseguita con successo, tutti i campioni analizzati hanno mostrato un numero totale di eventi (gocce) con valori maggiori a 10,000. Nel caso della presenza di elevate concentrazioni (quindi con un numero positivo di eventi maggiore) la risoluzione ha mostrato la presenza di una sovrapposizione degli eventi tanto da ricreare graficamente una zona blu uniforme (Figura 5.5). Questi valori decrescono progressivamente con campioni a concentrazioni più basse. Per quanto riguarda la diluizione limite,

che può essere rilevata con la ddPCR è stata discriminata quella pari a 10^{-3} . Valori simili o inferiori (unpaired t-test p-value = 0.1360, $t = 2.4268$, $df = 2$, SE of difference = 0.183) calcolati rispetto ai controlli negativi, non sono stati considerati informativi al fine della costruzione della curva di amplificazione (Tabella 5.5). In questo caso, la regressione lineare ha mostrato i seguenti valori: $R^2 = 0.9972$, $F = 3593$ on 1 and 10 df and p-value = $4.058e^{-14}$.

I risultati hanno mostrato che la ddPCR ha presentato una risoluzione migliore, con valori più bassi per la individuazione della diluizione limite. Nella qRT-PCR, il minimo valore misurato con significatività statistica è stata diluizione 10^{-2} , mentre nella ddPCR è stata riscontrata una sensibilità 10 volte superiore permettendo di effettuare rilevazione statisticamente attendibile per campioni alla concentrazione di 10^{-3} ng/ μ l. Questo conferma come la ddPCR sia una metodologia indispensabile per la rilevazione di basse concentrazioni di DNA. La regressione lineare della ddPCR ($R^2 = 0.9972$) ha mostrato una precisione ed una efficienza simile a quella della qRT-PCR (0.9965), confermando la validità e l'affidabilità di entrambe le tecniche, nonostante la ddPCR sia stata nettamente la più sensibile. In effetti, quest'approccio può permettere la rilevazione anche di alleli rari all'interno di una miscela di DNA (Lie *et al.*, 2006), e allo stesso tempo rende evidente l'adozione di alcune precauzioni che dovrebbero essere messe *in acta* per evitare la presenza di eventuali falsi positivi, soprattutto quando si lavora con DNA forense o antico.

D'altra parte, è opportuno porre l'attenzione che la ddPCR richiede un sistema di PCR altamente specializzato con una serie di strumentazioni specifiche in sistema chiuso, con costi sicuramente elevati. Inoltre, il costo dei reagenti sia della ddPCR che della qRT-PCR può essere superiore rispetto a quello delle altre tecniche di quantificazione, quali analisi fluorimetriche o spettrofotometriche. Infine, nel caso di specie, cosiddette *non-modello* e prive numerose informazioni sulla composizione della sequenza nucleotidiche da indagare, l'uso di queste tecniche potrebbe non essere perseguibile.

5.5. Conclusioni

Attualmente, la qRT-PCR è una delle tecniche più affidabili per misurare le concentrazioni assolute di DNA vegetale (Paolacci *et al.*, 2009). A causa della presenza di polisaccaridi e altre sostanze inibitrici, i metodi basati sulla spettrofotometria possono non essere affidabili per la quantificazione del DNA (Demeke e Ratnayaka, 2010). Pertanto, avendo a disposizione una sequenza nota, la determinazione del DNA in qRT-PCR è una valida alternativa ai metodi tradizionali, come quantificazione in elettroforesi di gel-agarosio. Al contrario, il calcolo delle concentrazioni in qRT-PCR può presentare alcuni svantaggi: in quanto, questo tipo di quantificazione si basa sull'efficienza della PCR, potrebbe portare alla compresenza di una diversa efficienza di amplificazione sia dei campioni da amplificare che delle diverse *standard dilution* e, quindi, incorre in possibili errori di quantificazione ed interpretazione (Bustin, 2000).

Viceversa, la ddPCR è una analisi di PCR in *end-point* che abbina i vantaggi della PCR tradizionale con quantificazione assoluta senza ricorrere alla costituzione di *curve standard* (Hindson *et al.*, 2011). Durante la reazione PCR e la successiva fase di lettura, le miscele di reazione sono divise in gocce di acqua-in-olio volumetricamente definite, principalmente contenente la molecola DNA *target* (alcuni possono non contenere). In questa partizione, è possibile utilizzare la ddPCR per misurare le quantità assolute del *target* originale DNA, contando gli eventi di amplificazione in ciascuna goccia contenente la reazione emulsione acqua-in-olio. Inoltre, il sistema misura la presenza o l'assenza di fluorescenza all'interno degli eventi totali e, quindi, l'efficienza della PCR è irrilevante per la quantificazione assoluta del campione di DNA, riducendo così i tassi di errore della qRT-PCR (Pinheiro *et al.*, 2012).

Non a caso, la presenza di agenti inquinanti come gli inibitori della DNA polimerasi nei campioni di DNA estratto possono influenzare le prestazioni e possono portare a una riduzione dell'efficacia di amplificazione e una mancanza di riproducibilità (Doveri *et al.*, 2006).

In questo lavoro, i due diversi metodi di quantificazione sono stati usati e confrontati per valutare il miglior protocollo di estrazione per ottenere DNA di alta qualità da oli, da utilizzare per analisi affidabili e riproducibili di *fingerprinting*. I risultati qui ottenuti mostrano chiaramente l'importanza del protocollo di estrazione di DNA, da tenere in considerazione, non solo per l'efficienza in termini di quantificazione assoluta, ma vanno valutati tutti quegli aspetti qualitativi del DNA isolato.

In questo contesto, la ddPCR offre un vantaggio chiaro: quello di far comprendere appieno i risultati, permettendo così l'identificazione di quegli eventi di amplificazione inefficienti, che possono influire negativamente sulle prestazioni di amplificazione, che altrimenti potrebbero portare ad interpretazioni distorte o ad un risultato sbagliato. Inoltre, poiché la ddPCR consente analisi in *end-point*, un tale approccio potrebbe consentire, attraverso una attenta selezione di marcatori molecolari – da utilizzare in multiplex - la capacità di rivelare e quantificare la presenza anche minime di DNA di altre specie contaminanti o di varietà della stessa specie. Per questo approccio, la ddPCR potrebbe aprire degli scenari importanti per la caratterizzazione genetica degli oli extravergine di oliva monovarietal, con chiare implicazioni per le DOP e IGP.

Nonostante, non esiste un unico ed affidabile protocollo di estrazione del DNA da olio d'oliva. La rilevazione della quantità assoluta e della qualità del materiale di partenza possono dipendere non solo dal genotipo, ma anche da alcuni fattori specifici delle differenti procedure di estrazione, conservazione e stoccaggio dell'olio. Dall'altra parte, la concentrazione di DNA che può essere isolata dall'olio è irrimediabilmente bassa e un po' degradata, come spesso accade per studio ed analisi sul DNA; perciò dovrebbe richiedere particolari precauzioni ed attenzioni onde evitare contaminazioni incrociate e falsi positivi.

Tabella 5.1 Protocolli utilizzati per l'estrazione di DNA da olio d'oliva.

Protocollo di estrazione	Olio (ml)	Lisi cellulare (minuti di incubazione a 65 °C)	Purificazione del DNA	Precipitazione e seconda purificazione del DNA	Bibliografia
NucleoSpin Plant II	2	PL1 lysis buffer (30)	Colonne di purificazione del Kit	—	Vietina <i>et al.</i> , 2011
NucleoSpin Plant II Maxi	25	PL1 lysis buffer (120)	Colonne di purificazione del Kit	—	—
CTAB + Qiagen column (DNeasy Plant Maxi Kit)	50	9% CTAB buffer (120)	K Colonne di purificazione del Kit	Isopropanolo e etanolo (76%)	Breton <i>et al.</i> , 2004 con modifiche
CTAB + cloroformio-isoamil alcol (24:1)	120	9% CTAB buffer (150)	Cloroformio-isoamil alcol	Isopropanolo e etanolo (76%)	Busconi <i>et al.</i> , 2003 con modifiche

Table 5.2 Quantificazione mediante qRT-PCR del totale DNA isolato da oli di oliva diversi, utilizzando diversi protocolli.

Olio extravergine di oliva	Concentrazione di DNA (ng /ml)			
	NucleoSpin Plant II	NucleoSpin Plant II Maxi	CTAB-Qiagen column	CTAB-chloroform
Picudo	51.5 ±8.5	445 ±27	720 ±18	169.2 ±4.8
Olio di olive semi-filtrato (commerciale)	10 ±1	36.5 ±0.5	2 ±1	0.2 ±0.2
Tonda Iblea (campione 1)	26.5 ±1.5	34.5 ±5.5	32.5 ±5.5	—
Tonda Iblea (campione 2)	38 ±2	213.5 ±3.5	215 ±1	—
Nocellara Etnea	6 ±1	60 ±10	222 ±2	—
Nocellara del Belice	11.5 ±0.5	198.5 ±25.5	8 ±0.1	—
Media	24.3	160.7	163.8	84.7

Tabella 5.3 Quantificazione assoluta mediante ddPCR espressi in numero di copie di DNA isolato da oli di oliva diversi, utilizzando diversi protocolli (i valori rappresentano le medie di cinque esperimenti).

Olio extravergine di oliva	Concentrazione di DNA (copie DNA/ml)			
	NucleoSpin Plant II	NucleoSpin Plant II Maxi	CTAB-Qiagen column	CTAB-chloroform
Picudo	208 ±7	15,305 ±495	7,475 ±265	1,640 ±30
Tonda Iblea (sample 2)	44 ±5	3,750 ± 50	1,825 ±35	—
Nocellara Etnea	22.5 ±1.5	692 ±15	991 ±61	—
Media	91.5	6,582.3	3,430.3	1,640 ±30

Tabella 5.4 Concentrazione di DNA (ng/μl) mediante analisi in qRT-PCR. I campioni evidenziati in grassetto sono sotto la soglia di risoluzione.

Standard Sample	DNA (ng/μl)	Average (ng/μl)
10 ⁰ (ng/μl)	0.99090	1.00000
10 ⁰ (ng/μl)	1.00910	
10 ⁻¹ (ng/μl)	0.09800	0.10290
10 ⁻¹ (ng/μl)	0.10780	
10 ⁻² (ng/μl)	0.00970	0.01100
10 ⁻² (ng/μl)	0.01230	
10⁻³ (ng/μl)	0.00090	0.00105
10⁻³ (ng/μl)	0.00120	
10⁻⁴ (ng/μl)	0.00030	0.00020
10⁻⁴ (ng/μl)	0.00010	
Negative control 1 (no DNA)	0.00038	0.00035
Negative control 2 (no DNA)	0.00031	

Tabella 5.5. Concentrazione di DNA (copie/ μ l) mediante analisi in ddPCR. I campioni evidenziati in grassetto sono sotto la soglia di risoluzione.

Standard Sample	DNA (copies/μl)	Average (copies/μl)
10^0 (ng/ μ l)	9,700	1,0150
10^0 (ng/ μ l)	10,600	
10^{-1} (ng/ μ l)	817	820.5
10^{-1} (ng/ μ l)	824	
10^{-2} (ng/ μ l)	69.5	70.5
10^{-2} (ng/ μ l)	71.5	
10^{-3} (ng/μl)	5.8	6.5
10^{-3} (ng/μl)	7.2	
10^{-4} (ng/μl)	0.61	0.69
10^{-4} (ng/μl)	0.77	
10^{-5} (ng/μl)	0.35	0.34
10^{-5} (ng/μl)	0.33	
Negative control 1 (no DNA)	0.41	0.245
Negative control 2 (no DNA)	0.08	

Figura 5.1 Curve di **amplificazione** in qRT-PCR del locus di DNA cloroplastico dei tre oli monovarietale: “Picudo” (blu), “Tonda Iblea” (sample 2; verde) and “Nocellara Etnea” (arancione). Le diluizioni di DNA estratte dalla cultivar “Picual” sono state incluse nell’analisi come Standard Dilution (rosso).

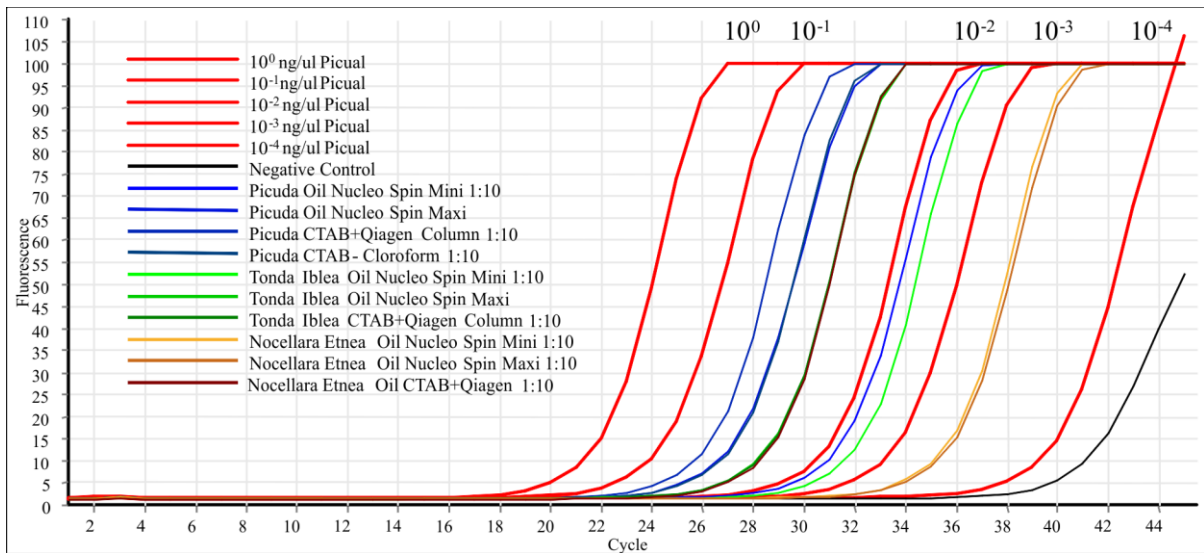


Figura 5.2 Curve di **melting** dell’amplificazione in qRT-PCR del locus cloroplastico *L11* usando il DNA isolato con 4 differenti protocolli di: NucleoSpin Plant II (blu), NucleoSpin Plant II Maxi (verde), CTAB-Qiagen column (viola) and CTAB-Chloroform (giallo). Standard dilution (rosso).

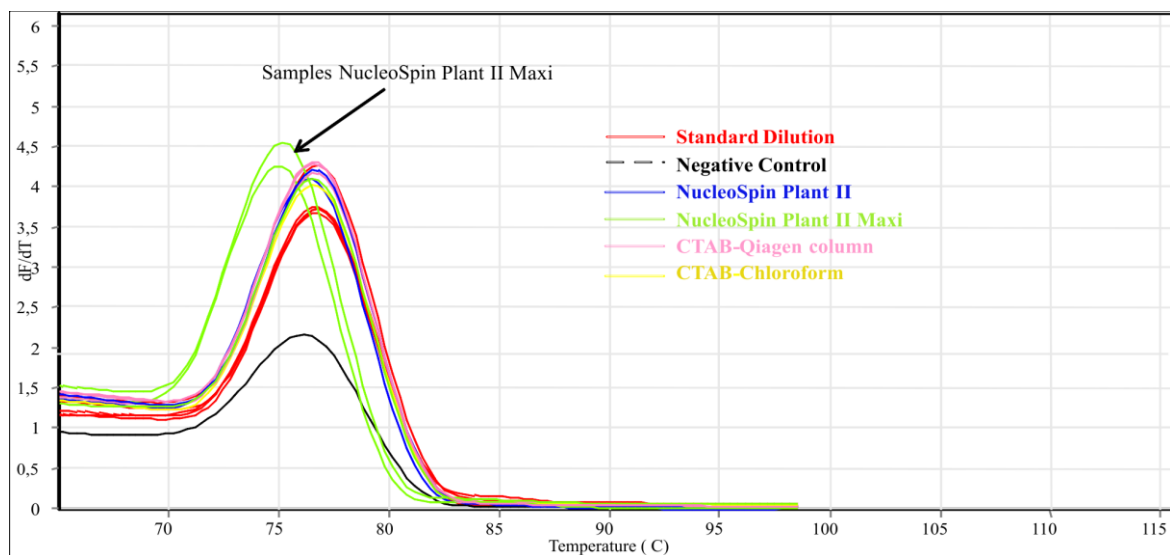


Figura 5.3 Eventi positivi e negativi della quantificazione assoluta mediante l'amplificazione in ddPCR del locus cloroplastico L11. Gli eventi che si trovano più in basso sono quelli che non hanno amplificato o hanno avuto amplificazione parziale (grigio); gli eventi più alti sono quelli che hanno mostrato una amplificazione efficiente (blu). 1) NucleoSpin Plant II; 2) NucleoSpin Plant II Maxi; 3) CTAB-Qiagen column; 4) CTAB-chloroform.

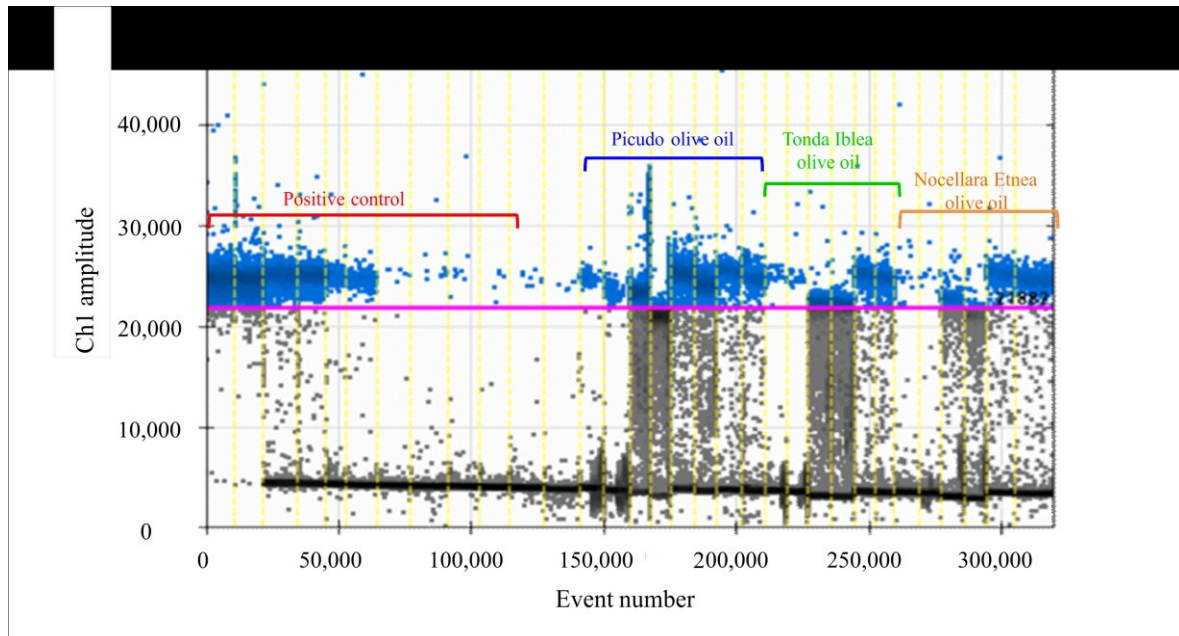


Figura 5.4. Curve di amplificazione (a), e curve di *melting* (b) da qRT-PCR per lo studio della diluizione limite.

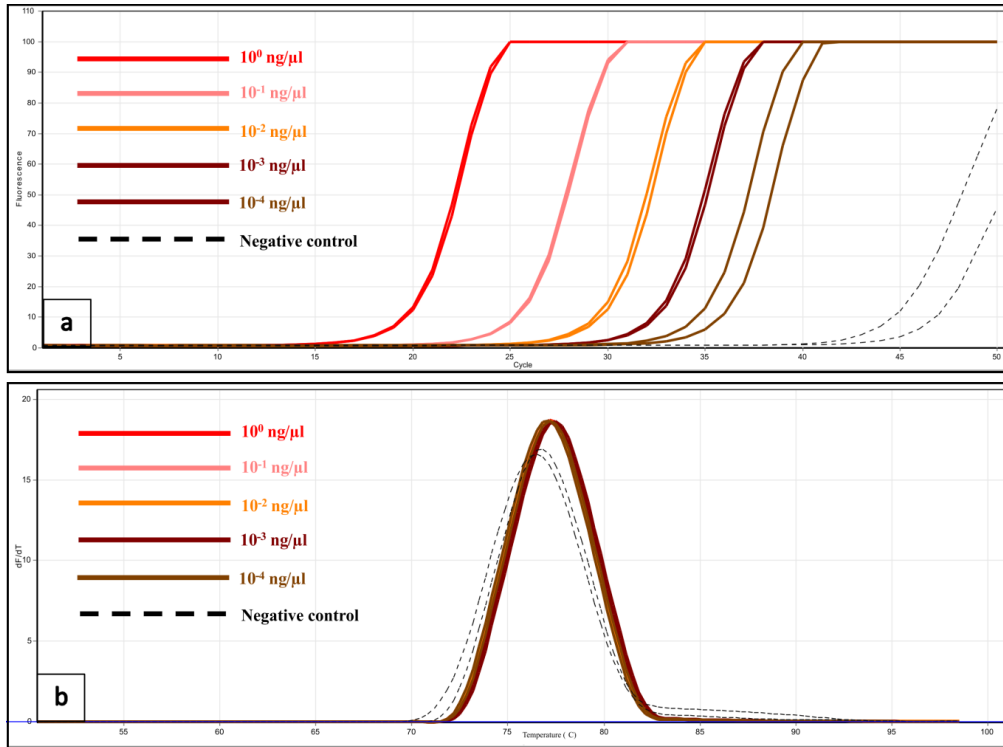
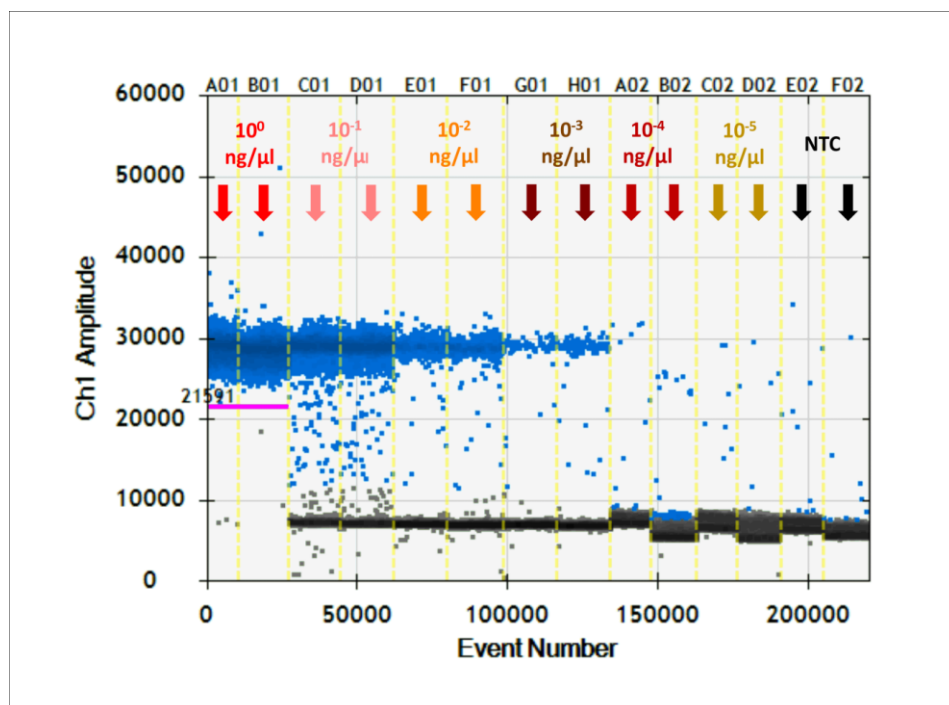


Figura 5.5 Eventi positivi e negativi della quantificazione assoluta attraverso l'analisi in ddPCR del locus cloroplastico *L11* per lo studio delle diluizioni limite. Gli eventi più bassi sono quelli che hanno mostrato nessuna amplificazione o parziale (grigio); gli eventi più alti sono quelli che hanno mostrato amplificazioni efficienti (blu). Gli eventi di amplificazione positivi sono rappresentati con puntini blu.



5.6. Bibliografia

- Agrimonti, C., Vietina, M., Pafundo, S., & Marmiroli, N. (2011). The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 237-244.
- Bautista, R., Cautist, F.M., & Claros, M.G. (2003). Genomic evidence for a repetitive nature of the RAPD polymorphisms in *Olea europaea* (olive-tree). *Euphytica*, 130, 185-190.
- Ben-Ayed, R., Grati-Kamoun, N., Moreau, F., & Rebai, A. (2009). Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *European Food Research and Technology*, 229, 757-762.
- Ben-Ayed, R., Kamoun-Grati, N., & Rebai, A. (2013). An Overview of the Authentication of Olive Tree and Oil. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 218-227.
- Besnard, G., Hernández, P., Khadari, B., Dorado, G., & Savolainen, V. (2011). Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology*, 11, 80.
- Bogani, P., Minunni, M., Spiriti, M. M., Zavaglia, M., Tombelli, S., Buiatti, M., & Mascini, M. (2009). Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors. *Food Chemistry*, 113, 658-664.
- Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorno, C., Cattapan, F., & Fogher, C. (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry*, 83, 127-134.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Severgnini, M., Maestri, E., Marmiroli, N., Agrimonti, C., Baldoni, L., Donini, P., De Bellis, G., & Castiglioni, B. (2008). A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *European Food Research and Technology*, 229, 375-382.
- Costa, J., Mafra, I., Amaral, J. S., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils. *European Food Research and Technology*, 230, 915-923.
- Demeke, T., & Ratnayaka, I. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1977-1990.
- Doveri, S., O'Sullivan, D.M., & Lee, D. (2006). Non-concordance between genetic profiles of olive oil and fruit: a cautionary note to use of DNA markers for provenance testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9221-9226.
- Elloumi, J., Ben-Ayed, R., & Aifa, S. (2012). An overview of olive oil biomolecules. *Current Biotechnology*, 1, 115-124.
- Giménez, M. J., Pistón, F., Martín, A., & Atienza, S. G. (2010). Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for

- olive oil authentication. *Food Chemistry*, 118, 482-487.
- Hernández, P., de la Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G., & Martín, A. (2001a). Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 788-791.
- Hernández, P., de la Rosa, R., Rallo, L., Martín, A., & Dorado, G. (2001b). First evidence of a retrotransposon-like element in olive (*Olea europaea*): implication in plant variety identification by SCAR-marker development. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 1082-1087.
- Hernández, P., Dorado, G., Cabrera, A., Laurie, D.A., Snape, J.W., & Martín, A. (2002). Rapid verification of wheat-*Hordeum* introgressions by direct staining of SCAR, STS and SSR amplicons. *Genome*, 45, 198-203.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., & Colston, B.W. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*, 83, 8604-8610.
- Kim, T.G., Jeong, S.Y., & Cho, K.S. (2014). Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6105-6113.
- Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. (2006). BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature Methods*, 3, 95-97.
- Montemurro, C., Pasqualone, A., Simeone, R., Sabetta, W., & Blanco, A. (2008). AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *European Food Research and Technology*, 226, 1439-1444.
- Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K., & Žel, J. (2013). Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. *PLoS ONE*, 8, e62583.
- Murray, M., & Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 4321-4325.
- Nakano, M., Tateishi-Karimata, H., Tanaka, S., & Sugimoto, N. (2014). Choline ion interactions with DNA atoms explain unique stabilization of A-T base pairs in DNA duplexes: a microscopic view. *The Journal Physical Chemistry*, 118, 379-389.
- Owen, C.A., Bitá, E-C., Banilas, G., Hajjar, S.E., Sellianakis, V., Carolyn A. Owen, Elena-Craita Bitá, Georgios Banilas, Shady E. Hajjar, Vardis Sellianakis, Aksoy, U., Hepaksoy, S., Chamoun, R., Talhook, S.N., Metzidakis, I., Hatzopoulos, P., & Kalaitzis, P. (2005). AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern

- Mediterranean. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 1169-1176.
- Pafundo, S., Agrimonti, C., Maestri, E., & Marmiroli, N. (2007). Applicability of SCAR Markers to Food Genomics: Olive Oil Traceability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6052-6059.
- Paolacci, A.R., Tanzarella, O.A., Porceddu, E., & Ciaffi M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10:11.
- Pérez-Jiménez, M., Besnard, G., Dorado, G., & Hernández, P. (2013). Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS ONE*, 8: e70507.
- Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J., Hindson, B.J., Bhat, S., Emslie, K.R. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry*, 84, 1003-1011.
- Rallo, P., Dorado, G., & Martin, A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 984-989.
- Ramos-Gomez, S., Busto, M. D., Perez-Mateos, M., & Ortega, N. (2014). Development of a method to recovery and amplification DNA by real-time PCR from commercial vegetable oils. *Food Chemistry*, 158, 374-383.
- Rønning, S., Berdal, K. G., Andersen, C. B., & Holst-Jensen, A. (2006). Novel reference gene, PKABA1, used in a duplex real-time polymerase chain reaction for detection and quantitation of wheat- and barley-derived DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 682-687.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendonca, D., Dos Santos, M.R., Da Câmara Machado, M.L., & Da Câmara Machado, A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*, 9, 1171-1173.
- Skykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hugues, E., Condon, J. & Morley, A.A. (1992). Quantitation of target for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 13, 444-449.
- Spiess, A.N., Mueller, N., & Ivell, R. (2004). Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by the disaccharide trehalose. *Clinical Chemistry*, 50, 1256-1259.
- Tateishi-Karimata, H., & Sugimoto, N. (2014). Structure, stability and behavior of nucleic acids in ionic liquids. *Nucleic Acids Research*, 42, 8831-8844.
- Vasudevamurthy M.K., Lever, M., George, P.M., & Morison, K.R. (2009). Betaine structure and the presence of hydroxyl groups alters the effects on DNA melting temperatures. *Biopolymers*, 91, 85-94.
- Velasco, J., & Dobarganes, C., (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(10), 661-676.
- Vietina, M., Agrimonti, C., Marmiroli, M., Bonas, U., & Marmiroli, N. (2011). Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1381-1391. Wahrburg, U., Kratz, M., & Cullen, P. (2002). Mediterranean diet, olive oil and health.

European Journal of Lipid Science & Technology, 104, 698-705.

Wu, Y., Chen, Y., Ge, Y., Wang, J., Xu, B., Huang, W., & Yuan, F. (2008). Detection of

olive oil using the EvaGreen real-time PCR method. *European Food Research and Technology*, 227, 1117-1124.

CAPITOLO 6

ESTRAZIONE DI DNA DA OLIO DI OLIVA E UTILIZZO DI MARCATORI MICROSATELLITI PER LA SUA TRACCIABILITÀ

6.1. Abstract

L'olio d'oliva rappresenta uno dei prodotti più pregiati dell'industria agroalimentare, grazie alle sue caratteristiche organolettiche e nutrizionali. Nel corso degli ultimi anni, l'olio extravergine d'oliva è diventato uno dei prodotti alimentari maggiormente soggetti a sofisticazioni, per possibili adulterazioni e frodi. L'utilizzo di metodologie molecolari applicate alla caratterizzazione genetica dell'olio extravergine d'oliva offre un valido strumento per identificare la composizione varietale e quindi l'origine del prodotto. In questo lavoro sono stati caratterizzare geneticamente, mediante 8 locus SSR, gli oli di 6 cultivar autoctone siciliane prodotti in condizione monovarietale con l'ausilio di un piccolo frantoio sperimentale. Il lavoro ha permesso di discriminare gli oli oggetto d'analisi riscontrando sia omologie sia nette differenze tra il controllo e il DNA estratto da olio. Sono stati confrontati due differenti protocolli di estrazione, i quali hanno evidenziato come la matrice genetica dell'olio sia determinante ai fini della qualità del DNA estratto dall'olio.

I risultati di questo lavoro forniscono informazioni utili per la tracciabilità molecolare degli oli, specie per quelli che si pregiano di marchi DOP e IGP, rappresentando uno strumento capace di definire una "Carta d'Identità" degli oli sulla base dei caratteri genetici e molecolari delle più importanti cultivar d'olivo.

6.2. Introduzione

L'olio extravergine d'oliva rappresenta uno dei prodotti più pregiati dell'industria agroalimentare, grazie alle sue caratteristiche organolettiche e nutrizionali è considerato un alimento indispensabile della dieta Mediterranea. La sua produzione si concentra nei paesi del Mediterraneo, dove l'olivo (*Olea europaea* L.) ha le connotazioni di coltura simbolo. L'interesse per tale prodotto è in continuo aumento e il suo consumo si è diffuso anche tra i paesi tradizionalmente non-produttori, come gli Stati Uniti, l'Australia e il Giappone. Per queste ragioni, e anche in virtù del suo elevato valore commerciale, l'olio extravergine d'oliva è diventato uno dei prodotti alimentari maggiormente soggetto a sofisticazioni, diventando bersaglio d'elezione per possibili adulterazioni e frodi: miscelazione e/o sostituzione di oli extravergine d'oliva di pregio con altri di minor qualità o di oli rettificati e deodorati; aggiunta e/o sostituzione fraudolenta di oli di specie diverse dall'olivo. Per proteggere l'origine geografica e la qualità dell'olio d'oliva, l'Unione Europea ha promulgato regolamenti per la classificazione degli oli d'oliva (Reg. EC n. 1989/03), per la commercializzazione e l'etichettatura (Reg. EC 1019/2002) e per l'identificazione dell'origine geografica (Reg. EC 2081/92 e Reg. EC 2082/92). L'istituzione di marchi di tutela DOP (Denominazione di Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta) è vincolata all'applicazione di un rigido protocollo di produzione al fine di tutelare la qualità e la tipicità dei prodotti. In genere, per assicurare l'autenticità di un olio extravergine d'oliva, ci si avvale di analisi chimiche che permettono di valutare il solo contenuto di metaboliti, come acidi grassi e composti volatili. Tuttavia, queste tipologie di analisi, oltre ad essere talvolta costose, hanno un'applicazione limitata dovuta al fatto che alcuni composti sono soggetti alle influenze ambientali e culturali. Negli ultimi anni, le conoscenze sempre più approfondite nel campo della genomica, in relazione con le più avanzate tecnologie di analisi genetico-molecolari che si sono sviluppate rapidamente in questi anni, stanno aprendo la strada a quella che oggi, a detta dei più importanti ricercatori del settore, è definita "Food Genomics".

Il primo requisito per eseguire un'analisi molecolare su un alimento è la disponibilità di DNA, la quale deve essere di qualità e quantità elevate. La quantità di DNA presente negli alimenti e la sua qualità dipendono, innanzi tutto, dal materiale originale utilizzato, dal trattamento che hanno subito le materie prime e dal tempo trascorso dall'inizio del processo di lavorazione. Questi fattori possono degradare le molecole di DNA, denaturarle, modificarne la struttura chimica e diminuirne in quantità e dimensioni.

L'olio è una matrice grassa, in cui il DNA è poco solubile e quindi difficilmente recuperabile (Hellebrand *et al.*, 1998). Il DNA estratto dall'olio di oliva presenta un alto livello di degradazione, dove generalmente la dimensione dei frammenti amplificabili in PCR non supera le 300 bp. Muzzalupo & Perri (2002) e Busconi *et al.*, (2003) sono stati fra i primi autori a riportare la possibilità di recuperare e caratterizzare il DNA estratto da olio d'oliva. Successivamente nel 2004, è stato presentato uno studio comparativo su diversi metodi di estrazione di DNA da campioni di olio d'oliva, al fine di individuare il migliore protocollo per il recupero di DNA di qualità utilizzabile per analisi molecolari (Breton *et al.*, 2004). Altri autori hanno dimostrato la capacità di poter estrarre DNA dall'olio di oliva e la possibilità di poterlo amplificare mediante PCR per successive analisi con marcatori molecolari (Pasqualone *et al.*, 2004; Pafundo *et al.*, 2005; Pafundo *et al.*, 2007; Pasqualone *et al.*, 2007; Consolandi e Palmieri, 2008).

Questi studi hanno evidenziato che è possibile eseguire analisi di tipo molecolare su olio d'oliva e di ipotizzare un loro utilizzo per la tracciabilità del prodotto. Diversi marcatori molecolari, già utilizzati per la caratterizzazione genetica delle cultivar, sono stati applicati con successo per la tracciabilità molecolare degli oli, AFLP (Busconi *et al.*, 2003; Pafundo *et al.*, 2005; Montemurro *et al.*, 2008), SCAR (Pafundo *et al.*, 2007), SSR (Alba *et al.*, 2009; Ben-Ayed *et al.*, 2009; Martins-Lopes *et al.*, 2008; Pasqualone *et al.*, 2007; Vietina *et al.*, 2011). In alcuni studi di tracciabilità molecolare su oli monovarietalis si è riscontrata la presenza di più alleli rispetto ai controlli di DNA da tessuto vegetale constatando la presenza di alleli di origine paterna all'interno del campione di olio esaminato che derivano dalla frantumazione

del seme (dove c'è la presenza di un embrione zigotico) durante la molitura delle drupe (Doveri *et al.*, 2006).

L'utilizzo di marcatori molecolari sul genoma plastidiale e mitocondriale permetterebbe di eliminare o ridurre il problema della presenza di alleli diversi rispetto al confronto del tessuto vegetale. I marcatori molecolari di origine plastidiale hanno trovato applicazione sia in studi sull'adulterazione con altri oli di origine vegetale (Vietina *et al.*, 2013) sia in studi sulla tracciabilità di oli extravergine di oliva, permettendo la caratterizzazione di aplotipi rari, sebbene la variabilità all'interno della specie *Olea europaea* sia bassa (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013).

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare e confrontare alcuni protocolli per l'estrazione di DNA da olio d'oliva delle varietà più importanti del panorama olivicolo siciliano al fine di definire un protocollo di analisi genetica-molecolare efficiente per la tracciabilità dell'olio. In particolare, in questo lavoro sono stati valutati e ottimizzati due protocolli d'estrazione di DNA da olio di oliva monovarietali applicati alle cultivar Calatina, Biancolilla, Moresca, Nocellara del Belice, Nocellara Etnea e Tonda Iblea. Sul DNA estratto dai genotipi oggetto di studio, si è proceduto a una quantificazione tramite PCR quantitativa ed a una caratterizzazione molecolare con l'ausilio di marcatori SSR (nucleari e cloroplastici). I risultati ottenuti hanno permesso: di ottimizzare le tecniche di estrazione del DNA da olio di oliva; di confrontare i profili genetici del DNA estratto da foglia ed olio per valutarne la riproducibilità; di definire un pattern genetico degli oli a livello monovarietale indispensabile per la loro tracciabilità.

6.3. MATERIALI E METODI

6.3.1. Prelievo del materiale vegetale ed estrazione dell'olio

Nel mese Ottobre 2014 sono stati raccolti 25 kg di olive delle cultivar Biancolilla, Calatina, Moresca, Nocellara del Belice, Nocellara Etnea e Tonda Iblea (Tabella 6.1). 50 kg di olive di ogni cultivar sono stati conferiti presso l'Istituto Superiore I.P.S.A.A. di Palazzolo Acreide, per la molitura in minifrantoio sperimentale (Frantoio Bio, Mori-Tem, Italy) al fine di ottenere oli monovarietali. Estrazione di DNA da foglia e da olio

Per l'estrazione di DNA da matrice oleosa sono stati utilizzati: un kit commerciale adattato all'olio d'oliva (*QIAamp DNA Stool – Protocol: Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection*, Qiagen, Hilden, Germany), e un metodo a base di CTAB, solventi organici (esadeciltrimetilammonio bromuro) e colonne di purificazione del kit di estrazione Dneasy® Plant Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) (Busconi *et al.*, 2003). Per l'estrazione di DNA da tessuto fogliare è stato preliminarmente utilizzato il *Qiagen TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Germany), il quale permette di poter frantumare e omogeneizzare il tessuto vegetale, e successivamente il DNA da tessuto vegetale da ciascun campione è stato isolato mediante il kit di estrazione *ISOLATE II Plant DNA Kit* (Bioline, Taunton, MA, USA).

Per quanto riguarda il primo protocollo di estrazione di DNA da olio extravergine di oliva oggetto di analisi, sono stati prelevati 400 µl di ciascun olio e posti in un tubo da 2 ml. Successivamente, sono stati aggiunti 1,4 ml di *Buffer ASL* e i campioni quindi vortexati almeno per un minuto fino a che il campione e il *Buffer* non si siano completamente omogeneizzati. La sospensione è stata fatta riscaldare in fornello a 70 °C per 5 min e, trascorso questo tempo, i campioni sono stati fatti vortexare per 15 secondi e successivamente fatti centrifugare per 3 min a velocità massima al fine di fare sedimentare il pellet e separare questo dalla fase acquosa e oleosa. Finita la centrifuga, sono stati prelevati 1,2 ml di surnatante facendo cura a non prelevare anche la fase oleosa e posizionati in un altro tubo da 2 ml. In

quest'ultima è stata aggiunta una pasticca "*InhibitEX Tablet*" e il campione quindi vortexato immediatamente per 1 minuto per permettere alla pasticca di sciogliersi e successivamente incubata sempre per 1 min a T ° ambiente per permettere l'imprigionamento degli inibitori dell'olio. I campioni sono stati centrifugati per 3 min a velocità massima per separare il surnatante dalla matrice *InhibitEX*. Il surnatante è stato quindi prelevato e posto in un tubo da 1,5 ml e il pellet scartato e i campioni fatti centrifugare nuovamente alla massima velocità per 5 min.

In un tubo nuovo da 1,5 ml sono stati pipettati 15 µl di *proteinasi K* e aggiunti 200 µl del supernatante ottenuto dall'ultima centrifuga insieme a 200 µl di *Buffer AL*, la mix è stata quindi vortexata per 15 secondi e incubata a 70 °C per 10 minuti (Questa operazione, per alcuni campioni è stata fatta inserendo, in aggiunta, in un tubo da 1,5 ml, 30 µl e 400 µl di supernatante e 400 µl di *Buffer AL*, al fine di ottenere l'eluizione 1 (E1) e l'eluizione 2 (E2), per recuperare tutto il DNA). Per eliminare l'enzima, dopo l'incubazione sono stati effettuati una serie di lavaggi aggiungendo 200 µl di *etanolo* (96-100%) al tubo in cui erano presenti 200 µl di supernatante e 15 µl di *proteinasi K* e 400 di *etanolo* all'altro. I campioni sono stati quindi trasferiti in un tubo da 2 ml contenente la membrana *QIAamp spin column*, centrifugati per 1 minuto alla massima velocità e il filtrato eliminato. La *QIAamp spin column* è stata riposta in un nuovo tubo da 2 ml e sono stati aggiunti 500 µl di *Buffer AW1* e nuovamente centrifugati per 1 min a velocità massima e il filtrato eliminato. La medesima operazione è stata fatta una seconda volta aggiungendo 500 µl di *Buffer AW2* e centrifugando per 2 min.

L'ultimo step è stato quello di trasferire la *QIAamp spin column* in un tubo da 1,5 ml e pipettare 50 µl di *Buffer AE*. La soluzione è stata infine incubata a temperatura ambiente per 5 minuti, quindi centrifugata per 1 minuto per eluire il DNA.

Per quanto riguarda il secondo protocollo di estrazione oggetto di tesi, sono stati aliquotati 25 ml di olio extravergine d'oliva monovarietale delle 6 varietà in questione in tubi da 50 ml a cui rispettivamente sono stati aggiunti 10 ml di *Buffer CTAB* [0,1 M *Tris-HCl* pH 8, 20 mM *EDTA*, 1,4 M *NaCl*, 9% *CTAB*, 5%

PVP] e i campioni fatti incubare a 65 °C per 2 h facendo cura di miscelare i campioni per inversione ad intervalli di 15 min. Trascorso questo tempo, i campioni sono stati fatti raffreddare a T° ambiente per 15 min e successivamente messi in centrifuga per 10 min a 4600xg.

Dopodichè, è stata recuperata la parte inferiore separatasi dalla fase oleosa dopo la centrifuga con l'ausilio di pipette di tipo Pasteur e posta in un nuovo tubo da 50 ml a cui sono stati aggiunti 7,5 ml di *Buffer AP-3* del kit *Dneasy® Plant Maxi Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) per ogni 10 ml di fase recuperata. Sono stati poi fatti centrifugare 15 ml in colonne di purificazione *Dneasy Maxi Spin Column* per 5 min a 1900 g e dopo ogni centrifuga l'eluato veniva scartato. Sono state effettuate altre centrifughe fino ad esaurimento di tutto il volume. Una volta terminata questa operazione, è stata conservata la colonna e sono stati aggiunti 12 ml di *Buffer AW* e fatti centrifugare per 5 min a 1900 g. E' stato poi scartato l'eluato e la colonna conservata, posta in un nuovo tubo da 50 ml. Sono stati successivamente aggiunti 1 ml di *Buffer AE* e fatti incubare per 10 min a T° ambiente. Trascorso questo tempo, è stata effettuata una centrifuga a 1900xg per 5 min ottenendo così l'eluizione 1 (E1) inserita poi in un tubo da 2 ml. Il medesimo step è stato effettuato una seconda volta così da ottenere l'eluizione 2 (E2). Ottenute quindi le due eluizioni (E1 e E2), sono state aggiunte a ciascuna 0,6 v/v di isopropanolo 100% e incubate *overnight* a -20 °C. i campioni sono stati centrifugati per 15 min alla massima velocità. Il pellet ottenuto è stato conservato e il surnatante scartato. Sono stati fatti dei lavaggi aggiungendo 500 µl di etanolo al 76%, i campioni fatti centrifugare per 15 min a massima velocità e il surnatante scartato. Eliminato quest'ultimo, l'intero passaggio è stato effettuato una seconda volta e, successivamente, i campioni sono stati fatti asciugare in stufa a 36 °C fino a che l'etanolo non si sia asciugato completamente. Al termine di questa operazione, infine, i campioni sono stati risospesi in 50 µl di H₂O sterile per quanto riguarda l'eluizione 1 (E1) e in 30 µl di H₂O sterile la eluizione 2 (E2).

Il protocollo appena descritto, è stato anche utilizzato per effettuare l'estrazione di DNA dal sedimento e non dall'olio direttamente. Prima di procedere regolarmente come da protocollo, gli oli delle sei varietà sono stati

aliquotati in tubi da 15 ml e fatti centrifugare per 15 min a velocità massima così da ottenere il pellet. Ottenuto questo si è proceduto normalmente come da protocollo.

6.3.2. Amplificazione locus *ubiquitina* e primer plastidiali

Dai campioni di DNA estratti con i protocolli appena descritti, è stata eseguita l'amplificazione con primer specifici di un gene *housekeeping*, l' *Ubiquitina* di *Olea* spp., e di un locus plastidiale *cpOlea* L11 al fine effettuare un primo test sull'efficienza di amplificazione. La miscela di reazione (15 µl) per tale amplificazione era composta da: 1,5 µl di PCR Buffer Solution 1X, 1,5 µl dNTPs 2 mM, 0,8 µl primer specifici (forward e reverse) 8 mM, 4,2 µl di H₂O, 0,2 unità TaqPol BioTaq (*Bioline, Taunton, MA, USA*), circa 30 ng di DNA (6 µl). I parametri utilizzati per l'amplificazione erano: *denaturazione* a 94°C per 5 minuti, 35-40 cicli di *denaturation step* a 94°C per 30 secondi, *annealing step* a 56°C per 30 secondi, *extension step* a 72°C per 45 secondi, ed una *extension step* finale di 7 minuti a 72°C.

Per verificare che l'amplificazione sia avvenuta con successo, è stata effettuata l'elettroforesi in gel di agarosio (1,5%).

6.3.3. Quantificazione assoluta mediante qRT-PCR

Una quantificazione assoluta dei campioni mediante qRT-PCR (quantitative Real Time – PCR) è stata eseguita amplificando con primer specifici il locus cloroplastico *cpOlea* L11 (5'-AGATAAAGGAAGGGCTCGAACG-3' e 5'-CAGGCCATCAGAATAAGAAGGG-3') al fine di valutare sia la resa che la qualità del DNA estratto. La reazione qRT-PCR è stata effettuata su un volume totale di 15 µl contenenti 3 µl di DNA estratto dai campioni di olio extravergine d'oliva, 1X HRM PCR Master Mix (with *EvaGreen Dye*) (Qiagen, Hilden, Germany), 8 mM di ciascun primer L11 (forward e reverse), H₂O sterile. Tutti i campioni sono stati analizzati in due ripetizioni. Per controllare ed evitare qualsiasi contaminazione durante la reazione di PCR sono stati inclusi due controlli negativi, mentre sono state utilizzate come “standard” diverse diluizioni seriali costituite in laboratorio di DNA estratto da tessuto

fogliare di “Tonda Iblea” (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ng/μl), al fine di creare una regressione lineare e poter così valutare la sensibilità e l’efficienza della quantificazione. I saggi qRT-PCR sono stati eseguiti su un termociclatore Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany), con le seguenti condizioni: 5 min di denaturazione iniziale a 94 ° C, seguita da 45 cicli a 94 ° C per 20 s (*denaturation step*), 53 ° C per 30 s (*annealing step*) e 72 ° C per 30 s (*extension step*); alla fine di ogni ciclo veniva eseguita una lettura della fluorescenza per il fluoroforo EvaGreen. I campioni sono stati alla fine posti a denaturazione da 68 a 85 °C con incremento di 0,1 °C/s. I dati sono stati poi raccolti ed elaborati utilizzando il software “Rotor-Gene Q-Pure Detection 2.1.0” della stessa casa produttrice.

6.3.4. **Analisi con marcatori microsatelliti**

Per l’analisi di caratterizzazione molecolare sono stati utilizzate 8 coppie di primer SSR (Tabella 6.2): DCA4, DCA9, DCA16 (*Sefc et al., 2000*), GAPU59, GAPU 101 (*Carriero et al., 2002*), UDO99-008, UDO99-012, UDO99-024 (*Cipriani et al., 2002*). Il primer forward di ogni coppia è stato marcato con l’aggiunta di una coda M13F (*Oetting et al., 1995*). Per ogni coppia di primer, sono state effettuate delle amplificazioni di DNA a diverse temperature di *annealing* (50-57 °C) e con un diverso numero di cicli (35-40). I primer impiegati sono stati sintetizzati dalla *Invitrogen – Life Technologies Corporation (Carlsbad, California, U.S.)*, mentre le code M13, marcate con *6-FAM*, *PET_atto565*, *NED_atto550*, sono state sintetizzate dalla *Eurofin MGW Operon (Ebersberg, Germania)*.

La miscela di reazione per l’amplificazione per un volume finale di 15 μl comprendeva: 1,5 1X PCR Buffer Solution, 0,5 μl MgCl₂, 1,1 μl dNTP 2 mM, 0.8 μl di primer specifici 5 mM, 1 μl di coda M13, 3,15 μl di H₂O, 0,15 U di TaqPol BioTaq (*Bioline, Taunton, MA, USA*) e 6 μl di DNA corrispondenti a circa 30 ng per i campioni di olio e 1 μl di DNA estratto da tessuto fogliare utilizzato come controllo positivo.

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato attraverso elettroforesi capillare utilizzando il sequenziatore *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*

(*Applied Biosystems*). 7 µl di prodotto PCR è stato miscelato con 1 µl di formamide e 1 µl di *Liz-500 size standard* (*Applied Biosystems*), denaturato a 94°C per 5 minuti e subito dopo trasferito in ghiaccio per un paio di minuti in modo da consentire l'immediato raffreddamento della miscela. I dati in uscita dal sequenziatore sono stati convertiti dal software GENESCAN 3.1.2. in elettroferogrammi, permettendo così una comparazione tra i profili dei diversi campioni.

6.3.5. Analisi dei dati

La distanza genetica tra le accessioni è stata elaborata con il software PowerMarker Versione 3.25 (Liu et Muse, 2005), da cui si è costruito un albero filogenetico utilizzando l'algoritmo *Neighbor-joining* (Saitou et Nei, 1987); L'albero filogenetico ottenuto mediante un indice di dissimilarità con il software DARwin 5.0 (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006) ha previsto l'analisi di riproducibilità attraverso un *bootstrap* 1000. Per la visualizzazione del dendrogramma è stato utilizzato il software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

Altre analisi genetiche sono state elaborate col software PowerMarker (Liu e Muse, 2005), al fine di valutare la performance dei marcatori utilizzati. In fine sono stati calcolati: la maggiore frequenza allelica; il numero di genotipi discriminati; il numero di alleli per locus; l'eterozigosi osservata (H_o) e l'indice di polimorfismo osservato (PIC). In particolare, il PIC è un indice che può variare da 0 (locus monomorfo) a 1 (altamente polimorfo e discriminante), fornendo una indicazione importante sul potere discriminante di un dato marcatore, non solo per il numero di alleli discriminati, ma anche per la frequenza relativa degli alleli analizzati (Botstein *et al.*, 1980).

Tabella 6.1 Cultivar di *Olea europaea* L. prelevate in diverse località da cui si è ottenuto e analizzato il corrispettivo olio extravergine d'oliva

Cultivar	Comune	Località	Coordinate
Calatina	Catania	C.da Primosole	37° 44' 40.00" N 15° 03' 14.00" E
Moresca	Assoro	C.da Dainamare	37° 30' 11.00" N 14° 25' 2.00" E
Biancolilla	Licodia Eubea	C.da Ragoleti	37° 07' 00.00"N 14° 39'56.00"E
Nocellara Etnea	Licodia Eubea	C.da Ragoleti	37° 07' 00.00"N 14° 39'56.00"E
Nocellara del Belice	Licodia Eubea	C.da Ragoleti	37° 07' 00.00"N 14° 39'56.00"E
Tonda Iblea	Licodia Eubea	C.da Ragoleti	37° 07' 00.00"N 14° 39'56.00"E

Tabella 6.2 - SSR impiegati per la caratterizzazione varietale degli oli; ad ogni primer forward è stata aggiunta una coda M13 marcata con fluoroforo –

M13F: 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3

Locus SSR	Sequenza Primer (5'-3')	Sequenza Ripetuta	Range (bp)
ssrOeUA-DCA3	M13F-CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC TGCTTTTGTCTGTTTGAGATGTTG	(GT) ₁₉	246-274
ssrOeUA-DCA9	M13F-AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	(GT) ₂₃	181-231
ssrOeUA-DCA16	M13F-TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	140-250
GAPU59	M13F-CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA CAAAGGTGCACTTTCTCTCG	(CT) ₉	220-248
GAPU101	M13F-CATGAAAGGAGGGGACATA GGCACTTGTTGTGCAGATTG	(GA) ₈ (GA) ₃ (AG) ₃	201-238
UDO99-008	M13F-AAAAACACAACCCGTGCAAT AAATTCTCCAAGCCGATCT	(AC) ₁₃	174-188
UDO99-012	M13F-TCACCATTCTTAACCTTCACACCA TCAAGCAATTCCACGCTATG	(GT) ₁₀	174-186
UDO99-024	M13F-GGATTTATTTAAAAGCAAAACATACAAA CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA	(CA) ₁₁ (TA) ₂ (CA) ₄	184-218

6.4. RISULTATI E DISCUSSIONI

6.4.1. Confronto dei protocolli di estrazione di DNA da olio extravergine d'oliva

L'estrazione di DNA da olio extravergine di oliva in termini di quantità e qualità, tali da consentire l'amplificazione e l'utilizzazione dello stesso in analisi di caratterizzazione molecolare, costituisce uno dei fattori principali al fine di identificare il protocollo più idoneo.

L'olio è, infatti, una matrice abbastanza complessa, ricca in grassi e in polifenoli che interagiscono negativamente sulle performance di amplificazione nonché la presenza di nucleasi, causa della rapida degradazione dello stesso. Infatti, la quantità di DNA presente nel campione di partenza dipende dalla velocità di degradazione del DNA, che risulta essere specifica per ogni campione e quindi variare negli oli in base al processo di lavorazione delle olive, allo stato di filtrazione, alla composizione varietale, alle modalità di conservazione, come l'esposizione diretta ad elevate fonti luminose, alte temperature e presenza dell'ossigeno (Pafundo *et al.*, 2010; Velasco & Dobarganes, 2002). Diversi autori suggeriscono, quindi, di utilizzare campioni d'olio moliti da non più di uno o due mesi conservati al buio, a 4-15°C. Per poter prolungare il periodo delle analisi, i campioni, appena giunti in laboratorio, sono stati conservati a -80°C prelevando di volta in volta l'aliquota necessaria.

Sulla base di quanto riportato in letteratura (Costa *et al.*, 2012), per l'estrazione del DNA si è utilizzato un kit commerciale (QIAamp DNA Stool Mini Kit) opportunamente modificato e adattato all'olio d'oliva, ed un metodo basato sul trattamento dell'olio con detergente CTAB e colonne di purificazione per i polisaccaridi e composti fenolici.

Il DNA estratto da ogni campione, è stato amplificato con un primer *housekeeping* (Figura 6.1) e un *locus* plastidiale ed ivi visualizzato su gel di agarosio (1,5%) per verificare il possibile impiego in ulteriori analisi. Dal gel

elettroforetico (Figura 6.1) si evince l'effettiva estrazione e amplificazione del DNA, evidenziando come il DNA plastidiale ha mostrato una maggiore efficienza rispetto al gene *Ubiquitina*. Questo risultato è probabilmente da ascrivere alle peculiarità del DNA cloroplastico, di forma circolare, meno soggetto alle endonucleasi e, di conseguenza, di qualità maggiore poiché meno degradato. Tuttavia, in contrapposizione con altri studi, come quello di Pèrez-Jiménez *et al* (2013), in cui venivano utilizzati marker cloroplastici per l'identificazione di cultivar e la tracciabilità dell'olio, siamo giunti alla conclusione che l'analisi su gel d'agarosio non permette di poter discriminare piccolissime variazioni dei frammenti amplificati e quindi si presta solamente ad un'analisi solo di tipo preliminare e qualitativo. Il DNA plastidiale, infatti, essendo una molecola altamente conservata, presenta un basso grado di polimorfismo. Questi risultati sono in accordo con quelli condotti da Besnard *et al* (2011), in cui si è osservato che utilizzando *loci* plastidiali amplificati da diverse varietà di olivo, non è stato possibile discriminare efficacemente cultivar di locali che presentano un elevato grado di similarità.

Il DNA estratto, a causa delle ridotte quantità e alla presenza di fattori contaminanti, conservato a 4°C e a -20°C, va incontro a rapida degradazione, quindi, al fine di procedere sia con la quantificazione assoluta che con l'amplificazione con primer SSR, le analisi sono state condotte immediatamente dopo ogni nuova estrazione.

Nel complesso, il metodo di estrazione basato sul *QIAamp DNA Stool Mini Kit* ha dato il vantaggio di essere molto rapido (occorrono circa 3 ore) e si presta per una eventuale applicazione su larga scala. Il kit è particolarmente adatto per l'estrazione del DNA da una matrice di partenza ricca di contaminanti di varia natura, ed è basato su compresse di resina capaci di assorbire gli inibitori della PCR e sull'uso di una membrana che permette di purificare e separare gli acidi nucleici. Questo protocollo presenta anche il vantaggio che necessita di una quantità modesta di olio di partenza (200-400 µl).

Il metodo di estrazione basato sul CTAB e colonne di purificazione, invece, necessita di un quantitativo significativamente maggiore di olio (25-50 ml di olio), il protocollo si svolge in due giorni perché richiede un'incubazione

overnight, nonostante tutto permette di estrarre maggiori quantitativi di DNA di qualità pressoché uguale rispetto al kit commerciale.

6.5. Quantificazione del DNA estratto da olio mediante qRT-PCR

La qRT-PCR (quantitative Real Time - PCR) permette di ottenere risultati più accurati rispetto alla PCR convenzionale grazie all'impiego di un marcatore fluorescente che si intercala nella molecola di DNA durante la fase di amplificazione, dando la possibilità di monitorare costantemente la reazione durante tutto il suo svolgimento, riuscendo così a effettuare una quantificazione del frammento amplificato. Ad oggi, la Real-time PCR è applicata in diversi settori e su varie matrici alimentari per scopi diversi, come ad esempio per la rilevazione di OGM (Marmioli *et al.*, 2008). Questa applicazione, in combinazione con una analisi in HRM (High Resolution Melting), rappresenta uno strumento molto utile che permette di quantificare le componenti presenti nelle miscele degli oli DOP e IGP in accordo con i loro disciplinari di produzione e di garantire l'autenticità del prodotto riuscendo a distinguere oli di altre specie vegetali e smascherando così eventuali frodi (Montemurro *et al.*, 2015). La Real-Time PCR è uno strumento efficace che permette quantificare il DNA estratto dall'olio e valutare la resa di differenti metodi di estrazione, come già riportato in altri studi (Giménez *et al.*, 2010).

In questo lavoro è stata effettuata una quantificazione in qRT-PCR con l'obiettivo di quantificare e confrontare il DNA estratto da oli monovarietali e valutare le relative performance dei due metodi d'estrazione utilizzati: il metodo CTAB Qiagen Column e il kit commerciale adattato all'olio QIAamp DNA Stool. L'analisi è stata effettuata amplificando una regione di DNA cloroplastico ed eseguita con un marcatore fluorescente del DNA (EvaGreen) già utilizzato con successo in altri lavori presenti in letteratura (Wu *et al.*, 2008). Sono state utilizzate come *standard curve* di riferimento diverse diluizioni seriali di DNA ottenuto da tessuto fogliare a concentrazione nota. Le diluizioni ottenute (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ng/ μ l) hanno permesso di costituire una curva standard al fine di quantificare, in base al loro confronto, il DNA di olio estratto. Le amplificazioni così ottenute (Figura 6.2) mostrano

l'efficienza di amplificazione dei diversi campioni a confronto. Dall'analisi statistica effettuata sulle diluizioni standard, in relazione al ciclo soglia (Ct) (Tabella 6.3), è stato possibile verificarne l'efficienza della reazione di amplificazione in base ai coefficienti di correlazione $R^2(0,97)$ e *efficiency* (0,91) (Figura 6.3), ciò ha permesso di validare le *Standard dilution*, comparando le curve di amplificazione; da questa è stata calcolata la concentrazione media del DNA estratto da ciascun campione. I risultati così ottenuti sono stati normalizzati per diluizione e per quantità di olio di partenza e, ivi, il DNA è stato stimato in ng/ml di olio. Dall'osservazione di questi valori, sono state riscontrate quantità di DNA significativamente variabili per ciascun olio monovarietale in questione (Tabella 6.4). In particolare, i risultati ottenuti evidenziano come è stato possibile isolare un maggior quantitativo di DNA dall'olio monovarietale di Nocellara del Belice ($9,70 \pm 3,70$ ng/ml) rispetto alle altre varietà in analisi. Differenze significative sono state verificate per Calatina ($2,12 \pm 1,06$ ng/ml) e Biancolilla ($1,35 \pm 0,10$ ng/ml) dove è stato possibile recuperare maggiori quantità di DNA con il protocollo QIAamp DNA Stool rispetto al metodo CTAB Qiagen Column con rispettivamente $1,46 \pm 0,20$ ng/ml e $1,25 \pm 0,25$ ng/ml. Per tutti gli altri campioni, il protocollo di estrazione CTAB-Qiagen Column si è rivelato il più efficace, consentendo di isolare maggiori quantitativi di DNA (Figura 6.2b). Nonostante i due diversi metodi di estrazione abbiano permesso di estrarre in certi casi quantitativi simili, la variabilità maggiore è stata a carico delle caratteristiche intrinseche degli oli estratti. Le amplificazioni a confronto con le diverse varietà e i diversi metodi di estrazione mostrano che le quantità estratte sono sufficientemente idonee per successive analisi di caratterizzazione, in quanto la maggior parte dei campioni in oggetto presentavano delle curve di amplificazione rispettivamente tra lo *Standard Dilution* 10^0 e 10^{-3} . Questo permette di poter affermare che quantitativi minimi di DNA isolato sono, pur tuttavia, sufficienti per poter essere amplificati.

6.6. Analisi SSR mediante elettroforesi capillare

L'analisi con microsatelliti sul DNA estratto da olio ha richiesto un notevole lavoro di messa a punto dei protocolli di amplificazione e di preparazione del campione per l'elettroforesi capillare. Il profilo elettroforetico dei marcatori SSR sono stati visualizzati in seguito ad elettroforesi capillare, individuando per ogni primer i due alleli in caso di eterozigosi o l'unico allele in caso di omozigosi (Figure 6.4, 6.5). Nonostante siano state verificate la quasi totalità degli alleli tra l'olio e il controllo vegetale: si sono osservati alcuni casi limite: completa corrispondenza tra controllo positivo e olio (Figura 6.4a, 6.4b), parziale corrispondenza dove uno degli alleli presentava un elettroferogramma di bassa intensità (Figura 6.4c, 6.4d), mancata corrispondenza dove un solo allele è presente (Figura 6.5). In ogni caso dall'analisi degli elettroferogrammi è stata costruita una matrice di similarità dei 6 genotipi combinando i risultati sia del DNA estratto da tessuto vegetale (foglia) che da olio. Nella Tabella 6.5, sono stati messi a confronto le caratteristiche di performance dei primer SSR utilizzati, in base alle due tipologie di DNA (olio e foglia). I primer SSR hanno mostrato differenze significative sul numero di alleli discriminati in DNA da olio d'oliva e da tessuto fogliare; in particolare, sono stati discriminati un numero maggiore di alleli in olio nel primer UDO99-008 rispetto al DNA isolato da foglia; mentre nei primer DCA16, GAPU59, GAPU101 e UDO99-024, è stato rispettivamente osservato un allele mancante nel DNA estratto da olio (Tabella 6.5 – “Numero Alleli”). Per quanto concerne la riproducibilità dei marcatori microsatelliti, nel DNA estratto da olio si è osservato un massimo di 1.00 per i primer DCA3 e DCA16 ed un minimo di 0.50 per UDO99-012 e UDO99-024, con una media di 0.85 (Tabella 6.5 – “Riproducibilità”). I valori di eterozigosi osservata mostrano alcune incongruenze tra le due diverse tipologie di DNA in esame; nel primer UDO99-012 si è osservato un valore di eterozigosi in DNA estratto da olio inferiore a quello estratto da tessuto fogliare, rispettivamente di 0.33 e 0.83, mostrando quindi in alcuni casi la presenza di locus omozigoti in olio rispetto alla foglia. Caso contrario nei primer DCA16, GAPU59, UDO99-008 e

UDO99-024, dove l'eterozigosi osservata è risultata maggiore nel DNA isolato da olio. (Tabella 6.5 – Eterozigosi osservata). La variabilità osservata nei risultati ottenuti dimostra come l'analisi del DNA di questi particolari oli extravergini d'oliva non è stata di semplice approccio. Probabilmente, le differenze osservate negli alleli potrebbero essere legate alla bassa qualità del campione, ricco di sostanze inibitrici della reazione di PCR, che hanno reso difficile l'amplificazione. È stato dimostrato come la dimensione legata alla tipologia di *locus* microsatellite amplificato, può compromettere la validità del risultato dell'analisi (Vietina *et al.*, 2011).

Dall'analisi del dendrogramma Neighbor-joining (Figura 6.6) si evincono alcune corrispondenze tra il DNA estratto dagli oli monovarietali e dalle rispettive foglie. In particolare il DNA da olio e da foglia di Calatina, Moresca, Tonda Iblea e Nocellara del Belice si sono raggruppati rispettivamente insieme, dimostrando così una relazione tra le due molecole di DNA. Diverso è invece il caso di Biancolilla e Nocellara Etnea, dove i campioni di DNA di olio e da tessuto fogliare non si sono raggruppati omogeneamente. Questo risultato può essere spiegato dalla presenza di *extra-alleli* o ad artefatti dovuti alla degradazione del DNA che evidenziano un profilo allelico non uniforme al controllo positivo. Tuttavia, questo risultato viene confermato in letteratura da numerose pubblicazioni, dove diversi autori affermano che le differenze osservate siano dovute alla presenza di alleli extra e alla presenza di alleli *drop-out* (Alba *et al.*, 2009; Ben-Ayed *et al.*, 2009; Vietina *et al.*, 2011), fattori legati sempre alla natura e alle caratteristiche proprie dei campioni in esame.

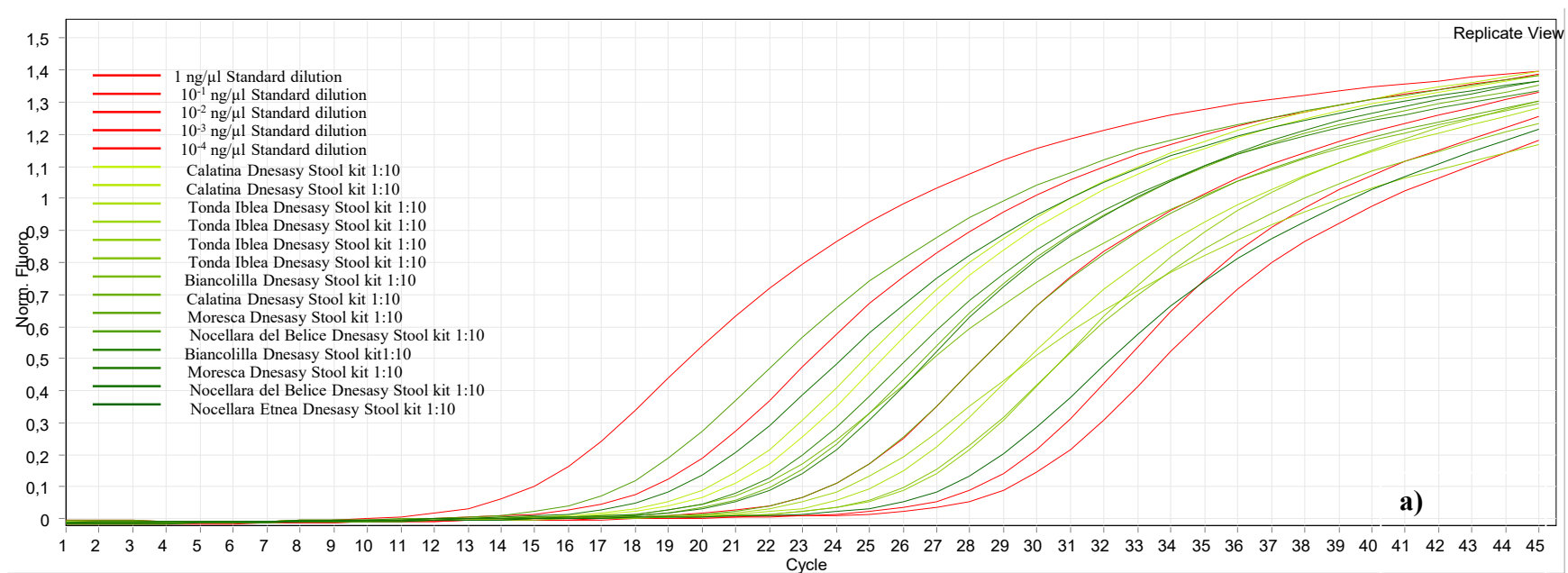
Un ulteriore fattore di variabilità e di mancata corrispondenza dei risultati attesi potrebbe essere dovuta dalle imperfette condizioni di molitura eseguite nel minifratoio. Poiché nel corso della molitura, la pasta delle olive e l'olio si sono trovati continuamente in contenitori e tubi collettori nei quali sono passate le partite di olivo precedentemente molite, nonostante tutto siano state adoperate le dovute precauzioni, si potrebbe essere determinata inevitabilmente una presumibile contaminazione.

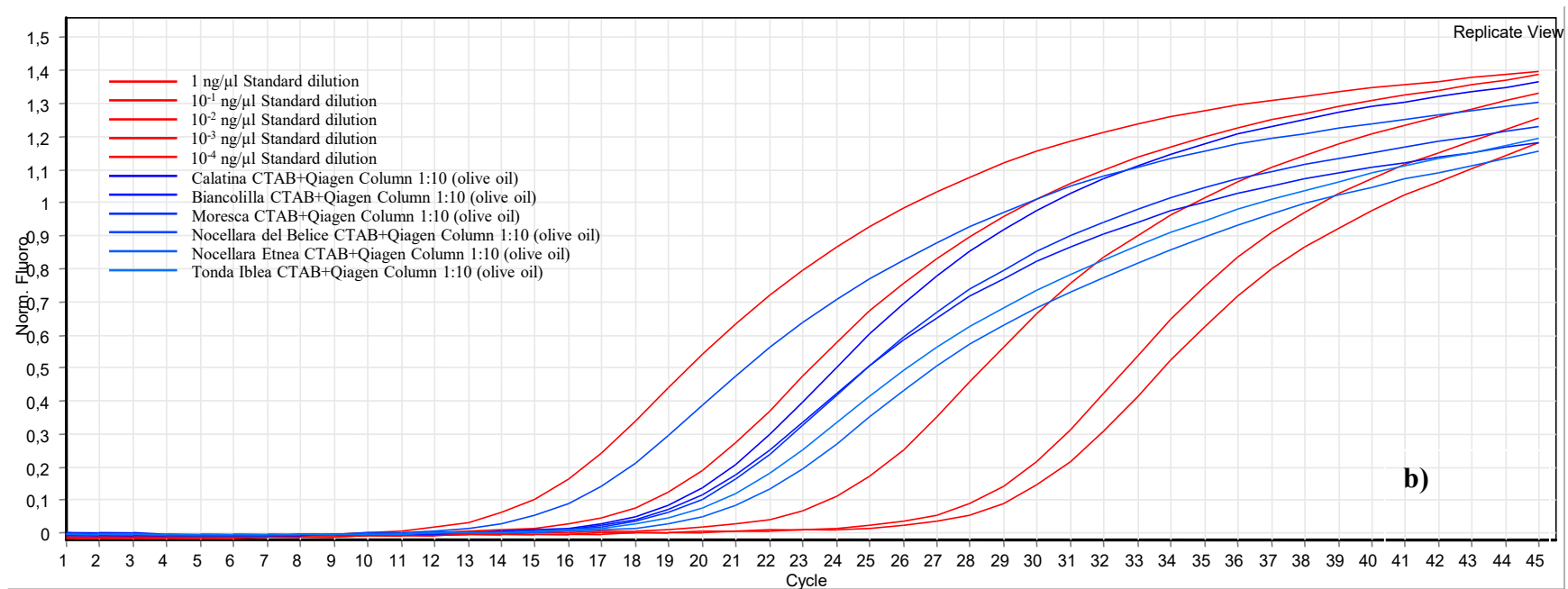
Tabella 6.3: Concentrazione di DNA totale estratto (espresso in ng/ml di olio) in relazione agli oli monovarietalità e ai diversi protocolli utilizzati

	Dnesasy Stool kit	CTAB+Qiagen Column
Calatina	2,12 ± 1,06	1,46 ± 0,20
Biancolilla	1,35 ± 0,10	1,25 ± 0,25
Moresca	0,61 ± 0,39	1,01 ± 0,39
Nocellara Etnea	0,04 ± 0,02	0,37 ± 0,14
Nocellara Belice	9,31 ± 4,72	10,9 ± 2,75
Tonda Iblea	0,15 ± 0,11	0,69 ± 0,14

Tabella 6.5 Comparazione di alleli e informazioni genotipiche degli 8 marcatori microsatelliti su DNA estratto da olio extravergine di oliva e da tessuto fogliare

Marker	Maggiore Frequenza Allelica		Numero osservazioni		Numero Alleli		Riproducibilità		Eterozigosi attesa		Eterozigosi osservata		PIC	
	DNA Olio	DNA Foglia	DNA Olio	DNA Foglia	DNA Olio	DNA Foglia	DNA Olio	DNA Foglia	DNA Olio	DNA Foglia	DNA Olio	DNA Foglia	DNA Olio	DNA Foglia
DCA3	0.33	0.33	6	6	5	5	1.00	1.00	0.76	0.74	1.00	1,00	0.73	0.69
DCA9	0.42	0.42	6	6	4	4	1.00	1.00	0.71	0.71	0.83	0,83	0.66	0.66
DCA16	0.50	0.42	6	6	3	4	1.00	1.00	0.57	0.68	1.00	0,83	0.48	0.62
GAPU59	0.58	0.67	6	6	2	3	1.00	1.00	0.49	0.49	0.83	0,50	0.37	0.42
GAPU101	0.33	0.33	6	6	4	5	1.00	1.00	0.71	0.76	1.00	1,00	0.65	0.73
UDO99-008	0.40	0.42	5	6	5	4	0.83	1.00	0.72	0.64	1.00	0,83	0.68	0.57
UDO99-012	0.83	0.42	3	6	2	3	0.50	1.00	0.28	0.65	0.33	0,83	0.24	0.58
UDO99-024	0.67	0.75	3	6	3	3	0.50	1.00	0.50	0.40	0.67	0,50	0.45	0.36
Mean	0.51	0.47	5.1	6.0	3.5	3.9	0.85	1.00	0.59	0.63	0.83	0,79	0.53	0.58





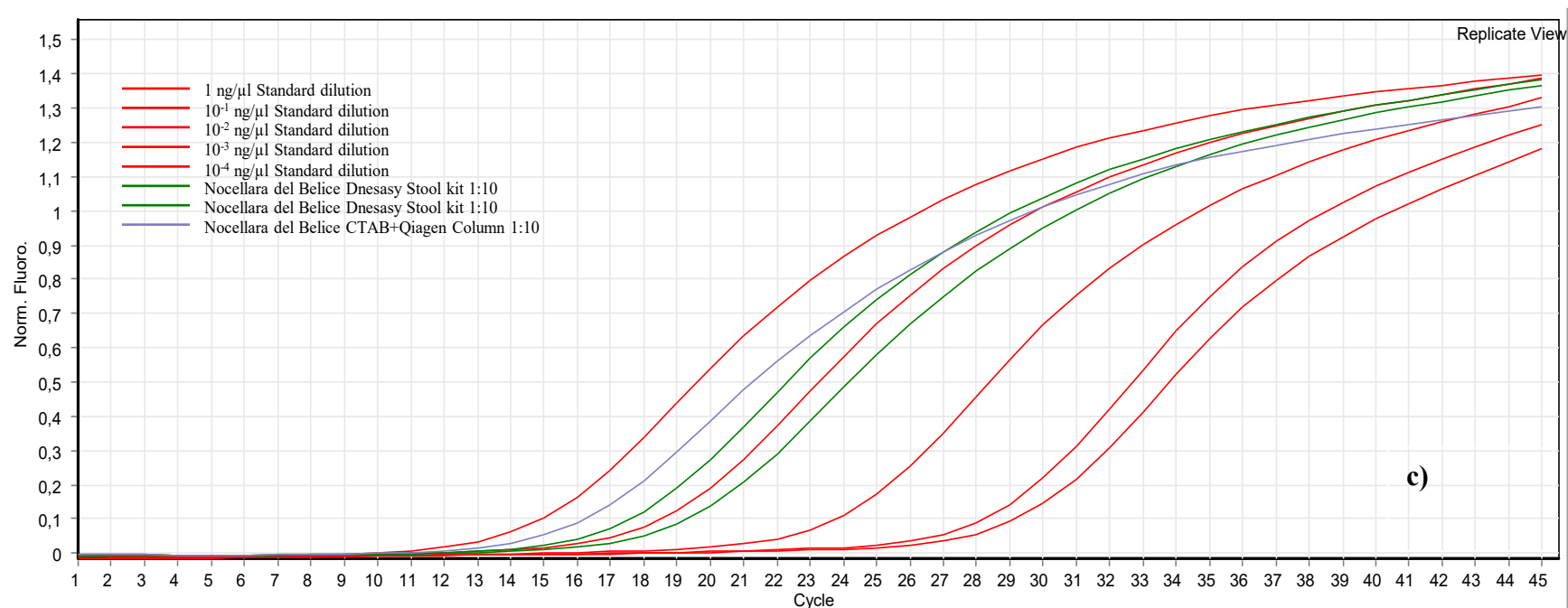


Figura 6.5. Curve di amplificazione qRT-PCR di Standard Dilution (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ng/μl) in rosso; a) estrazione di DNA da tutti i campioni con protocollo QIAamp DNA Stool; b) estrazione di DNA da tutti i campioni con protocollo CTAB Qiagen Column; c) estrazioni di DNA da olio monovarietale di cv. Noc. Del Belice. In ascisse il numero dei cicli di amplificazione, nelle ordinate la misura della fluorescenza.

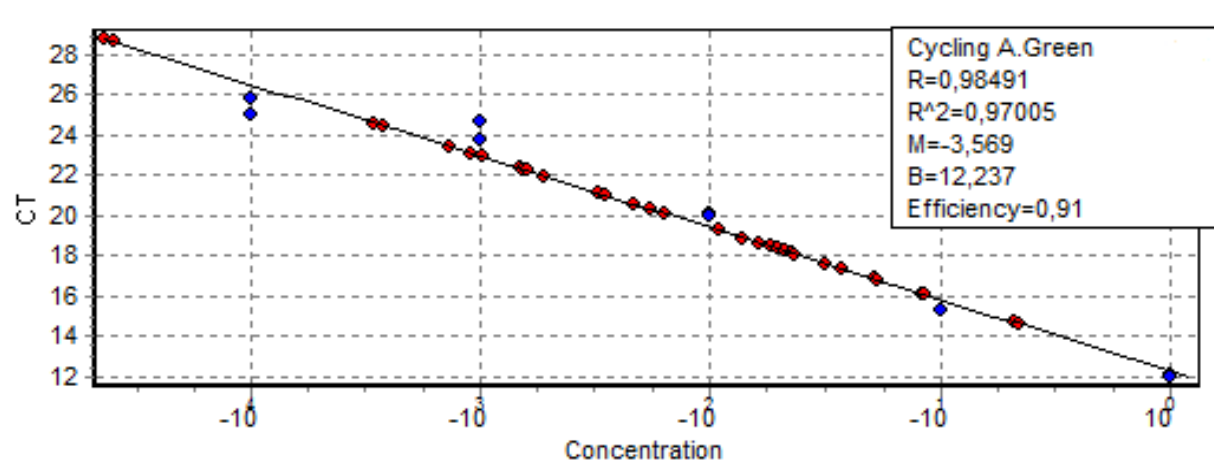


Figura 6.6: Regressione lineare dell'amplificazione degli Standard Dilution e in campioni in analisi.

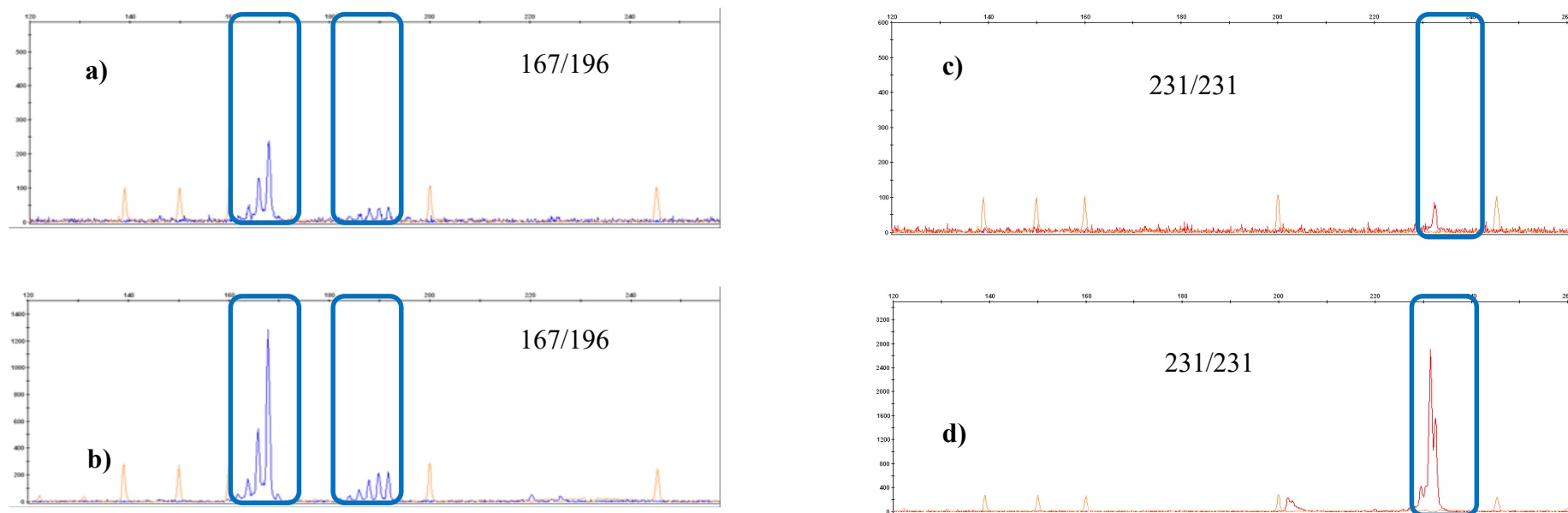


Figura 6.7: profilo SSR GAPU59 e DCA16 e dimensione degli alleli ottenuti con elettroforesi capillare della cv Nocellara del Belice: a-c) olio monovarietale b-d) tessuto fogliare

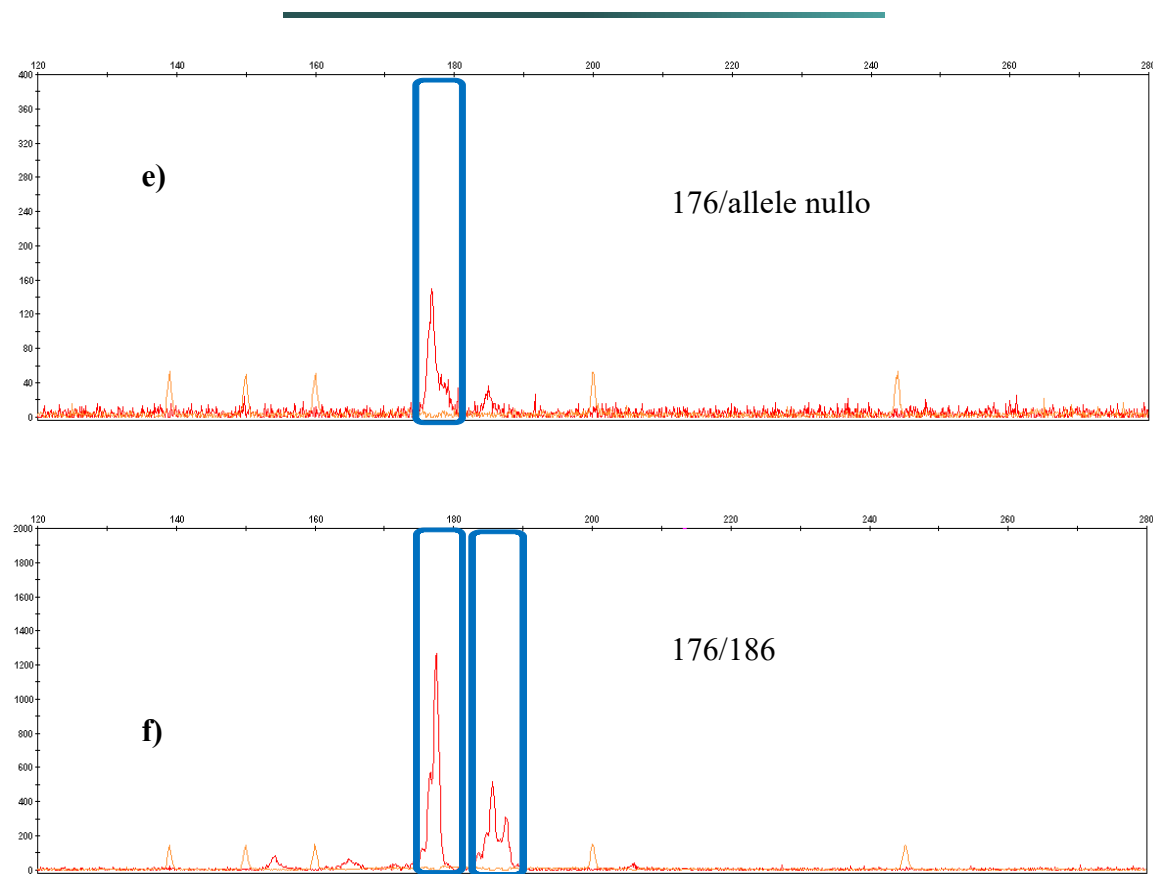


Figura 6.8: profilo SSR UDO012 e dimensione degli alleli ottenuti con elettroforesi capillare della cv Biancolilla: e) olio monovarietale f) tessuto fogliare

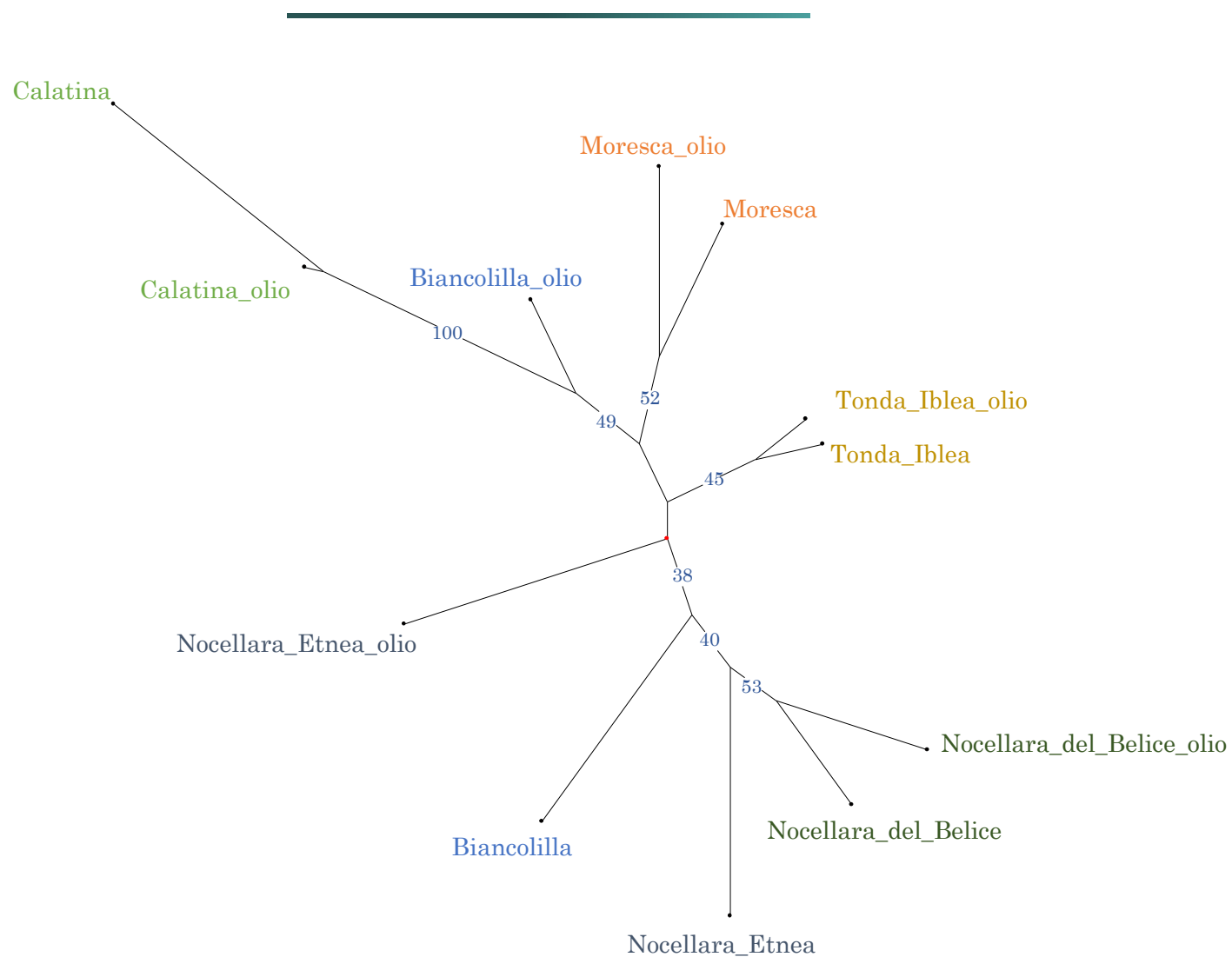


Figura 6.9. Dendrogramma Neighbor-joining delle 6 varietà siciliane in relazione e dei relativi oli monovarietali prodotti

6.7. CONCLUSIONI

In conclusione, l'attività svolta ha permesso di evidenziare alcuni punti critici della metodica complessiva da prendere in considerazione in una possibile fase applicativa. Un problema rilevante su cui ci si è imbattuti ha riguardato la natura intrinseca dei campioni. Le matrici oleose prese in esame in questo lavoro, infatti, sono risultate abbastanza complesse, sia per la loro natura genetica, ma soprattutto perché presentavano un elevato grado di impurità, difficili da eliminare, in grado di influenzare la molecola del DNA e inficiando quindi i risultati delle analisi. Rimane perciò da chiarire quest'aspetto e ulteriori studi sono necessari al fine di poter ottimizzare ulteriormente l'estrazione di DNA da questi particolari genotipi o in alternativa provare altre tipologie di marcatori molecolari che possano consentire la creazione di una "Carta d'Identità" genetica di questi pregiati oli extravergini d'oliva da poter utilizzare come complemento alla tracciabilità documentale e che potrebbe rappresentare da un lato uno strumento di tutela dei prodotti tipici e, dall'altro, contribuire ad una maggiore conoscenza e valorizzazione del germoplasma olivicolo siciliano.

6.8. Bibliografia

- Alba V., Sabetta W., Bianco A., Pasqualone A., Montemurro C. (2009). Microsatellite Markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *European Food Research and Technology*. 229, 375-382.
- Ben-Ayed R., Grati-Kamoun N., Moreau F., Rebai A. (2009). Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *European Food Research and Technology*. 229, 757-762
- Ben-Ayed, R., Grati-Kamoun, N., Moreau, F., & Rebai, A. (2009). Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *European Food Research and Technology*, 229, 757-762.
- Besnard, G., Hernández, P., Khadari, B., Dorado, G., & Savolainen, V. (2011). Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology*, 11, 80.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32, 314 – 331.
- Breton C., Claux D., Metton I., Skorski G., Bervillè A. (2004). Comparative Study of Methods for DNA Preparation from Olive Oil Samples to Identify SSR Alleles in Commercial Oil Samples: Possible Forensic Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 531 - 537.
- Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorno C., Cattapan F., Fogher C. (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry*. 83, 127-134.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G. (2002). Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 104, 301-307.
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 104, 223-228.
- Consolandi C., Palmieri L., Servergnini M., Maestri E., Marmiroli N., Agrimonti C., et al. (2008). A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *European Food Research and Technology*. 227, 1429-1438.
- Doveri S., O'Sullivan D.M., Lee D. (2006). Non-concordance between Genetic Profiles of Olive Oil and Fruit: a Cautionary Note to the Use of DNA Markers for Provenance Testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 9221-9226.
- Giménez, M. J., Pistón, F., Martín, A., & Atienza, S. G. (2010). Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food Chemistry*, 118, 482-487.
- Hellebrand M., Nagy M., Mörsel J.-T. (1998). Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*. 206, 237-242.

- Liu K. and Muse S.V. (2005). Power marker: integrated analysis environment for genetic marker data. *Bionformatic* 21:2128-2129.
- Marmiroli N., Maestri E., Gullì M., Malcevski A., Peano C., Bordoni R., et al. (2008). Methods for detection of GMO in food and feed. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 392, 369-384.
- Martins-Lopez P., Gomes S., Santos E., Guedes-Pinto H. (2008). DNA Markers for Portuguese Olive Oil Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 11786-11791.
- Montemurro C., Miazzi M.M., Pasqualone A., Fanelli V., Sabetta W., di Rienzo V. (2015) Traceability of PDO Olive Oil "Terra di Bari" using High Resolution Melting. *Journal of Chemistry* 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/496986>
- Montemurro C., Pasqualone A., Simeone R., Sabetta W., Blanco A. (2008). AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *European Journal of Food Research and Technology*. 226, 1439-1444.
- Muzzalupo I., Perri E. (2002). Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *European Food Research and Technology*. 214, 528-531.
- Oetting W.S., Lee H.K., Flanders D.J., Wiesner G.L. (1995). Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*. 30, 450-458.
- Pafundo S., Agrimonti C., Maestri E., Marmiroli N. (2007). Applicability of SCAR Markers to Food Genomics: Olive Oil Traceability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 6052-6059.
- Pafundo S., Agrimonti C., Marmiroli N. (2005). Traceability of Plant Contribution in Olive Oil Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6995-7002.
- Pafundo, S., Busconi, M., Agrimonti, C., Fogher, C., & Marmiroli, N. (2010). Storage-time effects on olive oil DNA assessed by Amplified Fragments Length Polymorphisms. *Food Chemistry*, 123, 787-793.
- Pasqualone A., Montemurro C., Caponio F., Blanco A. (2004). Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1068-10671.
- Pasqualone A., Montemurro C., Summo C., Sabetta W., Caponio F., Blanco, A. (2007). Effectiveness of Microsatellite DNA Markers in Checking the Identity of Protected Designation of Origin Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 3857-3862.
- Pérez-Jiménez M., Besnard G., Dorado G., Hernandez P. (2013). Varietal Tracing of Virgin Olive Oils Based on Plastid DNA Variation Profiling. PLoS ONE 8 (8): e70507. Doi:10.1371/journal.pone.0070507.
- Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., 2006. DARwin Software. <http://darwin.cirad.fr/>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

- Velasco, J., & Dobarganes, C., (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(10), 661-676.
- Vietina M., Agrimonti C. and, Marmiroli N. (2013). Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: A tool for disclosure of olive oil adulteraionadulteration. . *Food Chemistry*. 141: 3820-3825.
- Vietina M., Agrimonti C., Bonas U., Marmiroli M., Marmiroli N. (2011). Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.4317.
- Vietina, M., Agrimonti, C., Marmiroli, M., Bonas, U., & Marmiroli, N. (2011). Applicability of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1381–1391.
- Wu, Y., Chen, Y., Ge, Y., Wang, J., Xu, B., Huang, W., & Yuan, F. (2008). Detection of olive oil using the EvaGreen real-time PCR method. *European Food Research and Technology*, 227, 1117-1124.

CAPITOLO 7

DISCUSSIONE GENERALE

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle piante più rappresentative del Mediterraneo. La Sicilia, per ragioni storiche e culturali, presenta al suo interno una molteplicità di accessioni, contraddistinte da caratteri unici tanto da presentare una popolazione clonale con un'ampia variabilità intraspecifica. Questo è determinato non solo dalla biologia riproduttiva della specie (propagazione vegetativa, mutazioni gemmaria, allogamia, autoincompatibilità fiorale, ecc.), ma anche dalla pluralità degli ambienti di coltivazione che contraddistinguono l'isola. Il lavoro di Tesi di Dottorato, che ha avuto tra gli scopi anche quello di definire e caratterizzare la componente genetica dell'olivo in Sicilia, ha permesso di identificare profili genetici discriminando le accessioni analizzate, nonché quelle caratterizzate da variabilità intracultivar. Questi risultati appaiono molto interessanti, anche alla luce dei lavori di tracciabilità genetica effettuati su alcuni oli monovarietali siciliani. La composizione genetica all'interno degli oliveti siciliani è quanto meno incerta. Non a caso, Bottari e Spina (1952) avevano individuato 28 cultivar autoctone, distribuite in tre macro-aree, ognuna delle quali con composizione varietale specifica. Se prendessimo di riferimento la Sicilia Sud-Orientale, le cultivar tipiche sono Biancolilla, Nocellara Etnea, Tonda Iblea e Moresca; le stesse sono conosciute ed individuate con diversi sinonimi (Nocellara Etnea=Paturnisa=Verdese) che in alcuni casi ne rendono difficile l'identificazione in campo. In particolare, l'interesse sempre più crescente per gli oli DOP "Monti Iblei" rende necessaria un'indagine approfondita sulla popolazione clonale delle cultivar citate. L'elevato livello di polimorfismo che è stato osservato è in accordo con i risultati ottenuti da diversi autori che hanno eseguito studi di caratterizzazione genetica mediante l'utilizzo di SSR (Lopes *et al.*, 2004; Alba *et al.*, 2009), evidenziando, proprio all'interno delle cultivar siciliane, una ricchezza in termini di diversità

genetica (Bartolini *et al.*, 2005). La natura co-dominante dei marcatori SSR individuati in EC hanno permesso di rilevare un gran numero di alleli con elevati livelli di eterozigosi. Le accessioni siciliane hanno mostrato, quindi, una notevole variabilità genetica; questo può essere dovuto alla diffusione e lo scambio di materiale di propagazione tra diverse aree di coltivazione e alla selezione empirica a seguito di incroci spontanei. Questi eventi sono collegati alla storia della coltivazione dell'olivo, per molti secoli sottoposti ad una intensa diffusione antropica, essendo la Sicilia fin dai tempi antichi una terra di incontro per le popolazioni del Mediterraneo (Zohary & Hopf, 2000; Rugini *et al.*, 2011.). Le accessioni indiscriminate attraverso analisi in EC, quindi verificando la lunghezza degli SSR amplificati e non la composizione della sequenza nucleotidica, hanno confermato i casi di sinonimia che erano già stati riportati in letteratura (Bottari e Spina, 1952; La Mantia *et al.*, 2005; Caruso *et al.*, 2007); gli stessi casi sono stati indagati tramite analisi HRM, mostrando una diversa composizione genetica e quindi una presenza di mutazioni puntiformi, all'interno dei microsatelliti analizzati. In alcuni casi è stata verificata la presenza di una variabilità in HRM maggiore di quella individuata in EC, dimostrandosi l'HRM uno strumento valido, nella individuazione varietale (Xanthopoulou *et al.*, 2014) e nel *genotyping* di specie di interesse a basso costo (Distefano *et al.*, 2012). Nel complesso, lo studio realizzato tramite HRM costituisce la prima indagine condotta sulla composizione policlonale di alcune tra le più importanti cultivar siciliane, consentendo di fornire informazioni utili per la definizione della struttura genetica della specie in Sicilia.

Le analisi sia di carattere morfologico che molecolare hanno consentito di definire e chiarire alcune importanti differenze all'interno delle cultivar popolazioni. In particolare, le due caratterizzazioni, anche se condotte separatamente, hanno permesso di raggiungere le medesime conclusioni, chiarendo i casi di sinonimia riscontrati. I Campi di Collezione del Germoplasma, oltre a rappresentare una forma avanzata di tutela delle risorse genetiche, possono consentire lo studio e l'approfondimento dei agronomici e fisiologici in un determinato ambiente. Un campo collezione

dovrebbe essere un punto di forza trainante per l'agricoltura locale, per l'orientamento varietale e le innovazioni agronomiche da applicare in campo. Conoscere le relazioni genetiche delle cultivar permette di sapere se l'individuo individuato con quel numero di riconoscimento (ID Number) corrisponda effettivamente alla accessione considerata. I dati discordanti che abbiamo riscontrato nella tesi, quali la differente clusterizzazione genetica in HRM (Capitolo 4) tra le accessioni Zaituna (1 e 2) o Marmorina (1 e 2), implicano non la presenza di una variabilità genetica intracultivar, ma un errore dell'identificazione dell'accessione all'interno di uno dei due Campi di Collezione. Questo aspetto risulta abbastanza critico in quanto avere in campo la presenza di ripetizioni non uniformi rischia seriamente di inficiare sia le analisi morfologiche che genetiche oltre alle valutazioni bio-agronomiche. Questo è ancora più complicato se consideriamo la mole di sinonimie e omonimie che contraddistinguono le cultivar siciliane (Bottari e Spina, 1952). La non uniformità dei Campi Collezione deve far riflettere sulla necessità di standardizzare i Campi Collezione di Germoplasma di Olivo presenti nel mondo, identificando l'accessione modello (o tipo) per cultivar. Ciononostante possono incorrere dei possibili errori di *drop-out* e *missing-allele* tra un laboratorio ed un altro (Baldoni *et al.*, 2009). Questo deve mettere nelle condizioni di fornire, anche a livello vivaistico, materiale di propagazione geneticamente verificato così come previsto dal DM 4/5/2006.

Uno dei temi trattati nella tesi di dottorato ha riguardato la valutazione dell'efficienza di protocolli di estrazione di DNA da olio extravergine di oliva; l'obiettivo di verificare il protocollo in grado di ottenere una resa in DNA sufficiente a caratterizzare geneticamente, mediante marcatori SSR, sei oli extravergine monovarietali di oliva. L'olio extravergine di oliva, in questo contesto, è considerato uno dei prodotti di maggior qualità sia per l'elevato valore economico-commerciale, sia per gli aspetti nutrizionali e salutistici. In particolare, le differenze genetiche sono uno dei fattori che contribuiscono maggiormente, insieme alle condizioni edafiche, climatiche e agronomiche, sulle caratteristiche sensoriali e organolettiche degli oli prodotti; la possibilità di definire, quindi, l'origine e la composizione varietale rappresentano uno

degli aspetti fondamentali per la tracciabilità molecolare degli oli extravergine di oliva. Le analisi quantitative e qualitative sono state effettuate mediante qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR) e mediante ddPCR (droplet digital PCR) che, in combinazione, hanno consentito una quantificazione assoluta del numero di copie del DNA dei campioni in analisi. L'utilizzo della ddPCR, definita PCR di terza generazione, è stata applicata per la prima volta su DNA estratto da olio extravergine di oliva. L'analisi ha consentito una valutazione dei protocolli di estrazione utilizzati, basata sulla definizione della reale qualità del DNA. Attualmente, la qRT-PCR è una delle tecniche più affidabili per misurare le concentrazioni assolute di DNA vegetale (Paolacci *et al.*, 2009). A causa della presenza di polisaccaridi e altre sostanze inibitrici i metodi basati sulla spettrofotometria possono non essere affidabili per la quantificazione del DNA (Demeke e Ratnayaka, 2010). Pertanto, avendo a disposizione una sequenza nota, la determinazione del DNA in qRT-PCR è una valida alternativa ai metodi tradizionali, come ad esempio la quantificazione in elettroforesi di gel-agarosio. Al contrario, il calcolo delle concentrazioni in qRT-PCR può presentare alcuni svantaggi poiché si potrebbe incorrere in errori di quantificazione ed interpretazione (Bustin, 2000).

Viceversa, la ddPCR è una analisi di PCR in *end-point* che abbina i vantaggi della PCR tradizionale con quantificazione assoluta senza ricorrere alla costituzione di *curve standard* (Hindson *et al.*, 2011). Durante la reazione PCR e la successiva fase di lettura, le miscele di reazione sono divise in gocce (eventi) di acqua in olio volumetricamente definite, che contengono la molecola DNA *target*. In questa partizione è possibile utilizzare la ddPCR per misurare la quantità assoluta del *target* originale DNA, contando gli eventi di amplificazione in ciascuna goccia contenente la reazione emulsione acqua-in-olio. Inoltre, il sistema misura la presenza o l'assenza di fluorescenza all'interno degli eventi totali e, quindi, l'efficienza della PCR è irrilevante per la quantificazione assoluta del campione di DNA, riducendo così i tassi di errore rispetto alla qRT-PCR (Pinheiro *et al.*, 2012).

Non a caso, la presenza di agenti inquinanti, come gli inibitori della DNA polimerasi nei campioni di DNA estratto, può influenzare le prestazioni e può portare a una riduzione dell'efficacia di amplificazione e ad una mancanza di riproducibilità, come ad esempio una non completa corrispondenza tra i profili genetici di DNA estratto da olio di oliva e foglie delle medesime cultivar (Doveri *et al.*, 2006). I due diversi metodi di quantificazione sono stati usati e confrontati per valutare il miglior protocollo di estrazione al fine di ottenere DNA di alta qualità da oli, utilizzato per analisi affidabili e riproducibili di *fingerprinting*. In questo contesto, la ddPCR offre un vantaggio chiaro: comprendere i risultati, permettendo così l'identificazione degli eventi di amplificazione inefficienti che possono influire negativamente sulle prestazioni di amplificazione. Difatti, questi ultimi potrebbero portare ad interpretazioni distorte o a risultati sbagliati. Inoltre, la ddPCR consente analisi in *end-point*, in grado di rivelare e quantificare la presenza anche minime di DNA di altre specie contaminanti o di varietà della stessa specie. La ddPCR potrebbe aprire degli scenari importanti per la caratterizzazione genetica degli oli extravergine di oliva monovarietali, con risvolti interessanti per le produzioni DOP e IGP.

Ad oggi non esiste un unico ed affidabile protocollo di estrazione del DNA da olio d'oliva riconosciuto dal legislatore e dagli enti certificatori e di tutela; le ultime ricerche e le ultime innovazioni stanno andando verso la possibilità di procedere, anziché con processi di estrazione mediante solventi organici (Muzzalupo e Perri, 2002), attraverso estrazione con processi fisici (Muzzalupo *et al.*, 2015), amplificando direttamente l'olio. Questo potrebbe essere uno strumento estremamente importante per la verifica e rintracciabilità molecolare degli oli. I risultati complessivi di questo lavoro mostrano come la rilevazione della quantità assoluta di un campione dipende non solo dalla scelta del protocollo di estrazione, ma dipende anche dal genotipo del campione e da alcuni fattori specifici delle differenti procedure di estrazione, conservazione e stoccaggio dell'olio.

In conclusione, l'analisi molecolare mediante marcatori microsatelliti in EC del DNA estratto dagli oli monovarietali, è stata finalizzata alla definizione di

un protocollo di caratterizzazione molecolare dell'olio di oliva, che ha consentito di comparare il profilo genetico del DNA estratto dalle foglie con quello del corrispettivo olio. La caratterizzazione molecolare ha mostrato quanto può essere affidabile e altamente informativa l'utilizzazione di marcatori microsatelliti. La stessa ha permesso di evidenziare alcuni punti critici della metodica complessiva da prendere in considerazione in una possibile fase applicativa. Un problema rilevante ha riguardato la natura intrinseca dei campioni. Le matrici oleose prese in esame in questo lavoro, infatti, sono risultate abbastanza complesse, sia per la loro natura genetica, ma soprattutto perché presentavano un elevato grado di impurità, difficili da eliminare, in grado di influenzare la molecola del DNA e inficiando quindi i risultati delle analisi. Rimane, perciò, da chiarire quest'aspetto e ulteriori studi sarebbero necessari al fine di poter ottimizzare ulteriormente l'estrazione di DNA da olio. Tale studio sarebbe opportuno effettuarlo nelle diverse fasi di lavorazione dalle olive, dalla sansa e dall'olio. L'estrazione di DNA da olio extravergine di oliva e la possibile applicazione di altre tipologie di marcatori molecolari creano i presupposti della costituzione di una auspicata "Carta d'identità" genetica degli oli extravergini d'oliva monovarietalità con marchio DOP e IGP da poter utilizzare come complemento alla tracciabilità documentale e che potrebbe rappresentare da un lato uno strumento di tutela dei prodotti tipici e, dall'altro, contribuire ad una maggiore conoscenza e valorizzazione del germoplasma olivicolo siciliano.

TAVOLE MORFOLOGICHE POPOLAZIONE CLONALE

·BIANCOLILLA'

PIII

P13

P23

P25

XIII-80

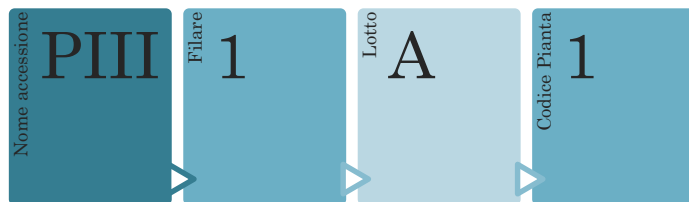
XXV-91

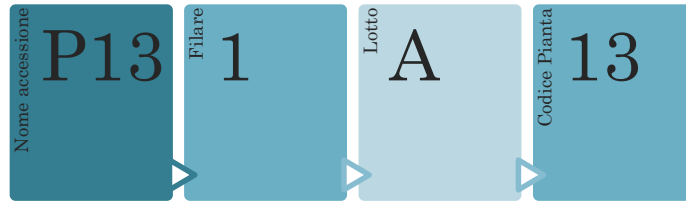
ROMANA

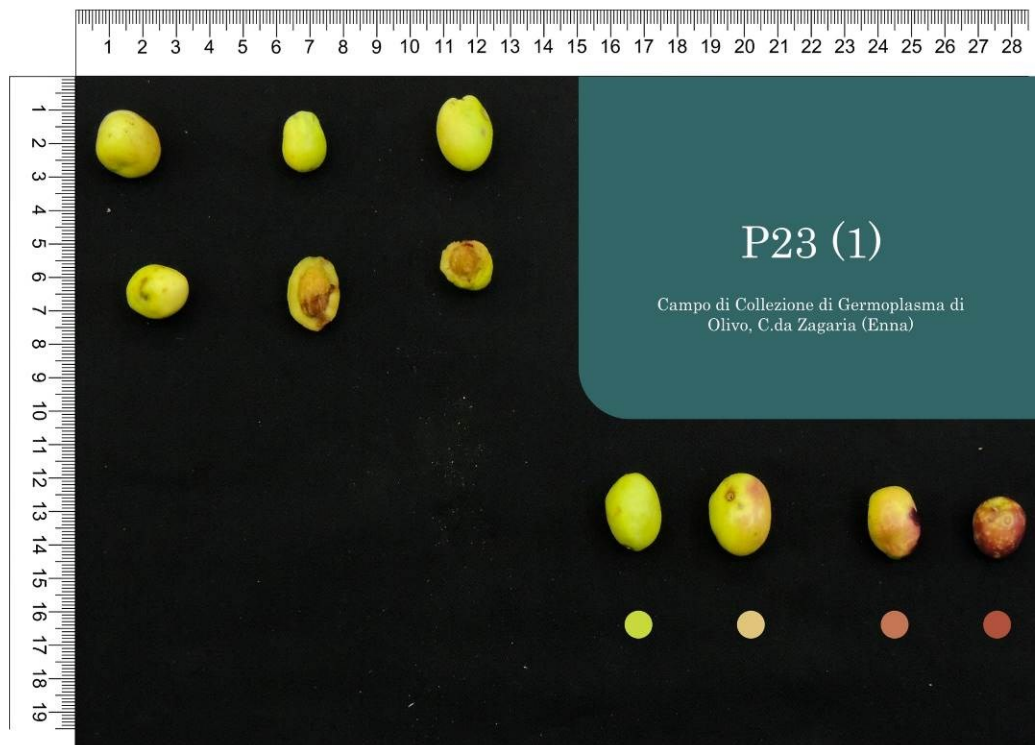
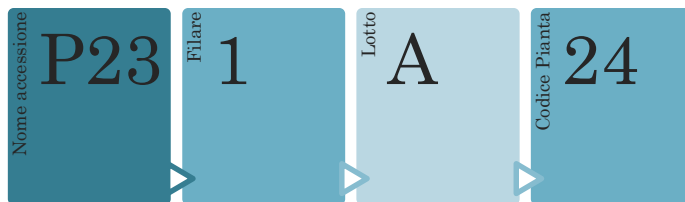
BIANCOLILLA NANA (992)

BIANCOLILLA NANA (962)

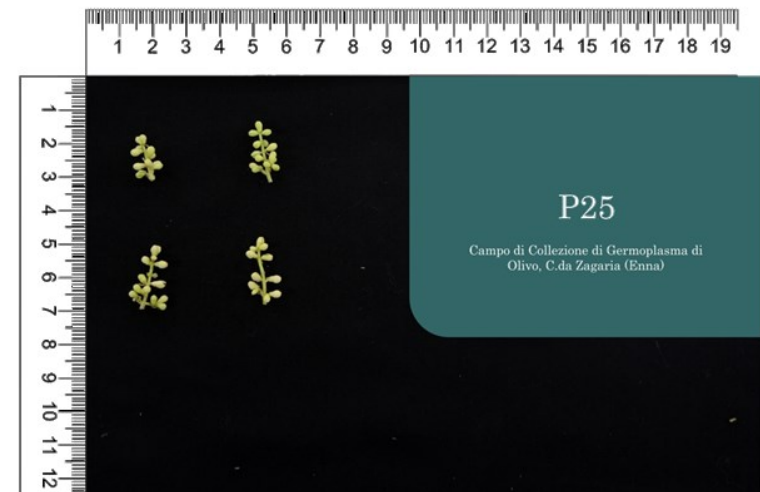
BUSCIONETTO

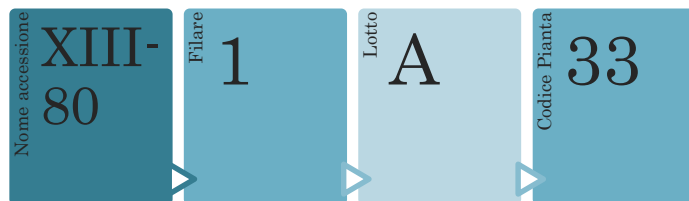




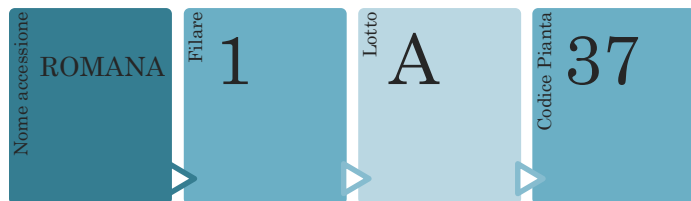


Nome accessione **P25** Filare **1** Lotto **A** Codice Pianta **27**

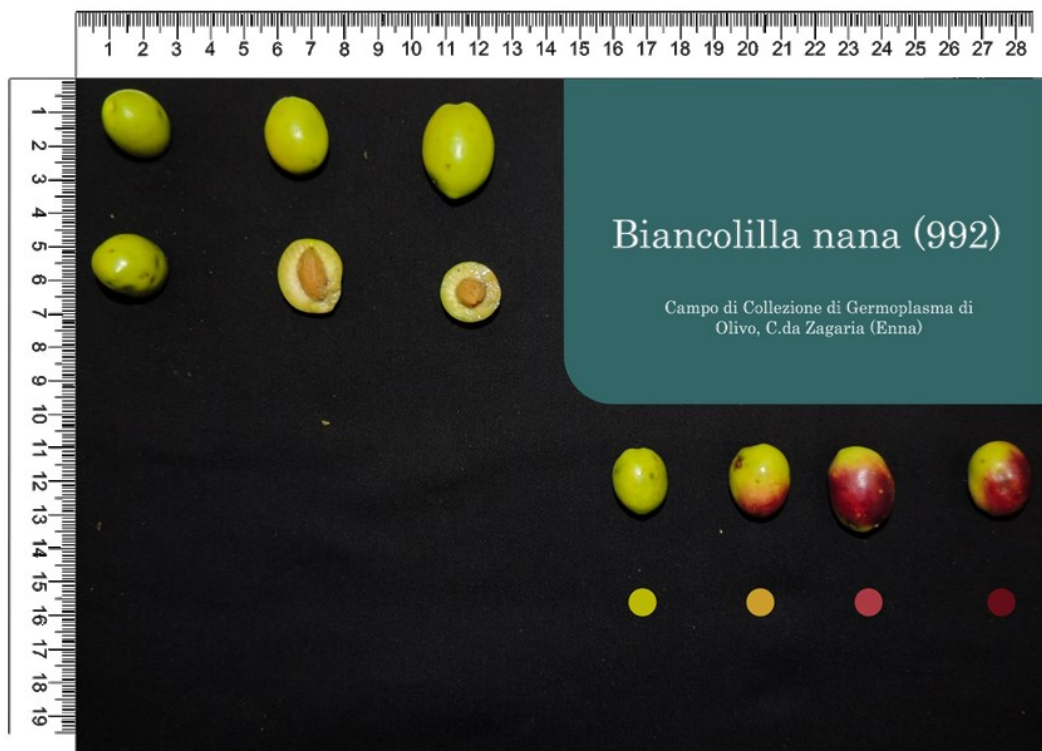








Nome accessione BIANCO LILLA NANA (992)	Filare 1	Lotto B	Codice Pianta 13
---	--------------------	-------------------	----------------------------

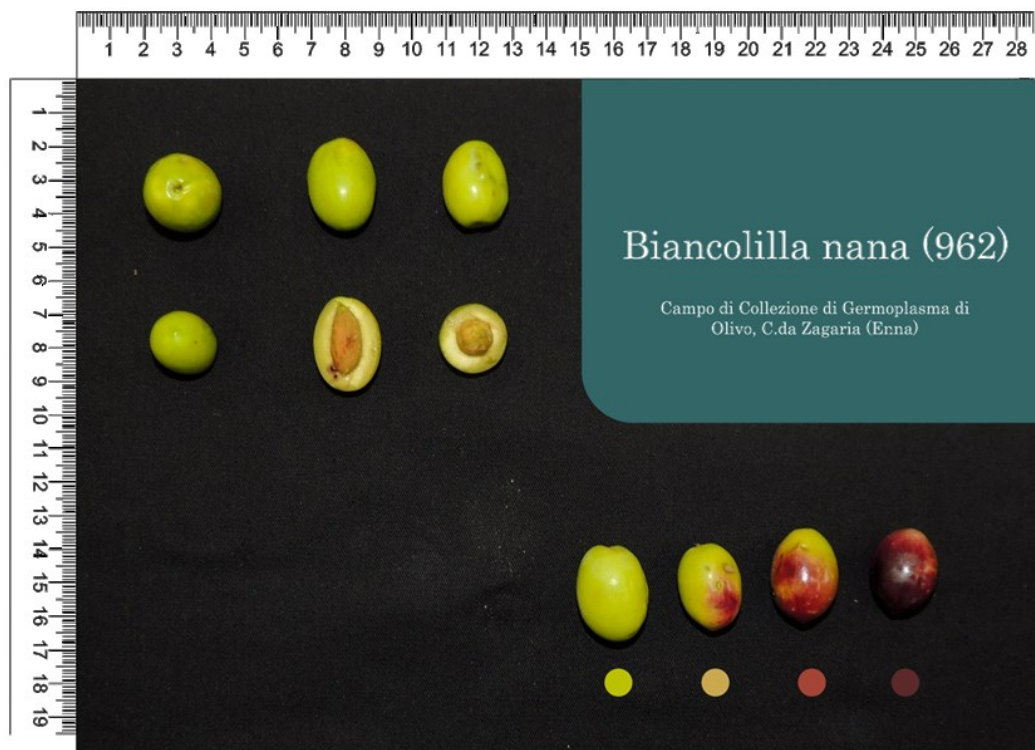


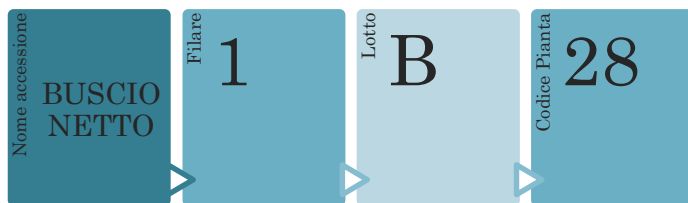
Nome accessione
**BIANCO
LILLA
NANA
(962)**

Filare
1

Lotto
B

Codice Pianta
20





TAVOLE POMOLOGICHE POPOLAZIONE CLONALE

‘NOCELLARA ETNEA’

P07

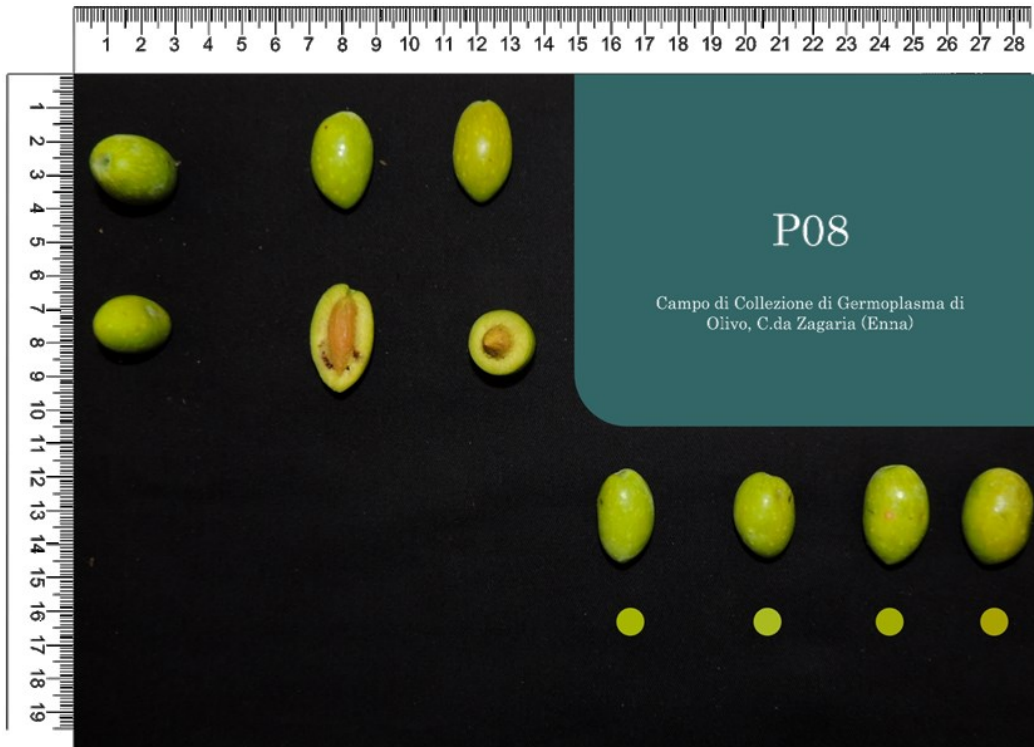
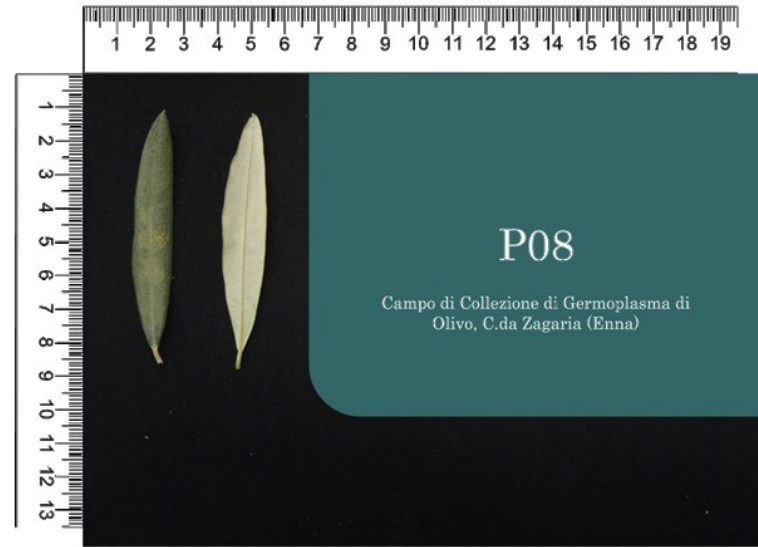
P08

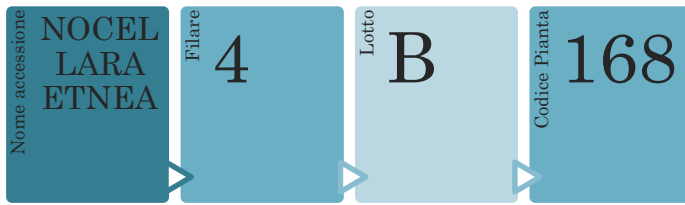
NOCELLARA ETNEA

Nome accessione	P07	Filare	4	Lotto	A	Codice Pianta	157
-----------------	-----	--------	---	-------	---	---------------	-----



Nome accessione P08	Filare 4	Lotto A	Codice Pianta 164
-------------------------------	--------------------	-------------------	-----------------------------





TAVOLE POMOLOGICHE POPOLAZIONE CLONALE

'TONDA IBLEA'

TONDA IBLEA

PII

PVII (1)

PVII (2)

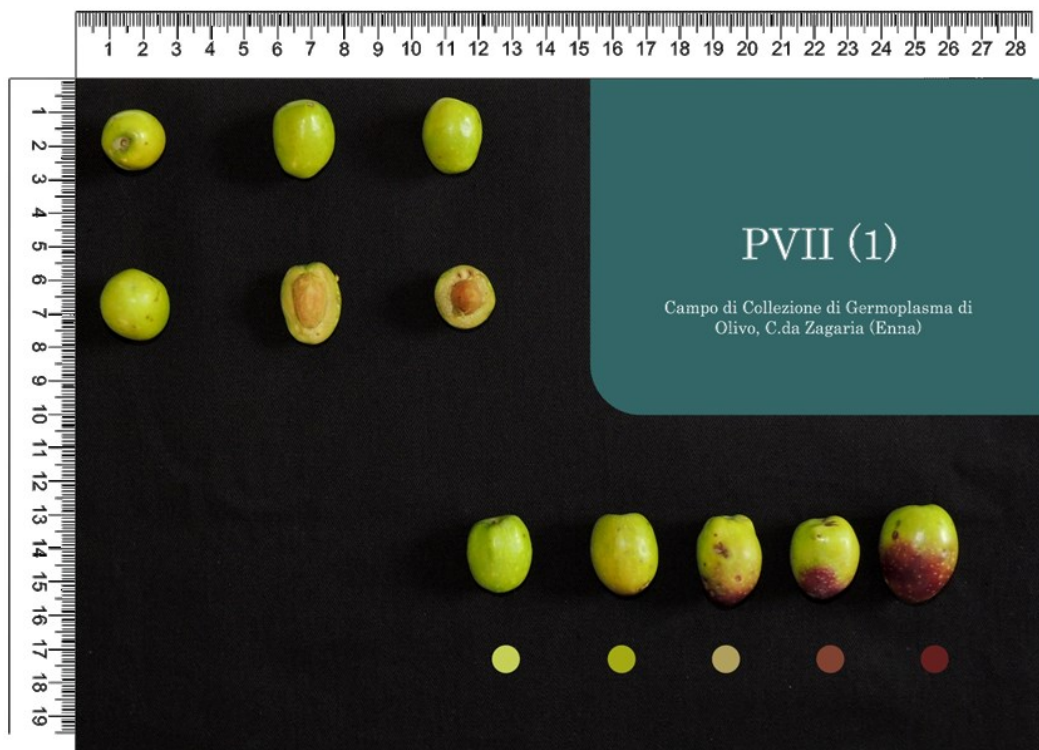
P20

Nome accessione TONDA IBLEA	Filare 4	Lotto B	Codice Pianta 148
---	--------------------	-------------------	-----------------------------

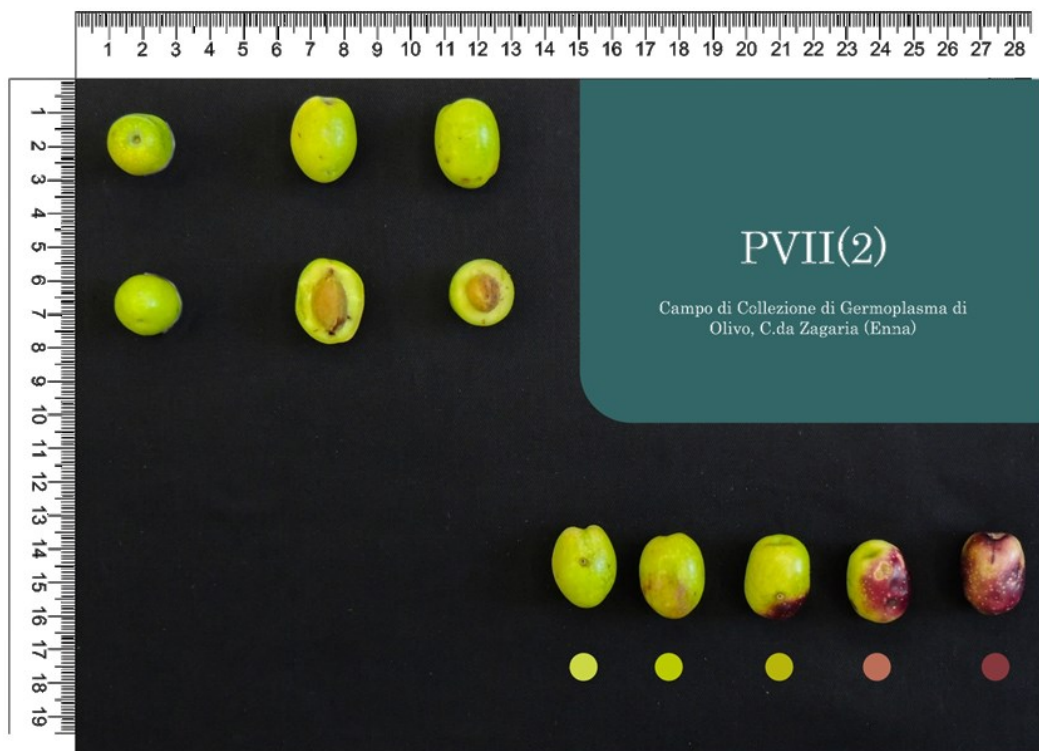


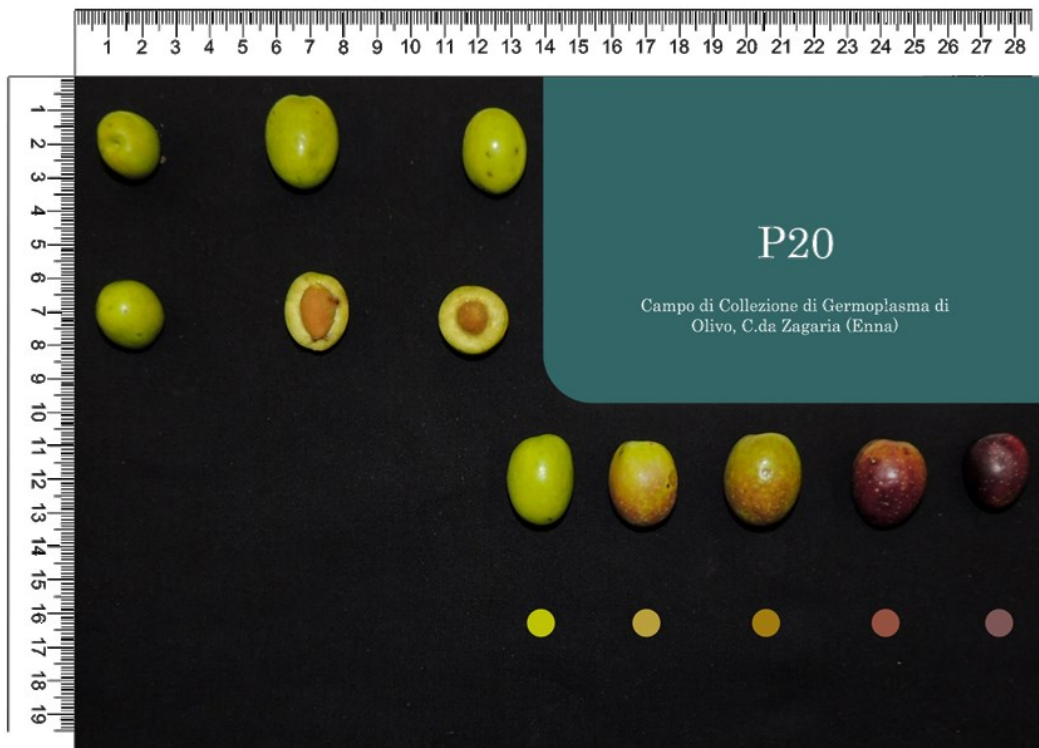
Nome accessione	PII	Filare	5	Lotto	A	Codice Pianta	177
-----------------	-----	--------	---	-------	---	---------------	-----





Nome accessione **PVII (2)** Filare **5** Lotto **A** Codice Pianta **181**





TAVOLE POMOLOGICHE POPOLAZIONE CLONALE

‘ALTRE CULTIVAR’

MARMORINA

MORESCA

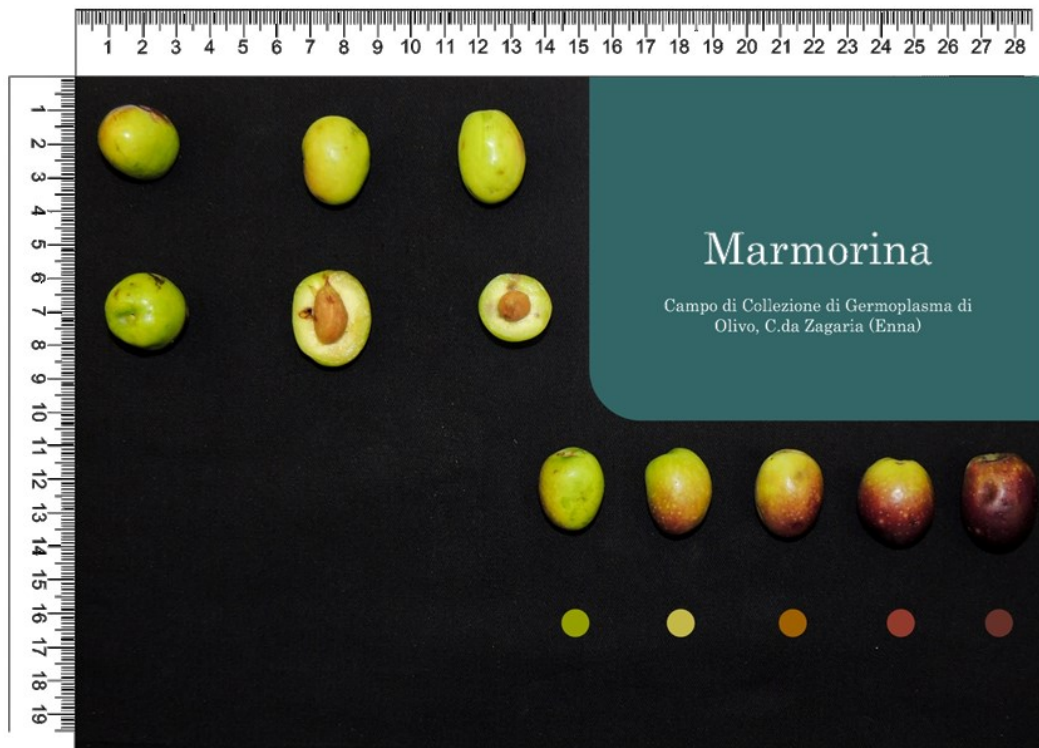
ZAITUNA

P35

P36

P37

Nome accessione MARMORINA	Filare 3	Lotto B	Codice Pianta 83
-------------------------------------	--------------------	-------------------	----------------------------



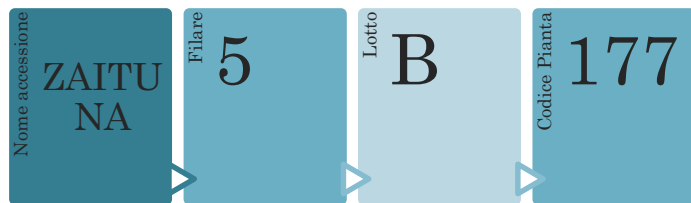
Nome accessione **MORE
SCA**

Filiare **4**

Lotto **A**

Codice Pianta **139**

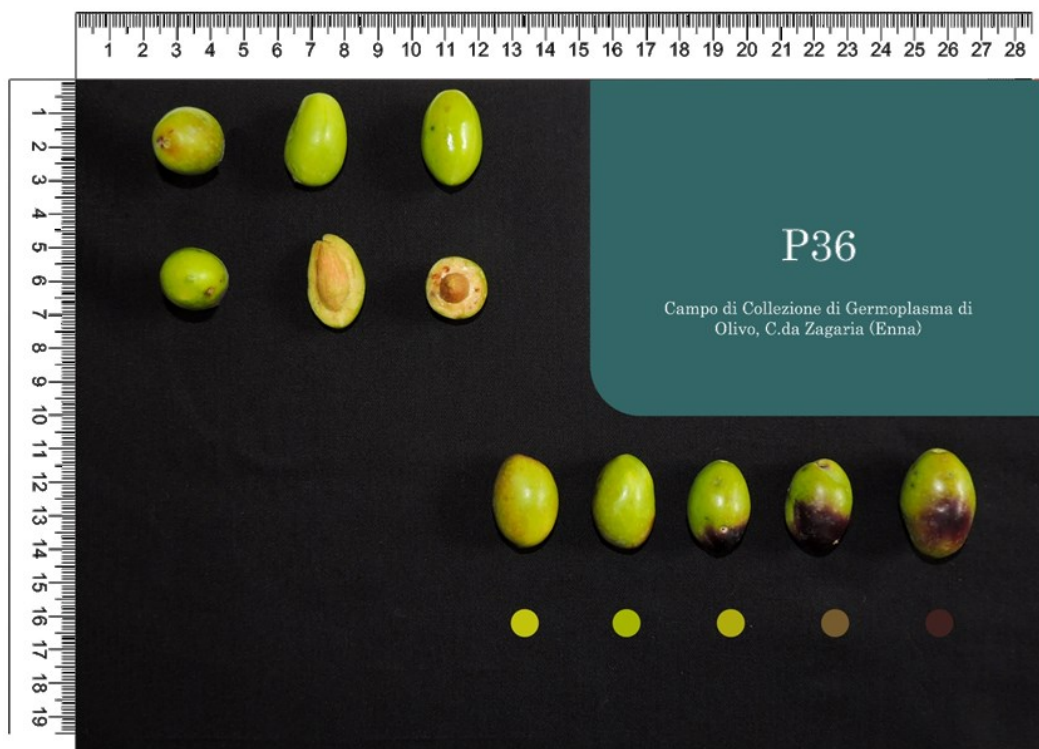




Nome accessione P35	Filare 5	Lotta A	Codice Pianta 193
-------------------------------	--------------------	-------------------	-----------------------------



Nome accessione	P36	Filiare	5	Lotto	A	Codice Pianta	197
-----------------	-----	---------	---	-------	---	---------------	-----



Nome accessione **P37** Filare **5** Lotto **A** Codice Pianta **204**



