

---

**STUDIO DELLA DIVERSITA'  
GENETICA IN OLIVO (*Olea europea* L.)**

---

**Annalisa Imperato**

Dottorato in Scienze Biotecnologiche XXIII ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II





Dottorato in Scienze Biotecnologiche XXIII ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II



---

**STUDIO DELLA DIVERSITA'  
GENETICA IN OLIVO (*Olea europea* L.)**

---

**Annalisa Imperato**

Dottoranda: Annalisa Imperato

Relatore: Prof. Rosa Rao

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

*A mio Nonno Tony*



<b>1. RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
<b>3.1 L'olivo</b>	<b>7</b>
3.1.1 Cenni botanici	7
3.1.2 Cenni sulla origine	7
3.1.3 Il germoplasma di olivo: diffusione ed utilizzo in Italia	8
<b>3.2 I microsatelliti in olivo</b>	<b>9</b>
3.2.1. Campi di applicazione dei marcatori del DNA in olivo	10
<b>3.3 Tracciabilità molecolare degli oli di oliva</b>	<b>11</b>
<b>3.4 L'importanza degli oli monovarietali in Italia</b>	<b>13</b>
<b>3.5 Conservazione delle risorse genetiche vegetali e <i>core collection</i></b>	<b>14</b>
<b>3.6 L'Olivo ed i suoi principali agenti patogeni: implicazioni per la definizione di una <i>core collection</i></b>	<b>17</b>
<b>3.7 La mosca dell'olivo (<i>Bactrocera oleae</i>)</b>	<b>19</b>
<b>3. 8 La difesa dell'olivo all'attacco della mosca</b>	<b>21</b>
<b>3.9 Scopo della tesi</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Materiale vegetale</b>	<b>24</b>
4.1.1 Germoplasma di olivo italiano	24
4.1.2 Materiali della <i>Core collection</i>	25
4.1.3 Drupe per l'analisi differenziale dell' espressione genica	25
4.1.4 Oli monovarietali	25
<b>4.2 Estrazione del DNA</b>	<b>25</b>
4.2.1 Estrazione del DNA da foglia e da drupa	25

4.2.2 Estrazione del DNA da olio	26
<b>4.3 Analisi SSR</b>	<b>26</b>
4.3.1 Amplificazione dei loci SSR	26
4.3.2 Elettroforesi capillare dei prodotti di amplificazione SSR	27
4.3.4 Analisi dei dati	28
<b>4.4 Metodi usati per la costruzione di <i>core subset</i></b>	<b>28</b>
<b>4.5 Differenti distanze genetiche ed indici di diversità analizzati</b>	<b>29</b>
<b>4.6 Analisi statistica</b>	<b>30</b>
<b>4.7 Real time PCR per l'identificazione dei principali patogeni in olivo</b>	<b>30</b>
<b>4.8 Analisi di similarità e annotazione funzionale</b>	<b>32</b>
<b>4.9 Analisi di espressione differenziale mediante Real Time PCR</b>	<b>33</b>
4.9.1 Sintesi del primo filamento di cDNA	33
4.9.2 Trattamento dell'RNA estratto con DNaseI	33
4.9.3 Retrotrascrizione dell'mRNA	33
4.9.4 PCR	34
4.9.5 Real Time PCR (qRT-PCR)	34
<b>4.10 Amplificazione rapida delle estremità di cDNA (3' e 5' RACE)</b>	<b>37</b>
<b>4.11 Clonaggio nel vettoreTA e isolamento del DNA plasmidico</b>	<b>37</b>
<b>4.12 Sequenziamento dei plasmidi ricombinanti</b>	<b>38</b>
<b>5. RISULTATI</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Studio della diversità genetica delle varietà di olivo del Sud Italia mediante l'uso dei marcatori molecolari SSR</b>	<b>39</b>
5.1.1 Quantificazione ed Amplificazione del DNA estratto da foglia	39
5.1.2 Analisi dei profili SSR mediante elettroforesi capillare	40
5.1.3 Analisi della diversità genetica delle varietà di olivo dell' Italia meridionale	41

5.1.4 Tracciabilità genetica di olio d'oliva monovarietale	44
<b>5.2 Costruzione di <i>core subset</i> in olivo mediante l'uso dei marcatori molecolari SSR</b>	<b>45</b>
5.2.1 Comparazione dei <i>core subset</i> costruiti con l'intera collezione e valutazione delle distinte strategie usate	46
5.2.2 Identificazione dei principali patogeni in olivo mediante analisi qualitativa Real Time PCR	51
<b>5.3 Analisi di espressione di sequenze EST diversamente espresse in olivo in risposta all'attacco della mosca <i>B. oleae</i></b>	<b>55</b>
5.3.1 Analisi dei trascritti differenziali	55
5.3.2 Annotazione funzionale ed analisi dei trascritti diversamente espressi	57
5.3.3 Analisi quantitativa mediante Real Time PCR del livello di espressione differenziale delle sequenze EST selezionate	60
5.3.4 RACE PCR di due geni putativamente coinvolti nel meccanismo di difesa dell'olivo alla mosca: Chitinasi ed una Proteina correlata alla patogenesi (PR27)	66
<b>6. DISCUSSIONI</b>	<b>68</b>
<b>6.1 Studio della diversità genetica delle cultivar di olivo meridionali e tracciabilità genetica dell'olio di oliva monovarietale</b>	<b>68</b>
<b>6.2 Costruzione di <i>core subset</i> per la conservazione della diversità genetica in olivo (<i>Olea europea</i> L.), mediante l'uso dei marcatori molecolari SSR.</b>	<b>72</b>
<b>6.3 Studio di espressione di putativi trascritti coinvolti nel meccanismo di resistenza/suscettibilità dell'olivo alla mosca (<i>B. oleae</i>).</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSIONI</b>	<b>81</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>82</b>



## 1. RIASSUNTO

L'olivo (*Olea europea* L.) è un importante specie arborea da frutto in Italia e nei paesi del Bacino del Mediterraneo, caratterizzata da un ampio germoplasma che include numerose varietà diffuse in tutte le aree di coltivazione del Mediterraneo. Tra i vari marcatori molecolari disponibili per gli studi di variabilità in olivo, gli SSR (*Simple Sequence Repeats*) sono i più interessanti per l'identificazione varietale, poiché sono di tipo codominante, altamente informativi e riproducibili.

Lo scopo principale della seguente attività del presente lavoro di tesi, è stato quello di valutare la variabilità genetica mediante caratterizzazione molecolare con sei marcatori SSR delle varietà di olivo del germoplasma olivicolo meridionale e campano. Inoltre, i profili distintivi ottenuti sono stati studiati anche nell'ambito della tracciabilità di filiera olivo-olio. Sono state analizzate 26 importanti cultivar di olivo della regione Campania e 21 delle regioni limitrofe. Sono stati individuati un totale di 81 differenti alleli ottenendo un alto valore medio sia dell'eterozigosità osservata che del potere discriminante. Tutte le cultivar hanno fornito un profilo unico, fatta eccezione di due cultivar 'Uova di Pavone' e 'Sant'Agostino', che potrebbero pertanto rappresentare un possibile caso di sononimia. Le relazioni filogenetiche fra le varietà analizzate sono state studiate mediante l'analisi di raggruppamento per mezzo dell'algoritmo UPGMA, da cui è emerso che la maggior parte delle accessioni campane sono geneticamente differenti da quelle delle aree geografiche vicine. È stato inoltre analizzato il DNA isolato da frutti ed oli monovarietal di tre cultivar. Dal confronto dei profili genetici SSR ottenuti è emerso che essi sono un valido strumento per la tracciabilità di filiera olivo-olio, sebbene ci siano ancora degli aspetti da chiarire legati alla sensibilità del metodo di analisi ed alla sua capacità di identificare le varietà anche in miscele di oli complesse. I risultati ottenuti sottolineano la ricchezza e la specificità delle risorse genetiche dell'olivo in Campania, fornendo preziose informazioni per la protezione dei materiali genetici e degli oli monovarietal.

In virtù della sempre maggior attenzione che viene oggi rivolta alla biodiversità delle specie coltivate, sono state sviluppate diverse collezioni *ex-situ* di germoplasma olivicolo, per preservare e promuovere l'utilizzazione delle risorse genetiche in agricoltura. La gestione, la valutazione e l'uso di ampie collezioni di germoplasma risulta essere inefficiente a causa dell'elevato numero dei genotipi ed all'impossibilità di analizzare nel dettaglio tutte le accessioni conservate. La costruzione di un *core subset*, fornisce un valido aiuto per lo studio, la caratterizzazione e l'uso delle risorse genetiche delle collezioni di germoplasma. A partire da dati di marcatori molecolari SSR, per conservare la diversità genetica della banca del germoplasma di olivo mondiale (BGMO) di Cordoba, sono stati costruiti e valutati cinque *core subset* di dimensioni distinte, attraverso l'uso di tre differenti algoritmi. Tali analisi rappresentano un passo importante verso la costruzione di una *core collection* in olivo. Dai risultati ottenuti evince che occorrono 133 e 151 individui rispettivamente, per rappresentare la diversità dell'intera collezione iniziale e per contenere tutti gli alleli maggiormente frequenti.

Un requisito fondamentale per l'utilizzo e la conservazione del germoplasma di olivo è, non solo una accurata caratterizzazione genetica, ma anche una attenta valutazione dello stato sanitario delle piante. È importante disporre di materiale di propagazione vivaistico qualificato e rispondente alle norme sanitarie vigenti, che impongono che per le giovani piante di olivo sia garantita la rispondenza genetica e

l'assenza dalle malattie causate dai principali patogeni e virus. Per questo motivo, accessioni della BGMO sono state analizzate con tecniche molecolari per individuare la presenza 40 agenti patogeni e 3 virali in 43 piante di olivo.

Infine, tra i principali stress biotici dell'olivo, si annovera la mosca *Bactrocera oleae*. Per identificare e caratterizzare geni diversamente espressi in risposta alla mosca, è stata costruita una libreria sottrattiva mediante la metodica SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*). Tra i 590 cloni della libreria, ne sono stati sequenziati 219 aventi un inserto di dimensioni maggiori di 200 bp. Le sequenze dei trascritti sono state annotate funzionalmente in accordo con il consorzio Gene Ontology. La validazione dell'espressione differenziale dei trascritti funzionalmente più interessanti è stata eseguita mediante Real-Time PCR. Per ottenere la sequenza completa dei trascritti dei geni indotti dall'attacco della mosca, è stata eseguita la RACE-PCR. Data la scarsa conoscenza sulle basi molecolari delle risposte di difesa dell'olivo, tale studio ha permesso di identificare i primi geni di olivo omologhi a quelli notoriamente coinvolti nella difesa delle piante contro insetti e funghi fitofagi.

## 2. SUMMARY

The olive (*Olea europaea* L.), is one of the most important cultivated tree in Italy and all around the eastern Mediterranean Basin. This species is characterized by a germplasm that includes a huge number of varieties, spread in different areas. Among the molecular markers available to study genetic variability in olive, Simple Sequence Repeats (SSRs) are among the most interesting for varietal identification, because they are codominant, informative and reproducible.

In most of the collections varietal identification hasn't been completed and really few agronomic feature have been methodically estimated. Cases of synonymy and homonymy are still very common, often because of mistakes in name transcription of a particular variety (Rao *et al.*, 2009). Nevertheless at present for the olive we have available some methods, whose complementary use allow us a correct identification of cultivated vegetal material. Among several molecular markers used in olive, the microsatellites (SSR) are considered the markers by excellence, thanks to their codominant nature and to their discriminant capability and their being reproducible different labs.

The main aim of the present thesis was to evaluate the genetic variability of olive varieties cultivated in Southern Italy using SSR markers. Twenty-six olive cultivars from Campania and twenty-one of nearby areas were analysed at six SSR loci. Campania is a region characterised by a morphologically diverse varieties able of producing selected and typical oils. The SSR loci were chosen from the literature for their high discriminating power and for their capability of supplying a high number of alleles. All SSR primer couples provided a clear amplification profile and turned out to be polymorphic in the population analysed. The two loci with the highest discriminating power were the DCA 3 and the DCA 16, in accordance with what had been reported in literature (Alba *et al.*, 2009). High values of genetic diversity ( $H_e$ ) and of discriminating power ( $D$ ) were found in most of the SSR loci used, pointing out a high polymorphism among the olive cultivars analysed. A total of 81 different alleles were found, and both the mean heterozygosity and the discriminating power were on average high. All the cultivars had a unique profile, with the exception of the 'Uova di Pavone' and 'Sant' Agostino' cultivars. These genotypes should be further analysed to define if they are a case of possible synonymy. The genetic relations among the examined varieties were studied through hierarchical analysis by UPGMA algorithm. The dendrogram indicated that most of the accessions from Campania are genetically different from those from neighbouring areas. The possible usefulness of the identified SSR profiles in the agro-food chain was also investigated. The DNA isolated from leaves, fruits or mono-varietal olive oils of three cultivars ('Frantoio', 'Pisciottana' and 'Leccino') was isolated and analysed with the six SSR primer pairs. The result indicated that SSR profile are conserved in the olive-food chain and therefore, SSR profiling is a valid tool for olive oil chain genetic traceability. However, some issues such as the sensitivity of the method and its ability of identifying varieties in complex mixtures, still need to be further investigated. The results of the genetic fingerprint of the here analysed cultivars underlined the richness and the possible specific nature of the olive from Campania. The SSRs' profiles gave us valuable information that can be use to protect both the genetic material and mono-varietal oils. Furthermore, the data confirmed the genetic richness of regional germplasm, implying the necessity of measures to protect neglected traditional varieties. Our results pointed out that it's possible to identify DNA from two olive cultivars in a 1:1 DNA mixture, while it's not possibile when DNA of each cultivar,

which makes the blend, has a proportion lower than 50% , as demonstrated from previous literature (Breton *et al.*, 2004). Although we should still check any problems connected with sensitivity and efficacy of method that is used for identification of varietal composition even in more complex oil blends, we can however state that DNA markers through PCR technology are a valid tool for assuring genetic traceability in any stage of the olive oil chain, their correspondence to DOP and IGP labels, and at last finished product quality, guaranteeing farmers, producers and consumers and even preventing them from any frauds.

Thanks to increasing attention to the protection biodiversity, several olive germplasm *ex-situ* collections were developed to safeguard and to promote the use of genetic resources in farming. Management, evaluation and use of wide germplasm collections can be inefficient, mainly because the high number of genotypes present in collection and the unfeasibility of analysing with sufficient details all the accessions conserved. The establishment of a core set is a valid help for assessing, characterizing, and using a germplasm collections.

Using SSR molecular markers data already available, five different core subset were built and evaluated using three different algorithms. This analysis was carried out on the World Olive Germplasm Bank (WOGB) of Cordoba. Among the six different strategies used for construction of five core subsets, only the sampling strategy based on Core Hunter algorithm, which simultaneously maximizes two genetic measures (the average modified Rogers's distance and Nei's index) allowed to get the highest values of genetic parameters considered. This is in agreement with what literature reported (Thachuk *et al.*, 2009). 133 and 151 genotypes were necessary to capture 99% of 236 alleles of the whole initial collection.

A basic requirement for the use and preservation of olive germplasm is not only a careful genetic characterization, but also an accurate evaluation of plants sanitary conditions. It is essential to have a qualified nursery propagation equipment, in conformity with sanitary regulations that impose the genetic correspondence to a defined genotype as well as lack of those diseases, caused by pathogens and viruses, in young olive plants. For this reason, 174 WOGB accessions were analysed by molecular techniques to screen for the presence of 40 pathogens and 3 viruses.

The olive fly *Bactrocera oleae* (Rossi) is the key pest of cultivated olive in the Mediterranean Basin. Infestation caused by the olive fruit fly caused direct and indirect damages. The direct damages are caused by active infestation, which consists in the destruction of the pulp and as consequence, premature fruit drop. Furthermore, the fly also causes an alteration of olive oil's qualitative parameters. The indirect damages are due to fungal and bacterial infestations, which start at the egg position and spread with the larval feeding tunnels. The control of olive fruit fly is essentially pursued by pesticide treatments, which are costly and have negative impact on the environment or human health. Alternative control methods are mass trapping, barrier films, combined treatments as mass trapping and application of kaolin clay or biological control. However such methods are not always effective as desired. The availability of olive cultivars with low susceptibility to the fly could represent an important tool in strategies of integrated management of the *B. oleae*.

It is known that morphological, physical, and chemical parameters, in addition to environmental conditions, are involved in the level of susceptibility of olive cultivars to fruit fly attacks. For example, some low susceptible olive cultivars have higher quantities of oleuropeine or cyanidine compounds (Iannotta *et al.*, 1999). It was proposed that the degree of cultivars susceptibility to fly infestation depends on the ability of the  $\beta$ -glucosidase enzyme to cleave oleuropeine and/or on the availability of

oleuropeine to undergo the cleavage (Iannotta et al., 2007). On the contrary no information is available on the defence genes active against *B. oleae* and on the molecular response of olive fruits to the fly infestation. It is known, that the molecular interaction between plants and herbivores originates both up and down regulation of a large number of genes encoding proteins involved in defense mechanisms and signaling, secondary metabolism, abiotic stress and photosynthesis, beside many genes with unknown functions. (Hermsmeier et al., 2001). Therefore, the study of the variation of the transcripts abundance occurring in infested olive fruit tissue, will provide novel information on olive sequences responding to *B. oleae* infestation and on their involvement in defence. In this frame an useful experimental approach, is the SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) technique. We used this strategy in order to isolate differentially expressed olive sequences occurring in infested tissue. In addition, we monitored the expression of up-regulated genes in different olive cultivars.

For characterization of differential expressed genes in reaction to the fruit fly, a subtractive library was constructed through Suppression Subtractive Hybridization (SSH) method. The library was constructed subtracting mRNAs from un-attacked fruits of cultivar 'Moraiolo' from mRNAs isolated from with larval feeding tunnel. Among the 590 clones of the library, 219 were sequenced, having an insert size longer than 200 bp. In order to assign a putative function to the different transcripts, similarity analysis was carried out with tblastx algorithm. Approximately 70% of transcripts showed a significant similarity with coding sequences of different plant species (e-value <0.001) mainly *Vitis vinifera*; among them 113 sequences had similarity with transcripts coding for known protein and 106 with transcripts coding for unknown protein. Only 48% of the ESTs were classified into functional category (Biological process, Molecular Function, Cellular component) most likely as consequence of the very little information available on olive genome.

The molecular functions of EST sequences, underline the complexity of olive molecular response to the fruit fly.

The differential expression validation of the most interesting transcripts was performed by Real time PCR. Eight transcripts putatively involved in defence mechanisms, turned out to be overexpressed in olive fruits infested through larval feeding tunnel. Four transcripts showed a weak overexpression level, with RQ values variable from 1,29 to 2,28. Nevertheless differences in expression turned out to be statistically significant, when t-student test was performed. The transcripts most overexpressed in drupes with larval feeding tunnel, with RQ from 2,3 to 8,7, were similar to those coding a protein related to pathogenesis (Oe-PR27), to a lipoxygenase (Oe-LOX) and to a chitinase (Oe-Chitinase). We thought to evaluate the relative expression of the latter transcripts also in a different olive variety ('Leccino') and at two different stages (drupes with sign of oviposition stings and drupes with larval feeding tunnel). The overexpression of the three transcripts in the two attack biological stages was confirmed. Finally, in order to get the complete transcripts sequence RACE-PCR experiments were conducted. Two full length cDNA (Oe-Chitinase and Oe-PR27) were recovered by the 3' and 5' RACE-PCR. The amino acid sequences coded by these two genes was of 229 aa and 268 aa respectively.

Our data demonstrated that the molecular response of olives drupes to *B. oleae* infestation is complex and involves numerous molecular functions. As expected, this molecular response implicates alterations of primary and secondary metabolism. We identified three genes that are up-regulated in infested olive fruits. Homologues of the

identified sequences are involved in the molecular response of plant to biotic stress in different species. It will be interesting to verify if the expression profiles of the EST sequences generated in this study are associated to different level of susceptibility of olive cultivars to *B. Oleae*.

### 3. INTRODUZIONE

#### 3.1 L'olivo

##### 3.1.1 Cenni botanici

L'olivo (*Olea europaea* L.), appartenente alla famiglia delle *Oleaceae*, sottofamiglia *oleideae*, subgenus *Olea*, sezione *Olea*. Tale famiglia include numerose sottospecie con tratti morfologici e origini geografiche differenti, accomunate dal fatto che la maggior parte delle varietà sono autoincompatibili e propagate vegetativamente. Delle sei sottospecie che sono state descritte, due mostrano un'ampia distribuzione: subsp. *europaea*, presente nei paesi del bacino del Mediterraneo, e la subsp. *cuspidata*, che si è diffusa dall'Australia (Bass *et al.*, 2006) ed è presente principalmente nell'Asia Orientale, Medio Oriente, ed Africa meridionale ed orientale. Questi taxa sono diploidi, allogami e anemofili; i loro semi sono dispersi tramite i mammiferi (su brevi distanze) e gli uccelli (su lunghe distanze) (Green, 2002). Le olive commerciali sono prodotte dalla subsp. *europaea*, difatti solo tale specie produce frutti eduli per l'uomo. Per l'olivo coltivato si ritiene che, sin dall'inizio della sua domesticazione, il vettore principale sia stato l'uomo, rendendo per questo motivo difficile poter tracciare dei chiari percorsi di diffusione (Breton, 2005). La sottospecie *europaea* è di grande importanza economica nel Mediterraneo, dove è infatti concentrato il 95% della produzione mondiale di olio. La sottospecie *cuspidata* non ha una rilevante importanza economica, anche se, ad esempio in Cina, è coltivata a scopo ornamentale (Muzzalupo e Perri 2008).

##### 3.1.2 Cenni sulla origine

L'unico aspetto certo della storia dell'olivo è che esso è una delle più antiche piante arboree coltivate, probabilmente tra le prime domestiche insieme al fico ed alla vite. Classicamente si ritiene che la sua coltivazione sia iniziata nel Medio Oriente e nelle aree orientali del bacino del Mediterraneo, da dove, attraverso l'azione dell'uomo, le migrazioni e gli scambi commerciali si è poi diffusa in altre regioni limitrofe dal clima temperato (Zohary e Spiegel-Roy, 1975). Un ruolo importante in tale processo lo ha avuto la diffusione della cultura ellenica e successivamente di quella romana. Sebbene si ritiene che oleastri fossero già presenti ad esempio in Francia, Spagna ed Italia, è probabile che i Greci, insieme a nuovi metodi di coltivazione e di produzione dell'olio, abbiano esportato, contemporaneamente alla diffusione della "cultura dell'olio", anche dei materiali vegetali.

Il processo di domesticazione dell'olivo è ancora soggetto a dibattiti. Accanto alla ipotesi classica di domesticazione singola e successiva diffusione, è presente in letteratura l'ipotesi che l'olivo abbia avuto diversi centri di origine. Specificatamente, marcatori citoplasmatici hanno indicato che l'oleastro è sopravvissuto all'ultima glaciazione (circa 20.000 anni fa) in undici rifugi distribuiti nelle aree mediterranee occidentali, centrali ed orientali (Breton, 2006), che hanno costituito il serbatoio principale per la sua successiva domesticazione/coltivazione. Sebbene oggi si favorisce l'ipotesi che le cultivar di olivo derivino da più forme ancestrali, è stato anche osservato che circa la metà delle varietà di olivo in realtà derivino dall'incrocio di due o più "lineage" (Hannachi *et al.*, 2008), rendendo le ricostruzioni evolutive ricche di spunti di dibattito. La filogenia dell'olivo è tuttora incompleta anche perché le evidenze paleobotaniche non sono spesso sufficienti a distinguere i diversi taxa,

probabilmente a causa della similarità (e dei possibili incroci) tra varietà coltivate e quelle selvatiche (Breton, 2005). Ad ogni modo, si ritiene oggi che la teoria dell'origine dell'olivo nella Mezzaluna Fertile a partire dalla subsp. *cuspidata* non sia ben supportata dai dati molecolari. Tali dati favoriscono l'ipotesi che l'olivo o gli olivi coltivati si siano originati a partire dall'oleastro (subsp. *europaea*) presente in diverse aree del bacino del Mediterraneo (Breton, 2005).

### 3.1.3 Il germoplasma di olivo: diffusione ed utilizzo in Italia

Il database del germoplasma di olivo mondiale (<http://www.oleadb.it/>), contiene informazioni su migliaia di accessioni (5435) conservate in 103 differenti collezioni. Questa banca dati è stata inizialmente sviluppata a partire dal 1988 come "Olive Germplasm: Cultivars and World-Wide Collections" dall'Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree – Consiglio Nazionale delle Ricerche, reso pubblico grazie al servizio "Seed and Plant Genetic Resources Service" della FAO. L'ultima edizione web del 2008, include dati ricavati da 1520 pubblicazioni che si riferiscono a circa 1250 cultivar presenti in 54 paesi. Circa i due terzi delle varietà sono presenti nei paesi del sud Europa. Non tutte le accessioni presenti nel database sono ricondotte ad una varietà. Infatti, la caratterizzazione del germoplasma di olivo è complicato non solo a causa dell'assenza di riferimenti universalmente accettati, ma anche per la presenza di numerosi casi di sinonimia o omonimia (Bartolini *et al.*, 2005).

L'area di coltivazione a livello mondiale dell'olivo si è triplicata negli ultimi 44 anni, passando da 2,6 a 8,5 milioni di ettari (Bartolini *et al.*, 2005). Ciò è dovuto principalmente al riconoscimento del valore nutrizionale dei suoi prodotti derivati, ma anche alla tolleranza che l'olivo mostra alla salinità ed alla siccità. Rispetto alla sua ampia espansione, la diversità intra-specifica dell'olivo è minacciata da diversi fattori che includono, ad esempio, gli stress biotici e abiotici, l'urbanizzazione, lo sviluppo di metodi di coltivazione intensivi, quali quelli ad alta densità (Muzzalupo e Perri 2009).

Le collezioni *ex-situ* di germoplasma sono uno strumento per migliorare, caratterizzare e salvaguardare il germoplasma di una specie vegetale. Tali collezioni sono particolarmente utili per quelle specie coltivate come l'olivo, che sono soggette ad una forte spinta modernizzatrice, sono propagate vegetativamente e posseggono una variabilità genetica molto ampia ma non ancora totalmente esplorata. Le collezioni di germoplasma di olivo internazionali sono situate e promosse in diversi paesi del Mediterraneo, quali la Spagna (Cordoba) e l'Italia (Rende, CS). Una delle collezioni più antiche è la banca del germoplasma mondiale di olivo (BGMO), allestita nel 1971 a Cordoba. Attualmente il campo collezione di Cordoba, conserva più di 500 differenti genotipi provenienti da 19 continenti, dei quali più di 400 sono stati caratterizzati mediante marcatori morfologici e molecolari. Per promuovere l'interazione tra le diverse collezioni *ex-situ*, nel 1994 la *International Olive Oil Council* (IOOC) ha promosso un Network di Banche di Germoplasma di olivo nei principali Paesi del Mediterraneo.

Secondo le statistiche della FAO ([faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)) in Italia nel 2009 l'olivo è stato coltivato su 1159000 ha. Sono quasi 20 anni che l'Italia ha perso il primato a livello mondiale ed attualmente risulta terza per area di coltivazione nel mondo dopo Spagna (2500000 ha) e Tunisia (2300000 ha). Il nostro Paese, con una produzione annua di 3600500 tonnellate di olive è secondo nel mondo, dopo la Spagna (6204700 ton). La resa della produzione, intesa come prodotto per pianta o per ettaro, pone l'Italia in una posizione migliore rispetto alla Spagna, il concorrente



commerciale più importante presente nell'ambito della Unione Europea. Nella nostra nazione, le produzioni unitarie più elevate, per pianta e per ettaro di oliveto, si hanno in Calabria ed in Puglia, mentre quelle più basse si registrano nel settentrione e nelle zone interne del centro e Sud Italia (fasce pre-appenniniche). Il 98% di tutta la produzione è, destinato all'estrazione dell'olio con un ricavo medio di 600.000 tonnellate. La restante piccola parte, circa 60.000-70.000 tonnellate a seconda delle annate, viene commercializzata come olive da mensa, fresche o trasformate.

La regione Campania, così come il Sud Italia, vanta una lunga tradizione di coltivazione dell'olivo, che vede rientrare la Campania nelle regioni meridionali italiane maggiormente importanti per la produzione di olio di oliva. Attualmente, però, la produzione di olio di oliva è ancora basata sull'uso di varietà locali coltivate in piccole aziende. Per salvaguardare le economie locali e le produzioni tipiche legate al territorio ed ai materiali genetici autoctoni, in Campania sono state approvati quattro disciplinari per la produzione di olio DOP (Olio extravergine di oliva Cilento, Colline Salernitane, Irpinia - Colline dell'Ufita, e Penisola Sorrentina) ed altri due sono in via di approvazione.

### 3.2 I microsatelliti in olivo

Tra i diversi marcatori del DNA attualmente disponibili, in olivo da diversi anni si ricorre con grande successo e continua diffusione, all'uso dell'analisi di regioni microsatellitari del genoma vegetale, mediante amplificazioni PCR e successiva separazione elettroforetica in matrici ad alta risoluzione (Rallo *et al.*, 2000). I microsatelliti (o *Simple Sequence Repeats*, SSR) sono brevi sequenze di DNA, lunghe da 1 a 6 basi ripetute un numero variabile di volte. L'insieme delle ripetizioni rappresentano il "core" del microsatellite. Tale sequenza è compresa fra due regioni oligonucleotidiche note, che prendono il nome di zone *flanking* del microsatellite. Il core di un microsatellite è, dal punto di vista genetico, piuttosto instabile se paragonato ad altre sequenze del genoma nucleare e per questo motivo gli SSR sono considerati delle sequenze ipervariabili. Gli SSR si formano per il fenomeno dello *slippage*, scivolamento di un filamento di DNA rispetto all'altro, causato dalla DNA polimerasi durante la fase di replicazione del DNA (Schlotterer, 2000). Tale errore consiste nell'aggiunta del motivo ripetuto su di uno dei cromosomi omologhi. In questo modo si formano diversi alleli, che differiscono per il numero di ripetizioni del motivo di base. Tale polimorfismo viene rivelato come differenze nella lunghezza del frammento amplificato con primer disegnati sulle sequenze *flanking*.

I microsatelliti disponibili per le analisi varietali di olivo sono ca 77: 15 *ssrOeUA-DCA* (Sefc *et al.*, 2000), 5 *IAS-oli* (Rallo *et al.*, 2000), 20 *GAPU* (Carriero *et al.*, 2002), 30 *UDO* (Cipriani *et al.*, 2002), ed infine 7 *EMO* (De La Rosa *et al.*, 2002). Questa relativa abbondanza, ha creato la necessità di definire un set comune di marcatori molecolari per rendere confrontabili i dati ottenuti dall'analisi *fingerprint* di diversi laboratori e/o curatori di germoplasma. Ad esempio in campo umano per gli studi forensi, si ricorre ad un set costituito da 13 SSR (Butler, 2007). Fino a pochi anni fa, dai risultati pubblicati sul *fingerprinting* molecolare in olivo emergeva che i set di primer scelti fossero in larga parte diversi fra i distinti laboratori. Nel caso dell'olivo è importante avere a disposizione un database di riferimento contenente i profili delle varietà con un set comune di SSR soprattutto quando l'obiettivo della ricerca è affrontare il problema delle sinonimie e delle omonimie.

La scelta di un buon marcatore SSR dovrebbe basarsi sulle seguenti caratteristiche: elevato potere discriminante, elevato numero di alleli, basse

frequenze dei singoli alleli e assenza di loci monomorfici; amplificazione di un singolo locus ereditato in modo mendeliano; il locus scelto deve, inoltre, segregare in maniera indipendente dagli altri loci SSR del set selezionato; buona riproducibilità nei vari laboratori (alta specificità dei primer, buona amplificabilità, buon segnale, bassa capacità di produrre *stutter bands*, assenza di alleli fantasma) (Testolin *et al.*, 2005).

Nonostante ci sia stato un grande sforzo nell'ultimo decennio per caratterizzare molecolarmente e identificare le varietà di olivo, si ritiene che la maggior parte del patrimonio nazionale deve ancora essere identificato. Inoltre risulta essere ancora non semplice confrontare i dati ottenuti dai diversi laboratori. Diversi gruppi di ricerca hanno già selezionato in olivo alcune decine di microsatelliti polimorfici altamente informativi a livello internazionale (Sefc *et al.* 2000; Rallo *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cirpinai *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002) (Bandelj *et al.*, 2002; Belaj *et al.*, 2004; De la Rosa *et al.*, 2004). La caratterizzazione delle varietà di olivo, soprattutto di quelle italiane, inizialmente non ha potuto contare sul coordinamento dei diversi gruppi di ricerca. Ciò ha sicuramente contribuito a rendere difficile la comparazione dei dati ottenuti in diversi studi, talvolta caratterizzati dalla presenza di duplicazioni o mancata analisi di informazioni su varietà importanti (Baldoni *et al.*, 2005). Per definire un protocollo per lo sviluppo di un set di marcatori molecolari utili alla definizione, caratterizzazione ed identificazione delle cultivar di olivo, in Italia è stato proposto da Baldoni *et al.*, (2009), un set di marcatori SSR comuni a tutti i laboratori che si occupano di caratterizzazione di varietà di olivo. Settantasette loci SSR sono stati valutati per selezionare un sub-set di marcatori, di cui 40 sono stati scartati per il basso polimorfismo e potere discriminante. I rimanenti 37 loci sono stati poi utilizzati da 4 differenti laboratori per testare 21 cultivar di olivo. I parametri di selezione dei 37 marcatori studiati sono stati: la qualità del segnale del picco (forte; medio; debole), il livello di *stuttering* (nessuno o basso *stuttering*), il numero di alleli amplificati, la frequenza di alleli nulli stimata con analisi in silico. Per questi marcatori sono attualmente disponibili dei protocolli per la genotipizzazione e profili allelici per un set di cultivar di riferimento (Baldoni *et al.*, 2009). Tali informazioni sono utili per la costruzione di una banca dati delle varietà di olivo che possa essere consultata non solo per gli studi di carattere conoscitivo ma anche per quelli con chiare ricadute nel settore agroalimentare, come gli studi di tracciabilità degli oli nell'ambito della filiera agro alimentare.

### **3.2.1. Campi di applicazione dei marcatori del DNA in olivo**

Il *fingerprinting* del DNA, ovvero identificare un genotipo sulla base di un profilo genetico ottenuto mediante l'uso di marcatori molecolari, è una tecnica consolidata per studiare l'origine delle varietà coltivate e le loro relazioni genetiche. Tale strumento, inoltre, è di supporto anche per la discriminazione varietale. Nei paesi membri dell'Unione per la Protezione di Nuove Varietà Vegetali (UPOV), la descrizione e la classificazione di una varietà coltivata, sia di specie arboree che di quelle erbacee, si basa su una serie di marcatori morfologici che devono essere valutati secondo delle metodologie definite. Tali descrittori comprendono sia i caratteri morfologici qualitativi (nel caso dell'olivo vi sono la forma della foglia, forma del frutto e dell'endocarpo, etc.), quantitativi (pezzatura della drupa) e caratteri biologici (la resistenza della pianta ad agenti patogeni). I descrittori morfologici sono influenzati dall'ambiente e quindi le analisi devono essere condotte su più annate (di solito due) e nei diversi stadi vegetativi in cui compare il carattere in esame. Per questi motivi i marcatori molecolari si stanno affermando come mezzo più usato e

potente per la certificazione genetica, oltre che per lo studio della filogenesi e per lo studio della variabilità genetica intervarietale in olivo (Baldoni *et al.*, 2005). Le analisi mediante l'uso di marcatori del DNA potrebbero integrare quelle morfologiche rappresentando quindi un vantaggio per i vivaisti ed una garanzia di qualità per i consumatori perché a causa di una certa confusione nelle denominazioni delle cultivar, della variabilità intravarietale e della distribuzione disomogenea sul territorio, risulta ancora oggi difficile l'identificazione certa delle varietà di olivo (Rao *et al.*, 2009).

Applicazioni classiche del *fingerprinting* del DNA di olivo è la stima della diversità genetica, della variabilità all'interno di una collezione (Baldoni *et al.*, 2000; Belaj *et al.*, 2007; Erre *et al.*, 2009; La Mantia *et al.*, 2005) ed il chiarimento di casi di sinonimie ed omonimie (Lopes *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2009). Nonostante il potere discriminante dei marcatori del DNA la risoluzione di tali problematiche non è mai semplice, e richiede un approccio integrato di dati molecolari e morfologici. Intuitivamente è possibile affermare che, la presenza di un diverso profilo allelico ad un dato locus SSR rappresenta una condizione necessaria per poter affermare che due individui siano geneticamente distinti. Però, soprattutto per le specie propagate vegetativamente, una differenza ad un singolo locus non necessariamente implica differenze fenotipiche tali da far supporre che i due genotipi in esame possano essere descritti come varietà coltivate diverse. Allo stesso modo, asserire che due individui siano geneticamente uguali è spesso un'affermazione che richiede cautela. Infatti, una simile affermazione, può essere fatta su base probabilistica, dipendendo sia dal numero dei loci analizzati, che dalla frequenza allelica ai loci scelti all'interno della popolazione a cui i due individui appartengono.

### **3.3 Tracciabilità molecolare degli oli di oliva**

La sicurezza degli alimenti è diventata una priorità per l'Unione Europea, in modo particolare dopo la pubblicazione del Libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare della Commissione Europea, che contiene la nuova struttura legislativa per tutelare la sicurezza dell'intera filiera agro-alimentare. Lo scopo principale è ovviamente quello di difendere e proteggere la salute dei consumatori e controllare che vengano rispettate le responsabilità primarie dei diversi attori coinvolti nella produzione agricola e agroindustriale. Per tali motivi deve essere possibile rintracciare i materiali grezzi impiegati in ciascuna fase e passaggio dell'intera filiera produttiva (Regolamento CE 178/2002).

La genomica alimentare o "food genomics", è la strategia, la cui applicazione consente di reperire negli alimenti frammenti di informazione genetica, così da riconoscere piante, animali o microrganismi usati durante il processo produttivo degli stessi. Uno dei principali obiettivi della genomica alimentare, è quello di mettere a disposizione strumenti validi per verificare la composizione dell'alimento, per ottenere informazioni di natura genetica nell'intera filiera (tracciabilità e rintracciabilità) ed infine, in caso di alimenti fregiati dei marchi DOP o IGP, per stabilire che ci sia rispondenza con quanto riportato in etichetta o con il disciplinare di produzione. Quest'ultimo aspetto appare di notevole interesse per il settore olivicolo. La diversità genetica delle cultivar di olivo è stata protetta e promossa dall'UE mediante la creazione di marchi di qualità (DOP, IGP) di cui alcuni oli d'oliva possono fregiarsi. Tali oli riescono a spuntare prezzi più elevati, perché sono percepiti come superiori dai consumatori. Di conseguenza, è fortemente aumentato l'interesse verso l'uso di

strumenti capaci di controllare e verificare l'identità delle varietà locali e dei rispettivi prodotti processati sia da parte dei produttori che dalle associazioni dei consumatori.

Le fasi che caratterizzano la genomica alimentare sono: i) estrazione del DNA dalla matrice alimentare; ii) analisi dei marcatori molecolari; iii) identificazione dell'ingrediente o del contaminante in base al suo profilo molecolare. Talvolta può essere richiesta anche l'identificazione all'interno dell'alimento di eventuali sostanze tossiche e/o nocive per la salute umana, in questo caso una prima fase di screening può essere effettuata andando a ricercare l'eventuale DNA dell'agente patogeno che produce una tossina, o un frammento di DNA che codifica un allergene, oppure il DNA di una specie vegetale "contaminante" nota per essere un alimento allergenico per alcune individui (Marmioli *et al.*, 2003; Nemedi *et al.*, 2007; Koppel *et al.*, 1998).

i) La *conditio sine qua non* per la riuscita della tracciabilità alimentare, è legata alla possibilità di disporre di DNA di qualità sufficiente ed in quantità che siano adeguate per effettuare le analisi molecolari del caso. Sia la qualità che la quantità del DNA presente negli alimenti, sono fortemente influenzate dal trattamento che l'alimento stesso ha subito durante la sua produzione. Sono infatti diversi i fattori che danneggiano le molecole di DNA in un alimento, e questi fattori sono capaci di denaturare il DNA, frammentarlo e di causare modificazioni chimiche, diminuendone quindi non solo la quantità ma anche le dimensioni. Principalmente, si distinguono fattori di natura fisica (ad esempio le alte temperature, lavorazioni meccaniche) e chimica (ad esempio correttori di acidità) che sono intrinseci con il processo produttivo stesso (Hupfer *et al.*, 1998; Muzzalupo *et al.*, 2007). Un secondo aspetto da considerare è connesso al fatto che in una preparazione alimentare vi sono presenti delle sostanze che possono diminuire la adeguatezza del DNA per le successive analisi molecolari. Ad esempio, i polisaccaridi e composti fenolici dell'olio possono inibire la DNA polimerasi durante l'amplificazione PCR (Muzzalupo *et al.*, 2007). L'olio di oliva non rappresenta un'eccezione per la *food genomics*, anche se i trattamenti fisici (soprattutto quelli termici) sono da considerarsi ridotti rispetto ad altri prodotti. Diversi lavori hanno recentemente indicato che è possibile isolare DNA genomico di qualità ed in quantità sufficienti per analisi molecolari. Per i motivi suddetti, la bassa quantità di DNA isolato implica che le metodiche di analisi dei marcatori del DNA si basino su processi di amplificazione di specifiche sequenze target (Alba *et al.*, 2009; Pasqualone *et al.*, 2004; Doveri *et al.*, 2006; Muzzalupo *et al.*, 2007).

ii) Le analisi del DNA per la tracciabilità, seguono le seguenti fasi: amplificazione di regioni geniche specifiche mediante PCR e rilevamento di frammenti specifici per una specie o varietà vegetale. Diversi sono i marcatori che sono stati impiegati per la tracciabilità genetica di filiera. Essi comprendono SSR (*Simple sequence repeats*) (Rallo *et al.*, 2000), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Angiolillo *et al.*, 1999), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Reale *et al.*, 2006), SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) (Hernandez *et al.*, 2001), tutti marcatori basati sulla reazione a catena della polimerasi. Nel caso in cui la matrice alimentare fosse costituita da più componenti, di cui si vuole conoscere l'identità simultaneamente, bisogna allora o effettuare amplificazioni PCR (simplex in sequenza o multiplex) di più sequenze geniche specifiche identificative dei vari componenti da rilevare oppure utilizzare microarray contenenti centinaia di sequenze specifiche (Germini *et al.*, 2004). Oggi per la quantificazione relativa di specifici componenti si ricorre o alla amplificazione PCR competitiva qualitativa, o ai microarray o alla più diffusa Real Time PCR (Marmioli *et al.*, 2003).

iii) Identificazione dell'ingrediente: l'ingrediente fondamentale da identificare nell'olio di oliva è l'oliva, ovvero nello specifico ci si prefigge di identificare la sua varietà di appartenenza. L'identificazione delle varietà di olivo è fondamentale per gli oli DOP o IGP. In questi casi, per poter garantire il legame con il territorio di provenienza attraverso l'utilizzo di cultivar specifiche della zona geografica (Regolamento CE 2081/92), è richiesto che la composizione dell'olio sia costituita solo da determinate varietà nelle proporzioni prestabilite dal disciplinare di produzione. Inoltre, i marcatori molecolari del DNA sono utili anche per riconoscere nell'olio l'eventuale presenza di altre specie vegetali. La ricerca di una specie diversa dall'olivo nel DNA isolato dall'olio avviene sfruttando i geni presenti solo nella specie vegetale ricercata, ad esempio la lecitina di soia, la zeina del mais, l'allergene Cor del nocciolo o Ara di arachide (Marmioli *et al.*, 2003). In tal modo è possibile quindi scoprire eventuali frodi alimentari che vengono commesse a danno dell'olio di oliva, che può essere tagliato con oli di altre specie vegetali.

In sostanza, attraverso la "food genomics" è possibile verificare quali- e quantitativamente la presenza di specifici ingredienti o contaminanti negli alimenti. Nel caso della filiera produttiva olivo-olio è possibile identificare la varietà a partire dalla pianta in campo, fino al prodotto in ingresso alla filiera (drupa) e a quello in uscita (olio). Per il settore olivicolo italiano, tale aspetto assume particolare rilevanza considerando la crescente diffusione degli oli monovarietali.

### **3.4 L'importanza degli oli monovarietali in Italia**

La produzione di oli DOP ambisce a proporre al consumatore un prodotto dalle caratteristiche organolettiche e sensoriali che siano associati con una particolare zona d'origine. Tale specificità, apprezzata sempre di più dal consumatore, viene similmente esaltata anche con la produzione di oli monovarietali, una strategia di marketing utile per differenziare un prodotto e collocarlo nelle migliori fasce di mercato (Alfei *et al.*, 2007). Gli oli monovarietali, ovvero quelli ottenuti da drupe appartenenti ad un'unica varietà di olivo autoctona, consentono infatti di legare ancora più che per gli oli DOP le produzioni tipiche a determinate aree dell'ambiente. In tale ambito, la descrizione molecolare del genotipo di interesse è necessaria non solo per garantire e certificare l'origine dell'olio monovarietale, ma anche per renderlo identificabile nelle diverse fasi produttive della filiera. I vari marcatori molecolari, quindi, potrebbero essere usati in aggiunta alle analisi sensoriali, che ad oggi rappresentano il solo strumento applicativo capace di evidenziare i parametri di tipicità estrinseca del prodotto. La produzione di oli monovarietali inoltre, potrebbe essere una carta vincente per il settore olivicolo italiano. Quest'ultimo è caratterizzato da un patrimonio genetico molto variegato che consente di proporre sul mercato produzioni differenziate, con una identità genetica e territoriale arricchita di storia, cultura e tradizioni locali. Inoltre, la valorizzazione del germoplasma autoctono permetterebbe non solo di sostenere lo sviluppo di aree marginali, talvolta prive di valide alternative colturali, ma anche di salvaguardare la biodiversità ed i sistemi ecologici specifici di determinate aree, dove l'olivo svolge un ruolo di primo piano per l'assetto idro-geologico dell'ambiente e per la caratterizzazione del paesaggio. In Italia, la produzione di olio si basa sull'impiego di numerose varietà di olivo, a differenza della Spagna, che ne detiene il primato a livello mondiale (Pannelli *et al.*, 2007). Secondo la "banca dati degli oli monovarietali italiani", attiva a partire dal 2006, in Italia più di 120 cultivar vengono impiegate per la produzione di oli monovarietali, con un trend in crescita (<http://www.olimonovarietali.it/>). La varietà

maggiormente impiegata è 'Frantoio', seguita da 'Leccino': oli monovarietali 'Frantoio' sono prodotti in dodici regioni italiane, ed anche in Slovenia (2 oli). La maggior parte delle cultivar però viene attualmente impiegata per un numero ridotto di oli (raramente superiore a dieci) che sono prodotti comunemente in una o due regioni. La Figura 1.1 illustra come la produzione di oli monovarietali interessa tutta l'Italia, anche se nelle Marche ed in Umbria si registra l'impiego di un maggior numero di varietà di olivo. In Campania sono stati censiti oli monovarietali che provengono dalle seguenti tredici varietà: 'Carpellese', 'Cicinella', 'Coratina', 'Frantoio', 'Nocellara Del Belice', 'Ogliarola', 'Ortice', 'Picholina', 'Ravece', 'Rotondella', 'Salella', 'Tonda Del Matese' e 'Tonda Iblea'.



**Figura 1.1:** Diagramma a torta della distribuzione percentuale delle cultivar di olivo diffuse al Nord, Centro e Sud Italia, impiegate per la produzione di oli monovarietali.

### **3.5 Conservazione delle risorse genetiche vegetali e *core collection***

Le collezioni *ex-situ* di germoplasma sono state sviluppate in diverse specie vegetali coltivate, per preservare e promuovere l'utilizzazione delle risorse genetiche vegetali in agricoltura. La gestione, la valutazione e l'uso di ampie collezioni di germoplasma risulta essere difficile a causa della ridondanza delle accessioni ed all'impossibilità di analizzare nel dettaglio tutte le accessioni conservate (Diwan *et al.*, 1995; Grenier *et al.*, 2000). Inoltre, le dimensioni delle collezioni *ex-situ* di olivo continuano a crescere in virtù delle sempre più diffuse analisi molecolari che sono effettuate sul germoplasma locale, che identificano nuove accessioni coltivate (Alba *et al.*, 2009; Bracci *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2009). Per questi motivi, la costruzione di un *core subset*, fornisce un aiuto importante per lo studio, la caratterizzazione e l'uso delle risorse genetiche delle collezioni di germoplasma. Frankel e Brown (1984) hanno definito una *core collection* come un subset di una ampia collezione di germoplasma che, massimizza la possibile diversità genetica di una specie vegetale coltivata, con la minima ridondanza. Una volta stabilito un *core subset*, è possibile studiare nel dettaglio alcune sue specifiche caratteristiche, permettendo così, una precisa selezione delle accessioni per determinati usi futuri o per efficienti programmi di breeding (Ortiz *et al.*, 1998). I vantaggi dello sviluppo di una *core collection*, risultano inoltre più evidenti nelle specie legnose, che usualmente sono mantenute come cloni

all'interno delle banche di germoplasma. Brown (1989) ha proposto che una *core collection* dovrebbe contenere il 5-10% delle accessioni conservate nella collezione di germoplasma iniziale e rappresentare almeno il 70% degli alleli presenti inizialmente, senza accessioni ridondanti. La maggior parte delle *core collection* contengono fra il 5% ed il 20% delle accessioni della collezione iniziale (Brown 1989; Schoen e Brown, 1993; Van Hintum, 1999; Van Hintum *et al.*, 2000).

Sin da quando è stato introdotto il concetto di *core collection*, diversi dati sono stati utilizzati per studiare la diversità delle specie vegetali esaminate, come i tratti morfologici, agronomici, i marcatori molecolari. È noto che l'influenza delle condizioni ambientali sulle caratteristiche fenotipiche possono ostacolare lo sviluppo delle *core collection*, soprattutto quando si parte da collezioni *ex-situ*. Di conseguenza, per poter correttamente rappresentare la diversità della collezione iniziale i marcatori molecolari si sono oramai affermati come strumento di elezione (Hu *et al.*, 2000). Per costruire una *core collection* esistono diverse fasi da seguire: identificare le accessioni che la rappresenteranno; stabilire la dimensione della *core collection*; dividere il set di materiali usati in differenti gruppi significativi; stabilire il numero di accessioni e scegliere quali di esse, per ciascun gruppo, saranno incluse nella *core* (van Hintum *et al.*, 2000).

L'identificazione dei genotipi per una *core collection*, sebbene inizialmente faceva riferimento esclusivamente a dati fenotipici e/o "passport data", oggi è pressoché esclusivamente effettuata con analisi del DNA. Diversi esempi in letteratura includono l'uso dei marcatori AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Fajardo *et al.*, 2002; Van Treuren *et al.*, 2006), dei marcatori biochimici (Liu *et al.*, 2001), dei RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Skroch *et al.*, 1998; Marita *et al.*, 2000), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Kojima *et al.*, 2005), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Kojima *et al.*, 2005) o gli SSR (*Simple sequence Repeats*) (Dje *et al.*, 2000; Grenier *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2006). Esempi sull'uso dei marcatori molecolari per sviluppare *core collection* in specie legnose sono limitati a pochi casi come in melo (Volk *et al.*, 2005), in anacardio (Dhanaraj *et al.*, 2002) o nel sandalo citrino (Shashidhara *et al.*, 2003).

La seconda fase, spesso chiamata "stratificazione", per stabilire una *core collection*, è il processo di campionamento, che consiste nella costruzione di gruppi significativi. Tale esigenza nasce dal fatto che "stratificare" gerarchicamente in gruppi omogenei una collezione molto ampia di accessioni semplifica la selezione della *core collection*. I membri di questi gruppi omogenei dovrebbero non solo condividere una serie di caratteri, ma soprattutto dovrebbero originarsi da ambienti ecologici e/o regioni simili. In questa fase, quindi, i gruppi devono essere costruiti cercando di massimizzare la variazione fra essi e di minimizzare quella all'interno di ciascuno di essi (van Hintum *et al.*, 2000). In altre parole stratificare una collezione di germoplasma significa, dal punto di vista genetico, individuare gruppi che devono essere quanto più diversi tra loro e quanto più omogenei è possibile. La fase successiva, nota come "allocazione", fornisce i criteri per decidere il numero delle accessioni che saranno selezionate da ogni gruppo, per formare la *core collection*. Brown (1989) ha descritto tre metodi di allocazione: costante (C), dove il numero di accessioni selezionate è lo stesso per tutti i gruppi identificati nella fase di stratificazione; proporzionale (P), dove il numero di accessioni allocate è proporzionale al numero di accessioni all'interno di ciascun gruppo; ed infine il metodo logaritmico (L), dove il numero di accessioni allocate è proporzionale al logaritmo del numero di accessioni all'interno di ciascun gruppo. Altri metodi proposti

di recente sono: la strategia di allocazione D (Franco *et al.*, 2005), dove le distanze di Gower sono state calcolate fra le accessioni all'interno di ogni cluster; il raggruppamento "stepwise" (Hu *et al.*, 2005), dove vengono costruiti successivi dendrogrammi e le stesse accessioni sono selezionate in ogni fase; ed infine la strategia di massimizzazione (*M strategy*) (Schoen e Brown, 1993), dove si cerca di massimizzare il numero di alleli osservati ad ogni locus.

L'obiettivo del campionamento delle accessioni, consiste nell'identificazione di una strategia che permette di recuperare la maggior parte della diversità contenuta nella collezione iniziale. Una strategia di campionamento, pertanto, include la definizione dell'intensità di campionamento, un metodo di campionamento ed un metodo di allocazione (Thompson, 2002). L'intensità di campionamento definisce la dimensione del campione come una misura della dimensione della popolazione. Relativamente ai metodi di campionamento, i ricercatori raccomandano l'uso di strategie di campionamento stratificate (intese come strategie opposte a metodi di campionamenti random) per la gestione delle risorse genetiche e la formazione di *core subset* (Peeters e Martinelli, 1989; Crossa *et al.*, 1994, 1995a, 1995b; Franco *et al.*, 2003). Queste strategie di campionamento stratificato suggeriscono che la classificazione o il raggruppamento dei genotipi deve avvenire sulla base di conoscenze pregresse come l'origine, i "passport data", o una classificazione numerica, seguita da una allocazione di accessioni a partire da ciascun raggruppamento all'interno di un dato subset. Franco *et al.* (1998, 1999, 2002, 2003) e Franco e Crossa (2002) hanno proposto una strategia di campionamento sequenziale per la formazione di *core subset* mediante l'uso simultaneo di dati morfologici discreti e continui. Questo approccio è stato usato per la costruzione di *core subset* nel mais (*Zea mays* L). (Tabata *et al.*, 1998, 1999, 2001). La maggior parte dei metodi di campionamento include quelli che usano l'algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average*) (Sokal and Michener, 1985) e la varianza minima di Ward all'interno dei vari gruppi (Ward, 1963). Tali algoritmi possono essere applicati a distanze calcolate con diversi indici. Le distanze calcolate fra individui (o fra popolazioni) che si basano su dati fenotipici sono generalmente la distanza Euclidea per variabili continue, e la distanza di Gower (1971) per l'insieme di variabili continue e discrete. Per i dati ottenuti da marcatori molecolari esistono una lunga serie di indici (Sokal e Rohlf, 1995), e di solito la distinzione che viene effettuata è relativa al tipo di codifica del dato che viene impiegato. Tradizionalmente, i dati sono considerati "non-informativi" quando le informazioni molecolari sono convertite in un sistema binario basato sulla assenza o presenza (0 e 1) di ogni marcatore. In questo caso i coefficienti più utilizzati sono il *Simple Matching*, *Jaccard* e *Dice*. Quando invece le informazioni derivanti dalle analisi molecolari vengono espresse in termini prettamente genetici (esistono dunque informazioni per stabilire una corrispondenza marcatore-allele) i dati sono considerati "informativi" e le distanze genetiche si possono calcolare con formule quali quella di Rogerss-modificata, Cavalli-Sforza e Edwards, ed altre (Rogerss, 1991; Cavalli-Sforza ed Edwards, 1967). Tali formule si basano essenzialmente sul calcolo delle frequenze alleliche all'interno di ciascun locus per ogni individuo o popolazione. Una delle più efficaci strategie di campionamento per "trattenere" gli alleli neutrali ad ampia diffusione ed a bassa frequenza è la strategia di massimizzazione del numero di alleli osservato (*M strategy*) (Schoen e Brown 1993). Tale strategia consente un uso deterministico dei dati molecolari, piuttosto che un uso statistico. La *M strategy* utilizza un programma lineare per la ricerca di una combinazione di accessioni che massimizzano il numero di alleli osservati ai loci molecolari, eliminando le accessioni



ridondanti, garantendo così un numero minimo di accessioni per ciascun gruppo. La M strategy non determina soltanto il numero di accessioni che dovrebbero costituire i differenti gruppi, ma consente anche di identificarle. L'algoritmo MSTRAT sviluppato da Gouesnard *et al.* (2001), implementa la M strategy per la selezione di accessioni che massimizzano la ricchezza allelica. In letteratura sono riportati diversi studi che ricorrono alla M strategy per la costruzione di una *core collection* come strategia di campionamento. Ad esempio McKhann *et al.* (2004) ha costruito una *core collection* a partire da 265 accessioni di *Arabidopsis thaliana* (L.), utilizzando il software MSTRAT mediante marcatori molecolari SNP; Escribano *et al.* (2007), ad esempio, compara differenti metodi di campionamento per la costruzione di una *core collection* mediante l'uso di marcatori molecolari SSR in cherimoya (*Annona cherimola*, *Annonaceae*), albero da frutto tropicale, partendo da una collezione di 279 genotipi di distinte aree geografiche, ottenendo il migliore subset di individui (40 accessioni) attraverso la *M strategy*.

### **3. 6 L'Olivo ed i suoi principali agenti patogeni: implicazioni per la definizione di una *core collection***

La definizione di una *core collection* si avvantaggia notevolmente dell'impiego di tecniche di analisi del DNA, e richiede, almeno per la piante non coltivate, anche una adeguata conoscenza della struttura genica della popolazione. Però, soprattutto per le specie che sono propagate vegetativamente, un problema altrettanto importante è la valutazione dello stato fitosanitario del materiale vegetale. È noto infatti che tali specie sono, non solo più costose da mantenere ma anche maggiormente esposte al problema della presenza di malattie causate da patogeni fungini e virali. La costituzione di una *core collection* di olivo, deve quindi prevedere una fase di valutazione dello stato fitosanitario del germoplasma disponibile, al fine di poter costruire un *core subset* che sia esente da problemi fitosanitari.

I principali patogeni fungini che attaccano l'olivo risultano essere la *Spilocea oleagina* ed il *Verticillium dahliae*, agenti eziologici rispettivamente dell'occhio di pavone e della verticilliosi. Il fungo *Spilocea oleagina*, si diffonde per mezzo dei conidi, penetrando nei tessuti vegetali attraverso la perforazione della cuticola. Tale fungo attacca principalmente foglie, frutti e rami delle piante di olivo. La sintomatologia dell'occhio di pavone, consiste nella formazione, nella pagina superiore delle foglie, di macchie bruno fuliginose, che si estendono e scuriscono, virando al giallo durante il periodo estivo. Sui frutti, attaccati, invece risultano evidenti tacche brunastre di pochi millimetri, mentre sulle parti più tenere dei germogli sono visibili lesioni simili a quelle delle foglie. Ne risulta una ridotta capacità fotosintetica della pianta ed un indebolimento per le piante più sensibili al freddo (Anton e Laborda, 1989). Il *Verticillium dahliae* (Kleb.), fungo patogeno del suolo, attacca oltre duecento specie vegetali includendo le piante erbacee (cotone, melanzana, patata ecc), le specie arboree (albicocco, avocado, pesco e olivo), piante da fiori (rosa, crisantemo) ed ornamentali. Tale patogeno colonizza dapprima la superficie delle radici per poi penetrare nella radice stessa o nel fusto attraverso le aree ferite, diffondendosi all'interno dello xilema in senso acropetalo. Quando una pianta suscettibile è infetta mostra svariati sintomi, come l'accartocciamento e l'ingiallimento fogliare e l'avvizzimento dello stelo. Un sintomo distintivo della verticilliosi è però l'imbrunimento dei tessuti xilematici della pianta (Veronese *et al.*, 2003). La severità dell'attacco da parte del fungo, dipende dalla virulenza degli isolati patogeni. Si distinguono, infatti, due patotipi del *V. dahliae*, defogliante (D) e non defogliante

(ND), in base alla capacità di defogliare completamente la pianta ospite (D) o causare soltanto la malattia ed una parziale o nulla defogliazione (ND). Il primo (D) si sviluppa più facilmente e rapidamente nella pianta ospite risultando nel lungo periodo letale; il secondo (ND) colpisce le cultivar di olivo suscettibili inducendo lievi sintomi (Mercado-Blanco *et al.*, 2003).

Diversi virus sono stati individuati in olivo (Martelli, 1999), pur tuttavia per molti di essi restano ancora da chiarire se e quanto siano capaci di influenzare le caratteristiche vegetative e produttive delle piante. È stato dimostrato che un virus responsabile di gravi alterazioni morfologiche in olivo risulta essere *Strawberry latent ringspot virus*, *SRLSV*, che causa la cosiddetta malattia dei “frutti bitorzoluti” (Marte *et al.*, 1986). Recenti studi in letteratura hanno dimostrato che, tali alterazioni morfologiche causate dal virus *SLRSV*, risulterebbero responsabili della differenziazione varietale fra la cultivar ‘Frantoio’ e ‘Roggiola’. Quest’ultima è considerata dal punto di vista genetico identica alla cultivar ‘Frantoio’ (Angiolillo *et al.*, 1999), con la differenza, però, di essere sistematicamente infetta dal virus *SRLSV* (Ferretti *et al.*, 2002). Altri virus come *Cucumber mosaic virus* (*CMV*), *Cherry leaf roll virus* (*CLRV*) e *Arabis mosaic virus* (*ArMV*), sono stati identificati in piante di olivo asintomatiche, mentre è noto che risultano responsabili di gravi danni e alterazioni in altre specie vegetali, ad esempio nelle ortive, drupacee etc. (Conti *et al.*, 1996). Altri virus dell’olivo sono l’*Olive vein yellowing associated virus*, *OYVaV*, *Olive vein yellowing associated virus*, *OYMDaV* e *Olive leaf yellowing associated virus*, *OLYaV* (Savino *et al.*, 1996). Questi virus sono generalmente associati a specifici sintomi che caratterizzano il ‘Complesso dei giallumi fogliari’, mentre il virus *Olive semilatifolius virus* *OSLV*, è associato alla ‘Clorosi nervale ed infine il *Tobacco mosaic virus* *TMV*, risulta associato allo ‘schiarimento delle nervature’.

L’intensificarsi degli studi diagnostici, la disponibilità di sequenze nucleotidiche (Grieco *et al.*, 1995; Felix *et al.*, 2005) e di sonde clonate dei principali virus segnalati in olivo ha permesso di sviluppare altri approcci molecolari per la diagnosi. Queste tecniche, quali l’ibridazione molecolare ed amplificazione genica (RT-PCR), da qualche anno rappresentano un validissimo strumento per la valutazione dello stato sanitario degli impianti commerciali, dei materiali di propagazione, del materiale sottoposto a trattamenti di risanamento e del materiale costituente ampie collezioni di germoplasma (Saponari, 2005). L’applicazione di tali tecniche per la valutazione dello stato sanitario delle colture nei diversi areali olivicoli del mondo, ha permesso di evidenziare che, pur non riscontrando la presenza di evidenti sintomi in campo, fino al 70% delle piante saggiate è risultata infetta da uno o più agenti virali (Saponari, 2005).

Per l’identificazione diagnostica dei patogeni dell’olivo esistono svariate metodologie classiche, che essenzialmente consistono nelle tecniche di identificazione, isolamento e quantificazione dei patogeni nel materiale vegetale sia al livello delle zone aeree che dell’apparato radicale, così come al livello del suolo (Blanco-López *et al.*, 1984; Blanco-López, 2001, 2005; López-Escudero *et al.*, 2003; Moral *et al.*, 2005). Per l’identificazione molecolare del *V. dahliae* e dei possibili virus così come del batterio *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* esistono oggi diverse tecniche molecolari (Bertolini *et al.*, 2003; Mercado-Blanco *et al.*, 2003). Tali metodi sono basati sulle reazioni di amplificazione PCR degli acidi nucleici con primer specifici per un agente eziologico. Ciò nonostante, quando la molecola target è presente in basse concentrazioni, oppure quando i campioni contengono inibitori di PCR o quando i patogeni sono distribuiti in maniera irregolare, come accade nelle piante di olivo asintomatiche, una più sensibile metodica di identificazione è

rappresentata dalla nested PCR. Un'altra variazione della tecnica PCR è rappresentato una RT-PCR in cui, in un'unica reazione sono identificati allo stesso tempo gli RNA virali ed il DNA target dei patogeni batterici (Bertolini *et al.*, 2003). In questo lavoro è stato possibile identificare contemporaneamente i virus CMV, CLRV, SLRSV, ArMV ed il batterio *P. savastanoi*, anche in piante di olivo asintomatiche. Sebbene tale tecnica sia caratterizzata da notevole sensibilità e vantaggi legati alla mutliplex nested PCR, più efficace risulta la tecnica che combina la Real Time PCR, usando il Sybr Green, con l'analisi delle curve di dissociazione. Il vantaggio della chimica Sybr Green, è legato alla possibilità di usarla per identificare ciascuna molecola target, semplicemente attraverso l'uso di coppie di primer specie-specifiche opportunamente disegnate, senza ricorrere all'uso di alcuna sonda fluorescente, riducendo così notevolmente i costi dell'esperimento (Giulietti *et al.*, 2001). L'analisi delle curve di dissociazione può sostituire l'elettroforesi in gel di agarosio per la verifica delle dimensioni dell'amplificato, riducendo così i tempi. La specificità e affidabilità del saggio, insieme con i bassi costi, la possibilità di automazione e la rapidità con cui è possibile discriminare in tempi brevi un elevato numero di campioni, rendono la Real Time PCR qualitativa con l'analisi delle curve di dissociazione, una metodica idonea per l'identificazione delle diverse specie di patogeni e virus dannosi per le piante (Bertolini *et al.*, 2003).

### **3.7 La mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*)**

Uno dei principali stress biotici dell'olivo è la mosca. La mosca dell'olivo *Bactrocera oleae* (Rossi), diptero *Tephritidae*, è considerato il fitofago chiave dell'ecosistema olivo, responsabile di notevoli danni economici nei diversi areali olivicoli dei paesi del bacino del Mediterraneo. È un insetto monofago invasivo e dannoso negli Stati Uniti, così come in Asia, Africa, America settentrionale e centrale (Nardi *et al.*, 2005). Il suo sviluppo larvario può completarsi solo all'interno dei frutti delle specie del genere *Olea*, *O. europea* L. coltivata (*O. europea* spp. *Europea* o *sativa* Hoffm. e Link o *communis* Ait., o *typica* Han) o selvatica (*O. europea* spp. *Oleaster* Hoffm. e Link, o *sylvestris* Rouy), *O. verrucosa* (Link) ed infine *O. crysophylla* (Lam) (Alvarez e Quesada-Moraga, 2007). Le femmine adulte introducono individualmente per mezzo dell'ovopositore le uova nei frutta. Dopo la schiusa, la larva comincia a consumare il mesocarpo o polpa del frutto, riducendo così la quantità del materiale vegetale a partire dal quale si estrae l'olio e di conseguenza il rendimento in olio dei frutti. Le drupe "bacate", si distinguono facilmente, soprattutto quando già hanno raggiunto la dimensione massima e cambiano di colore, allora risulta semplice osservare in superficie leggere depressioni o un epicarpo di un colore differente, generalmente più chiaro del resto. Tali segnali sono presenti in corrispondenza della zona dove la larva si è alimentata. In maniera conforme con la maturazione della drupa, tali sintomi vanno accentuandosi, fino a che nella maggior parte dei casi, i frutti più danneggiati si staccano dall'albero (Alvarez e Quesada-Moraga, 2007). La specie presenta una notevole carica batterica, allocata all'interno delle strutture speciali del tubo digestivo, tanto delle larve quanto degli adulti, alcuni sono veri simbionti (Sacchetti *et al.*, 2008; Tzanakakis *et al.*, 2006) che collaborano nel facilitare la digeribilità della polpa. I tunnel di alimentazione, scavati dalle larve all'interno del mesocarpo sono colonizzati da una flora microbica. come *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp, che causa marciume e fermentazione con ripercussioni sulla qualità dell'olio. (Torres-Vila *et al.*, 2003). La proliferazione di *Gloesporium olivarum* Alm. (*Colletotrichum gloesporoides* Penz.), agente responsabile delle drupe saponificate,

è inoltre dannoso per l'acidità dell'olio (Torres-Vila *et al.*, 2003). Altro microrganismo, ritenuto da alcuni autori responsabile dell'aumento dell'acidità, è il fungo *Camarosporium dalmaticum* Thum, che si sviluppa nei tunnel di alimentazione scavati dalle larve di *B. oleae*, che è trasmesso tramite il dittero *Prolasiopetera berlesiana* Paoli (Diptera, Cecidomyiidae), predatore di uova e larve della mosca, che forma nel frutto una macchia marrone ed una evidente depressione, conseguenza della putrefazione del medesimo (Iannotta *et al.*, 2007).

L'infestazione causata dalla mosca dell'olivo provoca danni diretti ed indiretti. I danni diretti, sono causati dall'infestazione attiva, che consiste nella distruzione della polpa e nella conseguente cascola precoce dei frutti, ma anche nell'alterazione dei parametri qualitativi dell'olio di oliva, come l'aumento dell'acidità libera e del numero di perossidi, alterazioni della frazione fenolica e sterolica ed alterazioni delle caratteristiche organolettiche. I danni indiretti, sono ascrivibili all'infestazione fungina e batterica che prende piede all'interno dei siti di ovideposizione e delle gallerie larvali (Iannotta *et al.*, 2007). È noto che in condizioni ottimali, la femmina adulta ovidepone un solo uovo per drupa, segnando l'area intorno alla puntura, attraverso il succo vegetale della drupa, che contiene sostanze chimiche che inibiscono l'ovideposizione di altre femmine nella medesima drupa (Grolami *et al.*, 1981; Lo Scalzo *et al.*, 1994). Il *management* della mosca dell'olivo diventa sempre più importante a causa delle perdite economiche da essa provocate. Nell'ambito della lotta agronomica, oggi si tende ad utilizzare pratiche colturali (potature mirate, raccolta anticipata etc.), capaci di ridimensionare l'uso di fitofarmaci. Alcuni metodi biochimici, insieme con la raccolta precoce, hanno di fatto ridotto l'estensione delle infestazioni parassitiche, costituendo pertanto un'alternativa all'uso dei mezzi chimici. Fra i mezzi agronomici di difesa, esiste la possibilità di scegliere le cultivar di olivo in base, non solo alle loro capacità di rispondere a diverse esigenze legate alla produttività (qualità di produzione, adattamento all'ambiente etc.) ma anche in base alla bassa suscettibilità nei confronti dei parassiti. Diversi studi hanno dimostrato che esiste una differente capacità delle cultivar di olivo di rispondere alla mosca, in base all'incidenza dell'entità del danno a parità di condizioni ambientali ed agronomiche di coltivazione. Pertanto, in base al livello di suscettibilità esibito, sono stati individuati tre diverse categorie di varietà di olivo: alta suscettibilità (più del 10% di drupe infestate); suscettibilità moderata (3% di drupe infestate); resistenza (meno dello 0,25% di drupe infestate) (Iannotta *et al.*, 1999). Le possibili cause che determinano la suscettibilità o resistenza alla mosca non sono state ancora chiarite. Le osservazioni condotte in campo, hanno indicato che le femmine adulte di *B. oleae* mostrano una marcata preferenza per alcune piante ospiti nel loro habitat naturale, nei cui frutti ciascuna mosca ovidepone. Sebbene la preferenza di ovideposizione, sia stata dimostrata sia da studi condotti in campo che in laboratorio, restano tuttavia da chiarire i meccanismi di tale preferenza (Burrack e Zalom, 2008). Sono stati effettuati diversi studi sulla correlazione positiva fra dimensione della drupa e preferenza di ovideposizione della femmina adulta. Questa relazione è stata confermata negli studi condotti in campo (Burrack and Zalom 2008; Iannotta *et al.*, 1999), sembra essere meno chiara per quelli condotti in condizioni controllate di laboratorio, effettuati mediante l'uso di uno o pochi individui (Kombargi *et al.*, 1998). Le varietà di olivo da tavola forniscono frutti la cui pezzatura maggiore consente una migliore sopravvivenza delle larve. Ciononostante le cultivar da olio, con drupe di minor pezzatura, sono comunque ospiti eccellenti per la mosca. Anche la durezza del frutto, sembra influenzare la scelta delle drupe in cui ovideporre. Esiste infatti una correlazione negativa fra durezza e infestazione. Le varietà di olivo diffuse nei paesi

del Mediterraneo, mostrano una suscettibilità variabile all'attacco della mosca. Ad ogni modo, probabilmente anche la presenza di batteri epifiti sulle foglie ed i frutti, potrebbe influenzare la differente suscettibilità delle cultivar di olivo alla mosca. Difatti esiste una correlazione positiva fra la mosca ed i batteri simbiotici, i quali emetterebbero sostanze volatili attrattive per la mosca, che risulterebbe facilitata nel riconoscere la pianta in cui ovideporre (Sacchetti *et al.*, 2007).

### 3. 8 La difesa dell'olivo all'attacco della mosca

Poche sono le informazioni disponibili relativamente al meccanismo molecolare di difesa delle piante di olivo nei confronti della mosca *B. oleae*. È noto che durante il processo di interazione tra la pianta e gli organismi dannosi è indotta l'espressione di una serie di geni coinvolti nei meccanismi di difesa della pianta. Lo studio delle interazioni olivo/mosca è però complicato sia per la diversa suscettibilità delle cultivar di olivo agli attacchi sia per la notevole variabilità legata alle popolazioni dell'insetto (Ochando e Reyes, 2000).

La pianta di olivo, attraverso diverse attività fisiologiche e biochimiche attua i suoi meccanismi di difesa contro la mosca. Tra i meccanismi di difesa rientrano l'alterazione della composizione dei frutti, che possono contenere ad esempio sostanze repulsive o con attività antinutrizionale per le larve; l'emissione di sostanze volatili ad azione attrattiva/repulsiva per le femmine adulte; la presenza di barriere meccaniche all'ovideposizione. Alcuni autori hanno evidenziato come i composti volatili emessi dalla pianta ospite orientino la mosca delle olive, nella localizzazione del sito di ovideposizione. C'è quindi da supporre che l'attrazione esercitata dalle sostanze volatili emesse da una pianta, possa originarsi sia dalla pianta stessa (Strapazzon *et al.*, 1985; Girolami & Coiutti, 1991), che da varie specie di batteri epifiti come evidenziato in alcune specie di importanza economica quali *Anastrepha ludens* (Robacker *et al.*, 1998) e *Rhagoletis pomonella* (McCollom *et al.*, 1994; Lauzon, *et al.*, 2000). Ancora poche risultano le informazioni disponibili riguardo ai meccanismi naturali di difesa diretta dell' *Olea europea*. Infatti le molecole di difesa in olivo risultano essere i fenoli, sintetizzati e accumulati nei tessuti dei frutti durante la crescita e la maturazione (Uccella, 2001). È noto che esistono delle caratteristiche fisiche (spessore o colorazione dell'epicarpo) o chimiche (quantità di oleuropeina o cianidina) che spiegano la bassa suscettibilità alla mosca esibita da alcune varietà. È stato inoltre, osservato che il contenuto di cianidina, responsabile della colorazione più o meno anticipata delle drupe, presenta un'azione repellente cromatica, confondendo la femmina adulta nel riconoscimento della drupa in cui ovideporre. Sembra, infatti, che le olive verdi siano più infestate di quelle marroni (Rizzo *et al.* 2006). L'oleuropeina (glucoside fenolico) ed il composto demetiloleuropeina, sono i più abbondanti composti fenolici presenti nelle foglie e nei frutti di olivo, trovati in tutte le parti del frutto, con la più alta concentrazione all'interno della polpa (Servili *et al.* 1999, Owen *et al.* 2003). L'oleuropeina è considerata uno dei più interessanti metaboliti secondari nei frutti di olivo, non solo per il ruolo che ricopre nelle interazioni della pianta con gli insetti dannosi e patogeni, ma anche per i suoi grandi benefici per la salute umana. Tale composto ha azione antiossidante ed antimicrobica, e presenta, inoltre, un' azione simile ad un antibiotico nel selezionare la flora batterica simbiotica richiesta per lo sviluppo larvale. Si ritiene che il livello di suscettibilità esibito dalle cultivar di olivo alla mosca, dipenda sia dalla disponibilità dell'oleuropeina ad essere degradata dall'enzima  $\beta$ -glucosidasi che dall'efficienza dell'enzima stesso. Ad esempio, una quantità cospicua di oleuropeina (30mg/g di

polpa alla raccolta) risulta avere una significativa azione inibitoria, esibita dai metaboliti volatili che derivano dalla sua degradazione, nei confronti del ciclo biologico del ditteri durante lo stadio di preimmagine. Infatti, i prodotti che derivano dall'idrolisi dell'oleuropeina ad opera della  $\beta$ -glucosidasi, come i composti aldeidici tossici (2-esanale,  $\beta$ -3,4-diidrossifeniletanolo etc.), inibiscono la schiusa delle uova e causano la mortalità delle larve di prima generazione. Il minor numero di punture nelle cultivar di olivo resistenti, comparate con quelle suscettibili potrebbe indicare che tale molecola può inibire lo sviluppo e la diffusione delle larve che si sviluppano pochi giorni dopo l'ovideposizione. Difatti è noto che le molecole che derivano dall'oleuropeina, formano legami con le proteine, alchilandone i residui di lisina. Ciò provoca una riduzione della digeribilità e qualità nutritiva dei tessuti del frutto, provocando inevitabilmente la morte delle larve.

### 3.9 Scopo della tesi

La variabilità genetica in olivo può essere valutata mediante l'uso di descrittori morfologici, così come dei marcatori enzimatici (Ouazzani *et al.*, 1993; Trujillo *et al.*, 1995), marcatori molecolari RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Fabbri, 1995; Belaj *et al.*, 1998, 2001), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Angiolillo *et al.*, 1999; Asmani *et al.*, 1999), SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Rallo *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; Tujillo *et al.*, 2009; Erre *et al.*, 2009) ed anche mediante analisi del DNA cloroplastico (Amane *et al.*, 1999; Lumazet *et al.*, 2000; Besnard *et al.*, 2002). Tra i vari marcatori molecolari disponibili, gli SSR (*Simple Sequence Repeats*) sono i più interessanti per l'identificazione varietale, poiché sono di tipo codominante, altamente informativi e riproducibili. Belaj *et al.* (2003) ha discusso i vantaggi dell'uso degli SSR, rispetto ai marcatori AFLP e RAPD, sottolineando l'alta efficienza di questi marcatori per la caratterizzazione varietale in olivo. Oggi l'individuazione, enumerazione e classificazione delle varietà di olivo presenti in Italia non è ancora completata, anche perché sussistono ancora diversi casi di sinonimia ed omonimia. Questa complicata e confusa situazione riguarda soprattutto le regioni olivicole italiane insulari e centro-meridionali, dove maggiore risulta il numero di genotipi esistenti (Alba *et al.*, 2009) e dove solo grazie agli sforzi compiuti in questi ultimi anni, le ricerche verso queste tematiche stanno riducendo lacune dovute alla disuniformità dei dati, e all'uso di metodologie di indagine diverse. Ritroviamo così alcune regioni che, pur dotate di specifiche monografie sul germoplasma autoctono, presentano ancora esigenze di conoscenze ed approfondimenti dal punto di vista molecolare. La caratterizzazione morfologica e molecolare delle cultivar di olivo campane, ha evidenziato che le varietà di olivo mostrano un ampio range di variabilità per numerosi tratti morfologici e agronomici (e.g contenuto in olio, dimensione del frutto) (Pugliano, 2002), ed una buona variabilità genetica, anche se sono emersi problemi di denominazione erronea, che non sono frequenti all'interno del germoplasma locale (Rao *et al.*, 2009).

Lo scopo principale della seguente attività del presente lavoro di tesi, è stato quello di effettuare una caratterizzazione molecolare mediante marcatori SSR delle varietà di olivo del germoplasma olivicolo meridionale e campano, valutandone le relazioni genetiche intervarietali. Inoltre, i profili distintivi ottenuti sono stati studiati anche nell'ambito della tracciabilità di filiera olivo olio.

In virtù della sempre maggior attenzione che viene oggi rivolta alla biodiversità delle specie coltivate, sono state sviluppate diverse collezioni *ex-situ* di germoplasma olivicolo, per preservare e promuovere l'utilizzazione delle risorse genetiche in

agricoltura. La gestione, la valutazione e l'uso di ampie collezioni di germoplasma risulta essere inefficiente a causa dell'elevato numero di genotipi ed all'impossibilità di analizzare nel dettaglio tutte le accessioni conservate. Pertanto la costruzione di un *core subset*, fornisce un aiuto importante per lo studio, la caratterizzazione e l'uso delle risorse genetiche delle collezioni di germoplasma. Diverse sono le strategie che possono essere impiegate per costruire un *core subset*. A partire da dati di marcatori molecolari SSR, per conservare la diversità genetica della banca di germoplasma di olivo mondiale (BGMO) di Cordoba, sono stati costruiti e valutati cinque *core subset* di dimensioni distinte, attraverso l'uso di tre differenti algoritmi. Tali analisi sono il passo principale per la costruzione di una *core collection*.

Un requisito fondamentale per l'utilizzo e la conservazione del germoplasma di olivo è, non solo una accurata caratterizzazione genetica, ma anche una attenta valutazione dello stato sanitario delle piante. È importante disporre di materiale di propagazione vivaistico qualificato e rispondente alle norme sanitarie vigenti (commercializzazione, certificazione volontaria). Tali norme impongono che per le giovani piante di olivo sia garantita la rispondenza genetica e l'assenza delle malattie più importanti in olivo, causate dai principali patogeni e virus (Barba e Mainolfi, 1996; Martelli, 1999). Per questo motivo, accessioni della BGMO sono state analizzate con tecniche molecolari per individuare la presenza di 40 agenti patogeni e 3 virali in 43 piante di olivo delle 174 analizzate.

Infine, tra i principali stress biotici dell'olivo, si annovera la mosca. La risposta molecolare dell'olivo all'attacco della mosca è complessa e coinvolge numerose e differenti funzioni molecolari, ad oggi resta ancora poco investigata. È noto che durante il processo di interazione tra la pianta e gli organismi dannosi, si attivano una serie di geni coinvolti nei meccanismi di difesa. Studiare la variazione dei trascritti e caratterizzarne il loro ruolo può chiarire le basi del complesso meccanismo molecolare della risposta della pianta all'attacco della mosca. L'identificazione di geni coinvolti nella risposta all'attacco della mosca rappresenta il primo passo per comprendere le funzioni di difesa attivate nell' *Olea europea* da questo insetto dannoso. Considerando le scarse informazioni disponibili sul genoma dell'olivo, un'utile approccio sperimentale per lo studio delle risposte della drupa alla infestazione della mosca è rappresentato dalla tecnica SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*). Identificati i geni diversamente espressi e funzionalmente più interessanti, perché putativamente coinvolti nei meccanismi di difesa in *planta*, l'obiettivo è stato quello di confrontarne l'espressione in varietà con diversa suscettibilità alla mosca. Se le conoscenze genomiche su questa specie saranno incrementate, come è auspicabile che accada in tempi brevi, si può ipotizzare che, in un futuro non troppo lontano, l'analisi di espressione di specifici trascritti potrà rappresentare uno strumento, per identificare e selezionare genotipi con livelli superiori di tolleranza alla mosca.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 Materiale vegetale

#### 4.1.1 Germoplasma di olivo italiano

Il germoplasma di olivo italiano investigato (Tabella 4.1) include 47 varietà coltivate al Sud Italia, di cui 26 in Campania e 21 nelle regioni limitrofe. L'elenco delle cultivar analizzate e l'area di origine o la principale area di coltivazione è riportata in Tabella 4.1. Il materiale verde delle varietà di olivo analizzate è stato raccolto da singole piante, presenti nel campo sperimentale dell'azienda Se.S.I.R.CA (Settore Sperimentazione, Informazione, Ricerca e Consulenza in Agricoltura) (Battipaglia). Le foglie sane sono state raccolte, lavate con acqua, congelate in azoto liquido e conservate alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ , fino al momento dell'analisi.

**Tabella 4.1** Elenco delle cultivar di olivo italiane

<b>Cultivar</b>	<b>Codice</b>	<b>Area di origine*/Principale area di coltivazione</b>
Ascolana Tenera	1	Marche, Italia Centrale
Asprinia	2	Campania
Biancolilla	3	Sicilia
Caiazzana	4	Campania
Cammarotana	5	Campania
Carolea	6	Calabria
Carpellese	7	Campania
Coratina	8	Puglia
Cornia	9	Campania
Dolce di Cerignola	10	Puglia
Dolce di Settembre	11	Puglia
Femminella	12	Campania
Frantoio	13	Nord, Sud e Centro Italia
Groia	14	Campania
Grossa di Cerignola	15	Puglia
Grossale	16	Campania
Itrana	17	Lazio, Italia centrale
Leccino	18	Toscana, Italia centrale
Maiatica	19	Basilicata
Moresca	20	Sicilia
Nocellara del Belice	21	Sicilia
Nocellara Etnea	22	Sicilia
Nocellara Messinese	23	Sicilia
Ogliara	24	Campania
Ogliarola	25	Campania
Ogliastro Grande	26	Campania
Oliva Bianca	27	Campania
Ortice	28	Campania
Ortolana	29	Campania
Pampigliosa	30	Campania
Pendolino	31	Toscana, Italia centrale
Picholina	32	Puglia
Pisciottana	33	Campania
Provenzale	34	Campania
Racioppa	35	Campania
Racioppella	36	Campania
Rotondella	37	Campania
Ravece	38	Campania
Ruveia	39	Campania



Salella	40	Campania
Sanginara	41	Campania
Sant'Agostino	42	Puglia
Tenacella	43	Campania
Tonda	44	Campania
Tonda Iblea	45	Sicilia
Uova di Pavone	46	Puglia
Zaituna	47	Sicilia

**Note:** Le piante di olivo sono presenti all' Azienda Agricola Sperimentale Regionale IMPROSTA, Eboli, Italia; Se.S.I.R.C.A. Settore sperimentale, Informazione, Ricerca e Consulenza in Agricoltura, Regione Campania.

#### 4.1.2 Materiali della *Core collection*

Il data set usato, per la costruzione di *core subset* in olivo, è stato ottenuto dall'analisi molecolare *fingerprinting* effettuata nel corso degli anni nel laboratorio del gruppo di ricerca di pomologia del Prof. Luis Romero Rallo (Dipartimento di agronomia E.T.S.I.A.M, Università di Cordoba), mediante 14 loci SSR (Tabella 4.2), di una collezione di germoplasma di olivo, comprendente 378 genotipi appartenenti alla banca di germoplasma mondiale di olivo (BGMO) dell'IFAPA Centro "Alameda del Obispo" (Cordoba, Spagna). La collezione analizzata include 209 cultivar provenienti dalla Spagna, 47 dalla Siria, 24 dall'Italia, 16 dalla Turchia, 15 dalla Grecia, 9 dall'Albania e Portogallo, 8 dalla Francia, 6 dalla Tunisia e Croazia, 5 dall'Iran, 4 da Cipro, Egitto e Israele, 3 dagli Stati Uniti e Messico, 2 dal Marocco ed 1 dall'Argentina, Cile, Algeria e Libano.

#### 4.1.3 Drupe per l'analisi differenziale dell' espressione genica

Per l'analisi di espressione sono state utilizzate drupe sane ed attaccate dalla mosca delle cv 'Moraiolo' 'Leccino', 'Ruveia' ed 'Ortice'.

#### 4.1.4 Oli monovarietal

Gli oli di oliva monovarietal delle cultivar 'Pisciottana', 'Frantoio' e 'Leccino', prodotti a freddo (25°C) sono stati forniti dal Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia di Rende (CRA-OLI). I campioni sono stati conservati a temperatura ambiente fino al momento dell'estrazione del DNA.

### 4.2 Estrazione del DNA

#### 4.2.1 Estrazione del DNA da foglia e da drupa

Il DNA genomico è stato estratto da giovani foglie (4 g) e da olive fresche denocciolate manualmente (3 g) secondo il metodo che prevede l'uso del CTAB (Doyle e Doyle 1987). Il materiale vegetale è stato tritato in azoto liquido, mediante l'uso di mortaio e pestello, a cui successivamente è stato aggiunto 1ml di tampone di estrazione (100 mM Tris- HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% (p/v) CTAB, 1% (v/v), 0,2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1% (v/v) NaHSO<sub>3</sub> pH 8) preriscaldato a 65 °C. Dopo incubazione a 65°C per 1 h, i campioni sono stati lasciati in agitazione a temperatura ambiente per ca 15 min. Per separare la componente organica dalla fase acquosa, ad ogni campione è stato aggiunto 1 ml di soluzione di cloroformio: alcol isoamilico (24:1), ed in seguito i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 15 min. Il

sopranatante è stato estratto con cloroformio-isoamilico, e successivamente aggiunto di 1 ml di etanolo al 100% per la precipitazione degli acidi nucleici. Il DNA precipitato è stato recuperato per centrifugazione a 13.000 rpm per 10 min, lavato con 500 µl di una soluzione costituita da etanolo al 75% ed acetato di sodio 0,2 M. I campioni sono stati poi nuovamente centrifugati a 13.000 rpm per 5 min. Il pellet è stato asciugato e risospeso in 75 µl di TE (Sambrook *et al.*, 1989). Infine a 100 µl di ciascuna sospensione di DNA sono stati aggiunti 25 µl di RNase A (10µg/ml), seguiti da incubazione a 37 °C per 45 min. Il DNA estratto è stato sottoposto ad elettroforesi in gel d'agarosio (Sambrook *et al.*, 1989). La sua quantità è stata stimata mediante confronto visivo con quantità note del DNA del fago λ (Promega).

#### **4.2.2 Estrazione del DNA da olio**

L'estrazione di DNA da olio monovarietale è stata eseguita in accordo con il protocollo di estrazione precedentemente descritto da Busconi (2003). Il DNA genomico è stato estratto a partire da campioni delle varietà 'Pisciottana', 'Frantoio' e 'Leccino', 50 ml di olio sono stati centrifugati a 13000 rpm per 30 minuti, il sopranatante è stato eliminato ed il pellet, ricentrifugato a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il pellet recuperato è stato congelato in azoto liquido e successivamente posto a bagnomaria a 65°C. Sono stati aggiunti 750 µl di 10X CTAB (10% CTAB p/v 75 mM Tris-HCl pH 8, 1M NaCl, 1% (v/v) β-mercaptoetanol, 15 mM EDTA pH 8) di estrazione, preriscaldato a 65°C. Il pellet è stato risospeso e incubato a 65°C per 1 ora e mezza (miscelando per inversione ogni dieci minuti), successivamente ciascun campione è stato aggiunto di 750 µl di cloroformio-ottanolo (24:1), incubato a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti. Il sopranatante è stato lavato nuovamente con cloroformio-ottanolo, aggiunto di 75 µl di 10% CTAB (p/v) disciolto in acqua e miscelato per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente i campioni sono stati aggiunti di 750 µl di soluzione di precipitazione (1% p/v CTAB, 50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH 8), miscelati per 10 minuti e centrifugati a 13000 rpm a temperatura ambiente. Il pellet ottenuto è stato asciugato a temperatura ambiente per 30 minuti e risospeso in 100 µl di NaCl 1M. Ciascun campione è stato incubato a 37°C per 1 ora con 4 µl di RNase A (10mg/ml), successivamente lavato con 100 µl di cloroformio-ottanolo (24:1) e precipitato con 250 µl di etanolo assoluto. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C, il pellet è stato lasciato a temperatura ambiente per pochi minuti e risospeso in 50 µl tampone TE (Sambrook *et al.*, 1989).

### **4.3 Analisi SSR**

#### **4.3.1 Amplificazione dei loci SSR**

L'amplificazione PCR del DNA isolato da foglie e da drupe è stata eseguita in un volume di 25 µl contenente: 25 ng di DNA genomico, 1 mM di dNTP, 0,3 µM di ciascun primer (Fw e Rv), 1X Buffer (Promega) e 0,5 U Taq DNA polimerasi (Promega). Le reazioni sono state eseguite nel termociclatore Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler. Le sequenze delle coppie di primer, il tipo di marcatura al 5' di ciascun primer Forward e la temperatura di annealing (Ta), sono riportati in Tabella 4.2 Le condizioni di amplificazione usate sono le seguenti: un ciclo a 94°C per 5 min; 35 cicli costituiti da una fase a 94°C per 30 secondi, una fase alla specifica temperatura di annealing per 5 secondi ed una elongazione a 72°C per 1

min. Dopo i cicli di amplificazione è stata eseguita una fase finale di polimerizzazione a 72°C per 10 minuti. Per quanto riguarda l'amplificazione SSR del DNA estratto dagli oli monovarietali, la reazione è stata eseguita in un volume di 10 µl così costituiti: 20 ng di DNA genomico, 1X Buffer (Roche), BSA 2 ng, 1mM di dNTPs, primer 0,06 pmol Forward e Revers e 0,5 U di Taq DNA polimerasi (Roche). Le condizioni di PCR hanno previsto uno step iniziale di denaturazione di 94°C per 5 min, seguivano 45 cicli ciascuno di 94°C per 1 min, 56°C per 1 min e 72°C per 3 min, infine uno step di polimerizzazione di 72°C per 9 min.

I prodotti PCR ottenuti sono stati separati, mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio, al 2% (p/v) in tampone TAE (Sambrook *et al.*, 2001).

**Tabella 4.2** Elenco dei 18 loci SSR utilizzati per la *fingerprinting* del DNA.

Locus SSR	Motivo ripetuto	Sequenza primer (5'-3')	Marcatura	Ta	Range atteso (bp)
DCA 3	(GA) <sub>19</sub>	CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC TGCTTTTGTCTGTTTGGAGATGTTG	PET	50°C	228-250
DCA9	(GA) <sub>23</sub>	AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTCG GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	PET	55°C	161-205
DCA11	(GA) <sub>26</sub> (GGGA) <sub>4</sub>	GATCAAACACTGCACGAGAGAG TTGTCTCAGTGAACCCCTTAAACC	FAM	50°C	125-161
DCA15	(CA) <sub>3</sub> G(AC) <sub>14</sub>	GATCTTGTCTGTATATCCACAC TATACCTTTTCCATCTTGACGC	FAM	50°C	242-266
DCA16	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>29</sub>	TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	FAM	50°C	120-178
DCA 17	(GT) <sub>9</sub> (AT) <sub>7</sub> AGATA(GA) <sub>38</sub>	GATCAAATTCTACCAAAAATATA TAAATTTTTGGCACGTAGTATTGG	FAM	51°C	100-180
DCA18	(CA) <sub>4</sub> CT(CA) <sub>3</sub> (GA) <sub>19</sub>	AAGAAAGAAAAGGCAGAATTAAGC GTTTTGCTCTCTACATAAGTGAC	NED	50°C	168-184
GAPU45	(AG) <sub>7</sub>	ATCGGGAGGGATGTGATGTA CATCGCATCGCCTGTAAATA	TAMRA	56°C	292
GAPU 47	(CT) <sub>16</sub>	GATCAGCTTAGTCTCATATTCTCTCTC CCTCGACTGATTTACACACCA	FAM	50°C	167-215
GAPU59	(CT) <sub>9</sub>	CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA CAAAGGTGCACCTTCTCTCG	FAM	50°C	227
GAPU71B	GA(AG) <sub>6</sub> (AAG) <sub>8</sub>	GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA ACAACAAATCCGTACGCTTG	NED	56°C	150-125
GAPU101	(GA) <sub>8</sub> (G) <sub>3</sub> (AG) <sub>3</sub>	CATGAAAGGAGGGGGACATA CATGAAAGGAGGGGGACATA	NED	57°C	185-218
GAPU 103	(TC) <sub>26</sub>	TGAATTTAACTTTAAACCCACACA GCATCGCTCGATTTTTATCC	FAM	54°C	170-200
UDO99-011	CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>10</sub> (CT) <sub>2</sub> (CA) <sub>2</sub> CT(CA) <sub>2</sub> CT(CA) <sub>9</sub>	TGACTCCCTTTAAACTCATCAGG TGCGCATGTAGATGTGAATATG	NED	53°C	105-132
UDO99-019	(GT) <sub>20</sub> (AT) <sub>5</sub>	TCCCTTGTAGCCTCGTCTTG GGCCTGATCATCGATACCTC	PET	54°C	101-169
UDO99-024	(CA) <sub>11</sub> (TA) <sub>2</sub> (CA) <sub>4</sub>	GGATTTATTAAGCAAAACATACAAA CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA	FAM	50°C	175-189
UDO99-031	(TG) <sub>21</sub> (TATG)	TATCCTCTATGTGGCGATG TTGGTTAAAAGGATTGATACA	FAM	50°C	106-152
UDO99-043	(GT) <sub>12</sub>	TCGGCTTTACAACCCATTTT TGCCAATTATGGGGCTAACT	NED	54°C	179-219

**Note:** Ta: Temperatura di annealing; \*Ciascun primer forward utilizzato risulta marcato con un fluoroforo all'estremità 5'.

#### 4.3.2 Elettroforesi capillare dei prodotti di amplificazione SSR

Dopo aver verificato l'avvenuta amplificazione, i prodotti PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare, eseguita mediante sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente (Abi Prism 3100 Avant, Applied Biosystem), a seguito della quale per ciascun amplicone sono state calcolate le dimensioni di ciascun picco fluorescente.

L'altezza del segnale di ciascun picco e la dimensione allelica sono state calcolate per mezzo del software ABI Prism Genotyper 2.5 (v. 3.7) (Applied Biosystems) utilizzando un marcatore di peso molecolare interno al campione lo standard GeneScan 500 Liz (Applied Biosystems). Aliquote di 1  $\mu$ l di DNA amplificato sono state aggiunte a 8,7  $\mu$ l di formammide e 0,3  $\mu$ l di standard e caricate in piastre con 96 pozzetti, sottoposti ad elettroforesi capillare. La durata di ogni corsa è stata di circa 45 minuti eseguita ad un voltaggio di 15 kV e ad una temperatura di 60°C, utilizzando come matrice sintetica il polimero POP4 (Applied Biosystems).

#### 4.3.4 Analisi dei dati

L'analisi dei dati, è stata effettuata con il software Genotyper. Tale software importa i risultati di GeneScan per poi elaborare attraverso algoritmi, l'elettroferogramma finale costituito dai picchi corrispondenti agli alleli amplificati. I picchi ottenuti, per ciascun campione sottoposto ad elettroforesi capillare, possono avere differente altezza a seconda dell'intensità del segnale emesso dai frammenti amplificati marcati, la cui dimensione allelica è espressa in paia di basi (bp). Le dimensioni dei picchi fornite dalla macchina, sono state opportunamente arrotondate al numero intero più vicino in maniera omogenea fra i campioni, in base al tipo di unità di base che costituisce il "core" di ciascun locus SSR. Il set di dati così ottenuto è stato sottoposto ad analisi genetica mediante l'uso del software GeneAlex 6 (Genetic Analysis in Excel), con il quale sono stati calcolati i principali parametri necessari per stimare la variabilità genetica: il numero di alleli ( $N_a$ ) ottenuto per ogni locus SSR, che è ovviamente un numero naturale uguale o maggiore di 1; il numero effettivo di alleli ( $N_e$ ), la cui formula è  $N_e = 1 / \sum p_i^2$ ; l'indice di informazione (I), la cui formula è  $I = - \sum p_i \ln p_i$ , dove  $\ln$  rappresenta il logaritmo naturale e  $p_i$  è la frequenza dell' $i$ -esimo allele; l'eterozigosità osservata ( $H_o$ ) di formula  $H_o = N_{het} / N$  dove  $N_{het}$  rappresenta il numero di eterozigoti ed  $N$  si riferisce al numero di campioni analizzati; l'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) o diversità genetica, di formula  $H_e = 1 - \sum p_i^2$  dove  $p_i$  è la frequenza dell' $i$ -esimo allele; l'indice di fissazione (F) di Wright di formula  $F = 1 - H_o / H_e$ , dove  $H_e$  è l'eterozigosità attesa e  $H_o$  è l'eterozigosità osservata; il potere discriminante (D) di ciascun locus SSR, la cui formula è  $D = 1 - C_j$ , dove con  $C_j$  si definisce la probabilità di confusione, che consente di calcolare l'attendibilità dei dati, la cui formula è  $C_j = 1 - \sum p_i (N \cdot p_i - 1) / N$  dove  $N$  è il numero dei campioni. La distanza genetica della corda di Nei (Nei *et al.*, 1983) è stata calcolata mediante l'uso del software MSA (Microsatellite Analyser). L'albero filogenetico calcolato sulla base della matrice di dissimilarità genetica, ottenuto mediante l'algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal 1973) è stato calcolato mediante l'utilizzo del programma MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

#### 4.4 Metodi usati per la costruzione di *core subset*

Per la costruzione di *core subset*, sono stati usati differenti metodi. Per ogni metodo, sono stati costruiti 5 *core subset*, di dimensioni diverse, rispettivamente con il 5%, 10%, 20%, 30%, 40% del numero totale di accessioni (378) della collezione iniziale, mediante l'uso dei programmi MSTRAT, PowerMarker e Core Hunter. L'M-strategy proposta da Schoen e Brown (1993), è stata applicata mediante l'uso del programma MSTRAT (Gouesnard *et al.*, 2001). Il programma MSTRAT utilizza un algoritmo che si basa su di un processo interattivo di massimizzazione del numero di alleli. A

partire dal numero totale di accessioni dell'intera collezione, dapprima è stato scelto a caso un *core subset* di accessioni e successivamente ciascuna accessione è stata eliminata a turno al fine di identificare il *core subset* con il più alto livello di ricchezza allelica. Come secondo criterio di massimizzazione, è stata utilizzata, la diversità genetica di Nei (Nei, 1987). Entrambi le fasi sono state ripetute fino a che la ricchezza allelica della collezione non è stata ottimizzata. Un secondo metodo usato è stato l'algoritmo di *annealing* simulato (SA), implementato mediante il software "PowerMarker versione 3.0 software" (Liu e Muse, 2005). Tale metodo consente di selezionare a caso un *core subset* di accessioni a partire dall'intera collezione, massimizzando il numero di alleli. Il terzo metodo usato in questo studio, è stato il *Core Hunter*, che usa un algoritmo basato su un metodo di ricerca locale stocastico (Thachuk *et al.*, 2009). Un recente studio ha dimostrato che tale programma permette di trovare il migliore *core subset* rispetto agli altri metodi utilizzati, quando l'obiettivo è quello di ottimizzare una singola misura genetica (Thachuk *et al.*, 2009). Attraverso l'algoritmo *Core Hunter*, è possibile costruire, rispetto agli altri metodi, *core subset* che conservano tutti gli alleli unici presenti nella collezione iniziale (Thachuk *et al.*, 2009). Attraverso il software Core Hunter pertanto, è stato possibile applicare una strategia singola che massimizza separatamente l'eterozigosità attesa (He) ed il numero effettivo di alleli (Ne) ed una strategia mista che congiuntamente massimizza il 50% della distanza genetica di Rogers modificata (MR) ed il 50% del numero effettivo di alleli (Ne).

#### 4.5 Differenti distanze genetiche ed indici di diversità analizzati

Per valutare la migliore fra le strategie utilizzate e la qualità di ciascun *core subset* costruito, mediante il software Core Hunter v.1.0b è stata calcolata la distanza genetica fra coppie di accessioni: la distanza genetica di Rogers modificata (MR) e quella di Cavalli Sforza ed Edwards (CE); tre indici di diversità: l'indice della diversità di Shannon (SH), l'eterozigosità attesa (He) ed il numero di alleli effettivi (Ne) e due variabili ausiliari: la percentuale di alleli non informativa (PN) e la percentuale di copertura (CV). Il software Core Hunter ha permesso di ottimizzare ciascuna misura genetica in maniera indipendente. Di seguito è riportata la definizione delle misure genetiche analizzate, dove  $L$  rappresenta il numero di loci SSR,  $n_i$  è il numero di alleli al locus  $l^{th}$  ed  $A$  è il numero di alleli all'interno della collezione ( $A = \sum_{i=1}^L n_i$ );  $P_a$  è la frequenza relativa dell'allele  $A$ , mentre  $P_{la}$  rappresenta la frequenza relativa dell'allele  $a^{th}$  al locus  $l^{th}$  e  $P_{xla}$  rappresenta la frequenza relativa dell'allele  $a$  al locus  $l$  per il genotipo  $x$ . Le sette misure genetiche analizzate sono definite come segue:

1. La distanza genetica di Rogers modificata (MR) tra coppie di genotipi  $x, y$  (MR<sub>xy</sub>)

$$0 \leq MR_{xy} = \frac{1}{\sqrt{2L}} \sqrt{\sum_{l=1}^L \sum_{a=1}^{n_l} (P_{xla} - P_{yla})^2} \leq 1, \text{ dove } P_{xla} \text{ è la frequenza stimata dell'allele } a \text{ al locus } l, \text{ del genotipo } x; L \text{ è il numero di loci SSR ed } n_l \text{ il numero di alleli al locus } l^{th};$$

2. La distanza di Cavalli-Sforza e Edwards distance (CE) fra coppie di genotipi  $x, y$

$$(CE_{xy}) \text{ è } 0 \leq CE_{xy} = \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (1 - \sum_{a=1}^{n_l} \sqrt{P_{xla} - P_{yla}})} \leq 1;$$

3. L'indice di diversità di Shannon (SH) dell'accessione è  $SH = \frac{1}{A} \sum_{a=1}^A P_a \ln(P_a)$  dove  $A = \sum_{i=1}^L n_i$  è il numero totale di alleli nello specifico campione, e  $P_a$  è la frequenza dell'allele  $a^{th}$  rispetto all'intero campione  $\sum_{a=1}^A P_a = 1$ ;
4. La percentuale attesa di loci eterozigoti per individuo ( $He$ ) è  $0 \leq He = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L (1 - \sum_{a=1}^{n_i} P_l a^2) \leq 1$ .  $He$  è una misura composta che somma la variazione genetica a livello allelico (Berg and Hamrick, 1997) ed è calcolata come media del valore di  $He$  per ogni locus SSR;
5. Il numero di alleli effettivo ( $Ne$ ) è  $1 \leq \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L (\sum_{a=1}^{n_i} P_l a^2)^{-1}$ , misura il numero di alleli ad ogni locus SSR permettendo il raffronto della diversità allelica tra i loci indipendentemente dalla distribuzione della frequenza allelica;
6. La proporzione di alleli non informativi nel *core subset* (PN) è una variabile usata per misurare la proporzione di alleli persi nel *core subset* rispetto agli alleli presenti nella collezione iniziale
7. La misura della copertura degli alleli nel *core subset* (CV) è una variabile usata per misurare la percentuale di alleli trattenuti nel *core subset* rispetto alla collezione iniziale. La formula per misurare questa variabile è la seguente:  $CV = 100(1.0 - PN)$ . CV è definito come l'opposto del valore PN.

Pertanto il miglior *core subset*, fra i cinque costruiti, deve fornire il più alto valore della distanza genetica media fra coppie di genotipi (calcolata come MR e CE), il più alto valore della ricchezza allelica (calcolata come SH,  $He$  ed  $Ne$ ), la più bassa percentuale di alleli non informativi (PN) e il più alto valore di copertura allelica (CV).

#### 4.6 Analisi statistica

Per i cinque *core subset*, aventi dimensioni diverse e costruiti con i tre metodi comparati descritti nel paragrafo 4.4, è stato calcolato l'indice di Nei (Nei, 1987). L'indice di Nei è stato usato come secondo criterio per la selezione del migliore *core subset*, fra tutti quelli costruiti ed aventi lo stesso numero di alleli rappresentati. Tale indice è così definito  $I_{Nei} = 1 - \sum p_{ij}^2$  dove  $p_{ij}$  è la frequenza dell'allele  $i$  al locus  $j$ . Mentre l'indice della diversità di Nei per tutti i loci SSR è dato dalla somma degli indici a ciascun locus ( $I_{Nei} = \sum_j I_{Nei}^2$ ). Per tanto più le frequenze alleliche sono equilibrate nei *core subset* e più alto risulta il valore dell'indice di Nei. Allo stesso tempo sono stati calcolati, per ciascuna delle cinque *core subset* costruite: il numero di alleli; l'eterozigosità osservata ( $Ho = \text{numero di eterozigoti} / \text{numero di campioni}$ ); la percentuale della diversità totale di SSR per ogni *core subset* rispetto al 100% della collezione iniziale e la percentuale della diversità ristretta di SSR per ogni *core subset*, comparata al 100% della collezione originale (solo prendendo in considerazione gli alleli con frequenze più alte dello 0,05%). E' stata inoltre comparata la frequenza degli SSR trovata ad ogni *core subset* con quella trovata nella collezione iniziale usando il coefficiente di correlazione  $R^2$ .

#### 4.7 Real time PCR per l'identificazione dei principali patogeni in olivo

Sono state analizzate 174 piante di olivo propagate vegetativamente, appartenenti a genotipi di distinte aree geografiche, presenti nella banca di germoplasma mondiale

di Cordoba. Per l'identificazione dei seguenti patogeni e virus: *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e virus: *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) sono stati preparati gli estratti di piante di olivo, come precedentemente descritto da Bertolini *et al.*, (2003). Per l'identificazione dei virus, gli estratti sono stati preparati a partire da materiale legnoso (rami) della lunghezza di 10 cm; mentre a partire dalle foglie sono stati preparati gli estratti per l'identificazione di *Pseudomonas* e del fungo *Verticillium*.

Sia i rami, tagliati in piccoli pezzi (ca 3-4 g), che le foglie (5-6 g) sono stati riposti in borse di plastica (Plant Print Diagnostic, Valencia, Spain), a cui è stato aggiunto 1/20 (p/v) di Tampone fosfato a pH 7.2 così costituito da: 2% (p/v) di polivinilpirrolidone (PVP-10) (Sigma, Steinheim, Germany) e 0.2% (v/v) di sodio dietil ditiocarbamate (DIECA) (Sigma). La macerazione del materiale vegetale è avvenuta mediante un martello. Per le foglie, dopo la macerazione, è stata eseguita una fase di incubazione in ghiaccio di 30 minuti. Aliquote di 200-1000 µl dell' estratto ottenuto sono state utilizzate per l'estrazione dell'RNA o del DNA. Il primo è stato isolato mediante il kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen) mentre il secondo è stato ottenuto con il kit "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen). Le sequenze nucleotidiche delle coppie di primer utilizzate per l'individuazione dei patogeni indicati sono indicate in Tabella 4.3.

**Tabella 4.3:** Sequenze nucleotidiche dei primer specie specifici usati per la Real Time PCR.

Organismo	Nome	Nome Primer	Sequenze Primer (5'-3')	Ta
<i>Verticillium dahliae</i>	VD	VMSP1	5'-CATAAAAGACTGCCTACGCCG-3'	60°C
		VMSP2	5'-AAGGGTACTCAAACGGTCAG-3'	
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	PSS	IAALN1	5'-CTCCCTCTCCAACGCTTTC-3'	57°C
		IAALN2	5'-GCCTGATGATTTTCTTCTG-3'	
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	CMV i1	5'-ACTATTAACCAACCAACCT-3'	50°C
		CMV i2	5'-TTTGAATGCGCGAAACAAG-3'	
<i>Cherry leaf roll virus</i>	CLRV	CLRV i1	5'-GTTAACGAATATCTACTGC-3'	50°C
		CLRV i2	5'-CAAATATTGCTAAACAACC-3'	
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	SLRSV	SLRSV i1	5'-TGGCCTTTATTGGTTGGAT-3'	50°C
		SLRSV i2	5'-ATCTGCCACTGATTCTCAC-3'	
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV	ArMV i1	5'-AATTATATGCTGAGTTTGAG-3'	50°C
		ArMV i2	5'-AAAATTATACACCTTATGAGTA-3'	

**Note:** Ta: temperatura di annealing

L'apparecchio IQ™-5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) è stato usato per le amplificazioni real-time PCR qualitative. Per monitorare la presenza del DNA del fungo *Verticillium* e del batterio *P.savastanoi* è stata allestita una reazione di Real Time PCR in un volume di 25 µl contenenti 12,5 µl di 1x Syber Green (Applied Biosystems), 0,3 µM di ciascun primer acqua a volume e 5 µl di DNA target (30 ng) diluito 10 volte. La qRT PCR dei virus *CMV* e *CLRV* è stata eseguita in un volume di 25 µl contenenti: 5 µl di RNA target, 12,5 µl di 1X Syber Green (Applied Biosystems), 0,9 µM di primer Fw, 0,05 µM di primer Rv, 0,12 µl di MultiScribe RT (Applied Biosystems), 0,5 µl di Rnase Inhibitor (Applied Biosystems) ed acqua a volume. Mentre per i virus *SLRSV* la reazione di qRT PCR è stata eseguita in un volume di 25 µl contenente i seguenti reagenti: 5 µl di RNA target, 12,5 µl di 1X Syber Green (Applied Biosystems), 0,05 µM di primer Fw e 0,9 µM di primer Rv 0,12 µl di MultiScribe RT (Applied Biosystems), 0,5 µl di Rnase Inhibitor (Applied Biosystems). Per il virus *ArMV* la reazione di retrotrascrizione è stata eseguita in 25 µl, utilizzando le stesse concentrazioni dei reagenti descritte per gli altri tre virus, con l'unica

differenza che sono stati impiegati le seguenti concentrazioni di primer: 0,476  $\mu$ M di primer Fw e Rv. Le condizioni di amplificazione utilizzate per la Real Time PCR per l'identificazione dei patogeni che dei virus, sono riportate in Tabella 4.4.

**Tabella 4.4:** Condizioni di amplificazione della Real Time PCR per l'identificazione dei patogeni e virus in olivo.

Real Time PCR	<i>Verticillium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>CMV</i> e <i>CLRV</i>	<i>SLRSV</i> e <i>ArMV</i>
1 ciclo	95°C x 10 min	95° C x 10 min	48° C x 30 min	48° C x 30 min 95° C x 10 min
X 45 cicli	95°C x 15 sec 60°C x 1 min	95° C x 15 sec. 50° C x 15 sec 60°C x 45 sec	95° C x 15 sec 50° C x 15 sec 60° C x 45 sec	95° C x 15 sec 50° C x 15 sec 60° C x 45 sec
<b>Curva di dissociazione</b>				
	95°C x 5 sec 60°C x 1 min 97°C x 15 sec	95°C x 5 sec 60°C x 1 min 97°C x 15 sec	95°C x 15 sec 60° C x 1 min 95°C x 15 sec	95°C x 15 sec 60° C x 1 min 95°C x 15 sec

**Note:** *Arabis mosaic virus (ArMV)*, *Cherry leaf roll virus (CLRV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Strawberry latent ringspot virus (SLRV)*.

Con il programma IQ™-5 optical system, sono state analizzate le distinte temperature delle curve di dissociazione, applicando un protocollo di dissociazione al termine di ciascuna PCR completa. I campioni sono stati considerati positivi quando la variazione nella fluorescenza del sybr green rispetto al referente passivo ROX ( $\Delta R_n$ ) supera un valore base stabilito arbitrariamente (Weller *et al.*, 2000). Nell'analisi delle curve di dissociazione, i grafici della variazione della fluorescenza in funzione della temperatura sono stati convertiti in curve della derivata della fluorescenza rispetto alla derivata della temperatura ( $-dF/dT$ ), per facilitare la visualizzazione dei picchi e la temperatura di dissociazione dei prodotti PCR (Lyon *et al.*, 2001). Pertanto valutando l'andamento delle curve di amplificazione di ciascun campione in esame, sono stati considerati positivi quei campioni che hanno fornito curve di amplificazione con un valore di Ct vicino a quello del controllo positivo utilizzato ed una temperatura di melting uguale o di un grado superiore o inferiore rispetto a quella del corrispettivo controllo positivo.

#### 4.8 Analisi di similarità e annotazione funzionale

La libreria sottrattiva di cDNA, già presente in laboratorio è stata costruita mediante l'uso della tecnica SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*), usando come *tester* mRNA di drupe attaccate dalla mosca con galleria larvale, e come *driver* mRNA di drupe sane della cultivar di olivo 'Moraiolo'. Le sequenze EST isolate dalla libreria sottrattiva sono state assemblate in cluster di contigui, mediante il software CAP3 (Huang e Madan, 1999); le sequenze non formanti contigui sono state considerate singoletti. I criteri di valutazione delle sequenze formanti contigui descritti da Liang (2000) e Pertea (2003) sono stati i seguenti: lunghezza minima della sovrapposizione (40 bp); percentuale minima di identità fra le sequenze sovrapposte (95%) e lunghezza delle sporgenze non corrispondenti (30 bp). Per assegnare una putativa funzione ai diversi trascritti, è stata effettuata l'analisi di similarità locale, eseguita per confronto tra le sequenze di interrogazione e i trascritti omogenei disponibili in banca dati NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mediante l'algoritmo di allineamento locale tblastx. Il livello di similarità di sequenza fra il clone e la sequenza nota della banca dati, è stato espresso dal valore e. Il livello di valore e < 0,001 è stato considerato il valore



limite di similarità locale significativo ed accettabile. L'annotazione funzionale è stata eseguita utilizzando il software Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005).

## **4.9 Analisi di espressione differenziale mediante Real Time PCR**

### **4.9.1 Sintesi del primo filamento di cDNA**

L'RNA totale è stato estratto da 100 mg di materiale polverizzato con azoto liquido a partire da drupe sane (pianta controllo o calibratore) e da 100 mg di drupe attaccate dalla mosca dell'olivo, secondo quanto riportato nel kit "RNeasy plant Mini Kit" (QIAGEN, USA). L'RNA estratto è stato diluito 100 volte con acqua sterile e quantificato mediante analisi allo spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf) alla lunghezza d'onda di 260 nm. La valutazione della qualità è stata eseguita mediante separazione elettroforetica in gel di agarosio (1,2% p/v) in condizioni denaturanti in 1x TAE Buffer (Sambrook *et al.*, 1989). Prima della corsa, ciascun campione è stato incubato alla temperatura di 65°C per 5 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 20 µl di buffer denaturante (400 µl di formammide, 400µl di formaldeide 37%, 1,2µl di bromuro di etidio 10mg/ml, 5 µl di loading buffer). La separazione elettroforetica è stata ottenuta mediante l'applicazione di una differenza di potenziale di 60 Volt per 30 minuti in gel di agarosio 1% (p/v) (Sambrook *et al.*, 1989).

Successivamente l'RNA estratto è stato trattato con l'enzima DNase I ai fini di eliminare possibili contaminazioni residue di DNA genomico e retroscritto ad mRNA per la sintesi del primo filamento di cDNA.

### **4.9.2 Trattamento dell'RNA estratto con DNase I**

Per ogni campione di RNA sono state allestite reazioni dal volume finale di 30 µl contenenti: 10 µg di RNA, 3 unità di enzima DNase I, 1X di DNase I Reaction Buffer (New England, BioLabs) (10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.6) ed acqua bidistillata sterile RNase free a volume. I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti. Dopo incubazione, si è proceduto con la precipitazione degli acidi nucleici, bloccando l'attività DNasica tramite l'aggiunta di 0,1 volumi di 3M Acetato di Sodio (pH 7,0) e di 2,5 volumi di 100% etanolo, incubando alla temperatura di -80°C per 10 minuti. Successivamente i campioni sono stati centrifugati alla velocità di 14000 rpm per 20 minuti (4°C). Il pellet ottenuto è stato lavato con 100 µl di etanolo 70% e centrifugato a 14000 rpm per 20 minuti. Alla fine il pellet è stato risospeso in 22 µl di acqua sterile RNase free.

Prima di procedere con la sintesi del primo filamento di cDNA, l'RNA "DNA-free" è stato quantificato tramite lettura dei campioni allo spettrofotometro (paragrafo 4.4).

### **4.9.3 Retrotrascrizione dell'mRNA**

Per la sintesi del primo filamento di cDNA è stato utilizzato il kit "Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit" (Fermentas). Per ogni campione di RNA DNA-free sono stati prelevati 2 µg e portati ad un volume di 10 µl. Successivamente sono stati aggiunti 1 µl di oligo d(T)<sub>18</sub> primer (0,5 µg/µl) e 1 µl di acqua bidistillata sterile trattata con DEPC. I campioni sono stati incubati a 70°C per 5 minuti e posti in ghiaccio. Quindi sono stati aggiunti 4 µl di 5X Reaction Buffer (250 mM TrisHCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 2 µl di Ribolock Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl) e 2 µl di dNTPs mix (10 mM). Ad ogni campione è stato aggiunto 1 µl di enzima

Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μl). Successivamente i campioni sono stati sottoposti a due fasi di incubazione consecutive: 1 ora a 42°C e 10 minuti a 72°C. I campioni di cDNA ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

#### 4.9.4 PCR

Per verificare la qualità del cDNA sintetizzato e la sua amplificabilità, sono state eseguite reazioni di amplificazione utilizzando la coppia di primer che amplifica l'Elongation Factor-1α (FJ715703.1), utilizzato come standard interno per normalizzare la quantità di cDNA (Tabella 4.6). La sequenza di EF1-α di olivo è stata ottenuta amplificando cDNA di frutti di olivo con oligonucleotidi degenerati disegnati su regioni conservate in altre specie vegetali e sequenziando il prodotto di amplificazione. Oligonucleotidi specifici per EF1-α di olivo sono stati disegnati sulla sequenza ottenuta ed utilizzati per la normalizzazione dei campioni. Per le reazioni di amplificazione è stato utilizzato cDNA diluito 1:20 e per ogni reazione ne sono stati usati come template 4μl. In un volume di 20 μl sono state impiegate 0,5 unità di Taq polimerasi (Promega), 0,3 μM di primer forward e reverse, 1X di Buffer (Promega), 1,5mM di MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM di dNTPs ed acqua bidistillata sterile a volume. Il ciclo di amplificazione ha incluso una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 5 minuti, seguita dai cicli di amplificazione indicati nella Tabella 4.5. Le reazioni, infine, hanno incluso una fase finale a 72°C per 9 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio 1% (p/v) in Buffer 1X TAE (Sambrook *et al.*, 1989), applicando una differenza di potenziale di 70 Volt per 40 minuti. Al termine dell'elettroforesi, gli amplificati sono stati visualizzati tramite esposizione ai raggi UV del transilluminatore UV Transilluminator 2000 (BIORAD). Le foto dei gel sono state effettuate utilizzando il "Gel Logic 100 IMAGING SYSTEM" (KODAK).

**Tabella 4.5:** Sequenze oligonucleotidiche dei primer usati per l'amplificazione del gene EF1-α

Primers	Sequenza (5' – 3')	Gene	N° accessione	L.A.	Ciclo di amplificazione		
EF1- α For	TGCACAGTTATTGATGCTCCA	EF1-α	FJ715703.1	420	94°C	58°C	72°C
EF1- α Rev	GGGCTCCTGAATCTGGTCAA				30"	30"	45
					35 volte		

L.A.: Lunghezza in bp dell'amplicone.

#### 4.9.5 Real Time PCR (qRT-PCR)

Le reazioni di amplificazione sono state allestite in un volume finale di 20 μl contenenti 4 μl di cDNA, 10 μl di 2X SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e ciascun primer alla concentrazione di 300 nM. Il programma di amplificazione utilizzato comprendeva una fase di denaturazione ( 95°C, 10 sec) seguita da 40 cicli di amplificazione: 95°C 15 sec; 58°C, 1 min; 72°C 10 sec; 1 ciclo di 95°C, 1 min; 55°C, 30 sec; 95°C 30 sec.

L'analisi è stata effettuata con il sistema ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). L'Elongation Factor-1α, è stato utilizzato come controllo endogeno interno e rispetto ad esso è stata effettuata la prima delle due normalizzazioni previste dal metodo del Ct comparativo (Livak *et al.*, 2001). In Tabella 4.6 si riportano le sequenze oligonucleotidiche delle coppie di primer utilizzate per l'analisi di espressione Real Time PCR e le rispettive temperature di annealing.

**Tabella 4.6:** Sequenze oligonucleotidiche dei primer usati per la quantificazione relativa tramite Real-Time PCR.

Primer	Sequenza (5' – 3')	Gene	Tm	L. P	% GC	L.A.	Ta
CHIT-For	TTGAATGCGGTAAAGGTTCTGA	Chitinasi classe I	59	21	43	91	58
CHIT-Rev	GGGCCATAGCCAACCTCCAA		59	19	58		
EF1-For	TGCACAGTTATTGATGCTCCA	EF-1 $\alpha$	59	20	60	400	58
EF1-Rev	GGGCTCCTGAATCTGGTCAA		58	19	58		
C4H-For	CGGCATTACTTTGGGACGTTT	Cinnamato-4-idrolasi (C4H)	60	21	48	101	59
C4H-Rev	GCAGACTGAATTGGCCACCT		59	20	55		
TMV-For	CTACGTGGAGGTGACGACGA	Proteina indotta da TMV	58	20	60	81	60
TMV-Rev	TCCGTAGCTAACCATTGCTCG		59	21	52		
TCI-For	TGTTGTGATACGTGCCTTTGC	Inibitore di tripsina/chimotripsina	58	21	48	91	58
TCI-Rev	CATTTGTCGCATGCAGAGTGA		59	21	48		
CS-For	GCTGGCCAATTTATGAAGCC	Cellulosa sintasi	50	20	58	91	55
CS-Rev	ACCCATGCAAAGGAAACTGAA		43	21	58		
AQ-For	TCTCGGGCCCTTGTTTTAGA	Acquaporina (PIP2;1)	58	20	50	91	56
AQ-Rev	AAAGAGAGGCCAGCAACCG		59	19	58		
TIO-For	AGAGGGACAGGTTATCGGCTG	Tioredoxina di tipo H	59	21	57	110	58
TIO-Rev	CCACACCACGAAGCTGTGAA		59	20	55		
PR27-For	CCCAGAAGATCAACGAAGTAGGTG	Proteina correlata alla patogenesi (NtPRp27)	60	24	50	110	58
PR27-Rev	GACCGCACGATTCTTGATT		59	20	50		
$\beta$ -GLU-For	TTGCCAAAACGTTTCAGCTGT	$\beta$ - glucosidasi	58	20	45	110	58
$\beta$ -GLU-Rev	GCCTCTAAGCCTTTTACGACGAT		59	23	48		
LOX-For	CGGGTTGGACAGTGAATGT	Lipossigenasi	59	20	55	90	60
LOX-Rev	TTGACACACTGTTGGGAATTCC		58	22	45		
GST-For	CTTTTCGATGAACGCCCTCA	Glutatione-S-trasferasi (GST)	60	20	50	91	59
GST-Rev	AACGCTTCGTCAATTGCAACA		59	20	45		

CHIT II-For	TCGACTCCATGAACATCATCG	Chitinasi di classe II	58	21	48	111	58
CHIT II-Rev	GAGCCTGTTCGGCACAGGT		60	19	63		
UP1-For	GCATTGGTCAGTATAATGCATCCT	Unknown protein 1	58	24	42	110	58
UP1-Rev	GGAAGCAGCAACACTTTTTCAA		58	22	41		
UP2-For	CGACGAACTTCACTCAGCCA	Unknown protein 2	59	20	55	110	59
UP2-Rev	TCCGCCTTCTCTTCACTGATC		58	21	52		
SOD- For	TGGTGGAAGAGTTGCTTGTGG	Superossido Dismutasi	60	21	52	110	60
SOD- Rev	TGATGACCGAGTTTGTACACAGTG		59	24	46		
CAT-For	CCGAAAATGGGTAGATGCTTTATC	Catalasi	59	24	42	110	58
CAT-Rev	GAGGCGAGCTTCTGACCAAG		59	20	60		

T<sub>m</sub>: temperatura di melting (è stata calcolata risolvendo la formula  $4(G+C) + 2(A+T)$ ); T<sub>a</sub>: temperatura di annealing; %GC: percentuale di coppie GC presenti nel primer. L.P. = Lunghezza primer. L.A. = Lunghezza amplicone.

#### 4.10 Amplificazione rapida delle estremità di cDNA (3' e 5' RACE)

La 5'RACE è stata effettuata mediante l'uso del kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen). La retrotrascrizione è stata eseguita a partire da 5 µg di RNA totale mediante l'enzima SuperScript-II utilizzando 0,5 µg di primer gene specifico (PR27: 5'- GGAGCTTGACCATTTCCA-3'; Chitinase: 5'- CCAATCCTGTCTTCCATTTG-3') Dopo un'incubazione di 2h a 42°C è avvenuta la sintesi del secondo filamento, effettuata tramite reazione PCR con l'oligonucleotide AUAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGG-IIG-3'; Invitrogen) e l'oligonucleotide gene specifico (PR27: 5'- TGATCTCCGTTTTTCACATCACCA-3'; Chitinase: 5'-GTTCGAACCTTTACCGCATTCAA-3') applicando le condizioni di reazione indicati nel manuale. La reazione di amplificazione ha previsto le seguenti fasi: 94°C 3 min; 40 cicli di 94°C 30 sec; 55°C 1 min; 72°C 2 min; un ciclo di elongazione finale a 72°C 10 min.

La 3'RACE è stata eseguita mediante il kit "3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen). A partire da 5 µg di RNA totale è stata seguita la retrotrascrizione mediante l'uso dell'enzima SuperScript-II, utilizzando 0,5 µg di primer AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; Invitrogen). La reazione PCR è stata eseguita mediante l'uso del primer AUAP (Invitrogen) e l'oligonucleotide gene specifico (PR27: 5'- ATGTTTTGGGGCTTTCAATTTCC; Chitinase: 5'- CCAACATCATCAATGGTGGGA-3', applicando le seguenti fasi di amplificazione: 94°C 3 min; 40 cicli di 94°C 30 sec; 58°C 1 min; 72°C 2 min; un ciclo di elongazione finale a 72°C 10 min. I prodotti PCR così ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi orizzontale in gel di agarosio al 2% (p/v), purificati dal gel mediante l'uso del kit "QIAquick Gel Extraction kit" (Quiagen).

#### 4.11 Clonaggio nel vettoreTA e isolamento del DNA plasmidico

I prodotti PCR ottenuti sono stati clonati nel vettore plasmidico pGEM®-T easy (Promega) seguendo quanto riportato nel manuale di utilizzo del vettore. Le cellule chimicamente competenti di *E. coli* TOP10F'(Invitrogen) sono state utilizzate come cellule ospiti e trasformate mediante shock termico. I trasformanti sono cresciuti a 37°C O/N su piastre di LB-Ampicillina-XGAL-IPTG per la selezione in screening *blue-white* (Sambrook *et al.*, 1989). Dalle colonie bianche, positive alla selezione *blue-white*, è stato isolato il DNA plasmidico mediante il protocollo di lisi alcalina che prevede le seguenti fasi. Ciascuna colonia è stata inoculata in 3 ml di brodo di coltura LB (Sambrook *et al.*, 1989) contenente come antibiotico selettivo l'ampicillina (100mg/ml). Dopo 16 h di incubazione a 37°C in agitazione (200 rpm), 1,5 ml di coltura batterica sono stati centrifugati a 14000 rpm per 30 secondi. Successivamente, il pellet è stato risospeso in 100 µl di Soluzione I (50mM glucosio, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA), agitando vigorosamente. Dopo incubazione in ghiaccio per 5 minuti, sono stati aggiunti 200 µl di Sol II (0,2 M NaOH, 1% p/v SDS). Dopo incubazione in ghiaccio per 5 minuti sono stati aggiunti 150 µl di Sol III (60% 5 M Acetato di Potassio, 11,5% acido acetico). I campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il soprannatante ottenuto è stato trasferito in nuovi tubi, ai quali sono stati aggiunti 0,1 volumi di 3 M di Acetato di Sodio (pH 7,0) e 2,5 volumi di 96% etanolo. I campioni sono stati incubati a -80°C per 5 minuti e successivamente centrifugati a 14000 rpm per a 20 minuti a 4°C. Dopo aver eliminato il soprannatante il pellet è stato lavato con 70% etanolo e infine risospeso in 50 µl di acqua bidistillata. Per verificare la presenza dell'inserito e valutarne la sua

dimensione, il DNA plasmidico isolato è stato digerito mediante l'uso dell'enzima di restrizione EcoRI (Promega). La reazione di digestione è stata eseguita in un volume totale di 30 µl (300 ng DNA plasmidico, 10X Buffer, 6U di EcoRI, acqua a volume) mediante incubazione a 37°C per 30 minuti. Successivamente il DNA plasmidico è stato sottoposto a separazione elettroforetica orizzontale in gel di agarosio 1% (p/v).

#### **4.12 Sequenziamento dei plasmidi ricombinanti**

L'amplificazione PCR è stata effettuata utilizzando il kit "Big Dye RR terminator v.3.1 Cycle sequencing kit" (Applied Biosystems). La reazione è stata eseguita in un volume totale di 10 µl ed è così costituita: 200 ng di DNA, 3,2 picomoli del primer universale M13 Fw, 0,5X Buffer RR, 1µl BDT RR ed acqua a volume. La PCR di sequenza ha incluso una fase iniziale di denaturazione a 96°C per 1 minuto che è stata seguita da 25 cicli di amplificazione costituiti da una fase a 96°C per 10 secondi ed una fase a 50°C per 5 secondi. Dopo i cicli di amplificazione è stata eseguita una fase finale di polimerizzazione a 60°C per 4 minuti.

La fase di purificazione pre sequenziamento è stata eseguita mediante il kit "BigDye XTerminator Purification Kit" (Applied Biosystems). Il DNA plasmidico è stato sequenziato mediante l'uso degli oligonucleotidi universali T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3') ed SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAGAAT-3') ed analizzato al sequenziatore (ABI Prism 3130, Applied Biosystems). Le sequenze tradotte sono state poi confrontate, mediante l'algoritmo blastp (NCBI), con l'insieme delle sequenze proteiche depositate in banca dati, individuando la più significativa similarità locale con proteine di difesa in *Planta*. La predizione della localizzazione subcellulare delle putative proteine è stata effettuata mediante i software TargetP e iPSORT.

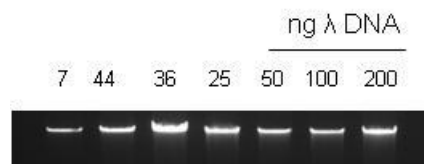
## 5. RISULTATI

### 5.1 Studio della diversità genetica delle varietà di olivo del Sud Italia mediante l'uso dei marcatori molecolari SSR

Gli obiettivi della seguente attività riguardano, sia la descrizione della diversità genetica esistente fra le varietà di olivo della regione Campania, sia lo studio della loro diversità in relazione ad altre varietà tradizionali di olivo, diffuse in diverse aree dell'Italia meridionale. In totale sono stati caratterizzati 47 genotipi di olivo mediante l'uso di sei marcatori SSR. Per ciascuna varietà è stato definito il profilo allelico dei 6 loci SSR selezionati utile sia per l'identificazione varietale che per la tracciabilità genetica degli oli di oliva monovarietali. La tracciabilità può contribuire a proteggere le colture tradizionali anche nell'ambito di filiere agroalimentari. La variabilità genetica e le relazioni fra varietà di olivo coltivate risultano complicate da diversi fattori come la diffusa autoincompatibilità, la possibile ibridazione con le forme selvatiche, la longevità della pianta di olivo e la sua capacità di sopravvivere anche in assenza di pratiche colturali. Pertanto la caratterizzazione della variabilità genetica di varietà di olivo coltivate è un importante requisito per la corretta conservazione di germoplasma di olivo. Infatti la longevità delle piante di olivo e la scarsità di un ricambio di genotipi, rendono possibile la conservazione di una antica ed ampia biodiversità, ad oggi solo parzialmente investigata. Considerando che in Italia solo di recente si assiste ad un ricambio con nuove varietà, è probabile che la diversità genetica presente nei materiali tradizionali abbia specificità regionali e caratteristiche di adattamento a specifiche condizioni ambientali e pratiche agronomiche. La conservazione di questo patrimonio genetico e la sua utilizzazione per la costituzione di nuovi genotipi rappresenta un importante traguardo dell'olivicoltura italiana. Inoltre, l'identificazione del germoplasma locale rappresenta il primo passo chiave per tracciare le materie prime della filiera olivo-olio e la protezione dei marchi di qualità, importanti per la protezione del "Made in Italy".

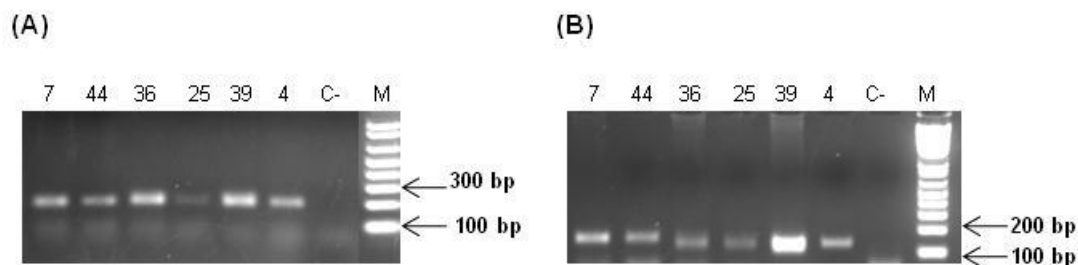
#### 5.1.1 Quantificazione ed Amplificazione del DNA estratto da foglia

Il DNA genomico è stato isolato dalle foglie di tutti i genotipi di olivo analizzati (Tabella 4.6) collocati nel campo sperimentale dell'azienda Se.S.I.R.CA (Settore Sperimentazione, Informazione, Ricerca e Consulenza in Agricoltura) (Battipaglia, SA). In Figura 5.1 è riportato un esempio di quantificazione del DNA genomico, mediante elettroforesi in gel di agarosio, in cui la quantità del DNA estratto è stata stimata per confronto visivo dell'intensità della banda del campione in esame con quella del DNA del fago lambda.



**Figura 5.1:** Quantificazione in gel di agarosio del DNA genomico estratto da foglia di quattro varietà di olivo. I codici identificativi dei genotipi sono riportati in Tabella 4.6 .  $\lambda$ 50:  $\lambda$  50 ng ;  $\lambda$ 100:  $\lambda$  100 ng ;  $\lambda$ 200:  $\lambda$  200 ng.

Per valutare l'avvenuta amplificazione dei frammenti di DNA dei campioni in esame a ciascuno dei sei loci SSR, è stata effettuata la separazione elettroforetica orizzontale in gel di agarosio. Di seguito sono riportati due esempi di profili elettroforetici ottenuti per 7 campioni di DNA estratti da foglia ed amplificati ai loci SSR DCA 3 e DCA16 (Figura 5.2).

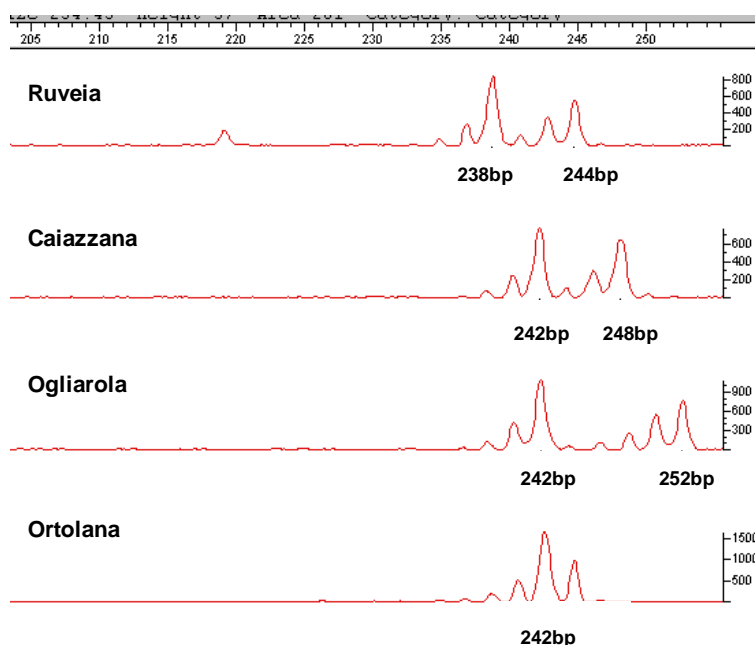


**Figura 5.2:** Esempio di separazione elettroforetica in gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ai loci DCA 3 (A) e DCA16 (B) ottenuti da DNA genomico estratto da foglie delle varietà di ulivo in analisi. I codici identificativi dei genotipi sono riportati in Tabella 4.1; C-: controllo negativo, miscela priva di template; M: 1kb plus ladder (Invitrogen).

I campioni amplificati mostrano frammenti di dimensioni attese, comprese fra 200 e 300 bp per il locus DCA 3 e fra 100 e 200 bp per il locus DCA16 (Sefc *et al.*, 2000).

### 5.1.2 Analisi dei profili SSR mediante elettroforesi capillare

Gli amplificati dei 47 genotipi sono stati separati mediante elettroforesi capillare per mezzo di un sequenziatore automatico ABI Prism 3100-*Avant*. In Figura 5.3 è riportato un esempio di tracciato elettroforetico, dei frammenti di DNA amplificati, per 4 campioni, al locus DCA 3. Il profilo elettroforetico mostra che a questo locus 3 cultivar sono eterozigoti ('Ruveia', 'Caiazzana' e 'Ogliarola') ed 1 è omozigote ('Ortolana')



**Figura 5.3 :** Esempio di profili allelici di 4 delle 47 varietà di ulivo analizzate al locus DCA3 monitorate mediante elettroforesi capillare. L'asse delle ascisse dell'elettroferogramma identifica la dimensione allelica (bp), l'asse delle ordinate indica l'intensità del segnale emessa dai picchi (RFU).



In Tabella 5.1 si riportano i profili ottenuti per i 47 genotipi amplificati ai sei loci SSR. Le dimensioni alleliche decimali, per ciascun genotipo sono state arrotondate omogeneamente alla cifra intera più vicina, tenendo presente il motivo di base ripetuto.

**Tabella 5.1:** Dimensione degli alleli (bp) per il totale dei genotipi di olivo analizzati ai 6 loci SSR

<b>CAMPIONI</b>	<b>DCA 3</b>		<b>DCA 4</b>		<b>DCA 16</b>		<b>DCA 17</b>		<b>UDO99-031</b>		<b>GAPU 47</b>	
Ascolana Tenera	228	246	130	160	122	152	108	110	106	106	193	193
Biancolilla	236	250	128	130	120	170	110	140	150	150	193	203
Carolea	230	252	128	162	122	152	110	176	108	110	193	203
Coratina	236	240	128	160	146	170	110	110	106	150	201	205
Dolce di Cerignola	240	250	128	128	122	146	108	112	110	150	195	205
Dolce di Settembre	240	250	128	160	146	170	108	110	106	110	187	193
Frantoio	234	240	130	130	146	152	140	140	138	142	193	203
Grossa di Cerignola	246	250	128	158	150	150	108	110	108	108	187	193
Itrana	236	246	128	160	120	122	108	110	108	150	193	205
Leccino	240	250	128	130	146	172	102	112	142	146	189	195
Moresca	242	246	188	188	146	170	112	112	108	110	193	203
Nocellara Etna	240	246	158	160	122	146	108	110	108	110	193	203
Nocellara Messinese	240	250	128	130	142	172	102	108	142	142	189	201
Pendolino	240	250	128	128	152	170	102	140	108	150	189	195
Picholina	228	250	156	160	144	172	100	110	106	150	195	205
Rotondella	240	246	186	186	146	172	110	136	106	150	201	201
Sant'Agostino	228	250	156	160	120	172	108	110	106	106	187	193
Tonda Iblea	242	248	162	186	148	172	110	180	110	110	189	189
Uova di Pavone	228	250	156	160	120	172	108	110	106	106	187	193
Zaituna	242	250	160	186	122	146	110	180	108	110	193	205
Ogliastro grande	230	250	128	160	152	166	152	166	108	138	193	205
Femminella	250	250	138	160	164	166	108	174	110	138	193	193
Pisciottana	230	238	128	138	150	152	104	112	108	138	193	193
Racioppa	230	250	152	160	150	152	174	180	108	108	189	189
Grossale	230	250	128	160	164	166	112	174	108	110	193	193
Provenzale	230	250	128	160	164	166	112	166	108	110	193	193
Sanginara	238	238	138	148	120	172	112	156	108	110	201	215
Ogliara	238	238	138	182	120	170	104	108	128	150	187	201
Oliva bianca	240	242	128	138	142	152	142	152	108	150	201	201
Salella	238	242	152	178	120	186	108	112	150	150	193	205
Cammarotana	238	246	nd	nd	120	122	108	112	nd	nd	193	193
Rotondella	230	240	128	184	142	146	142	152	138	150	189	201
Groia	238	238	148	148	120	166	104	108	128	150	187	201
Cornia	230	250	128	138	164	166	104	112	108	138	193	205
Ruveia	238	244	128	130	146	152	112	140	106	110	169	169
Racioppella	242	244	130	162	120	170	108	180	106	150	169	169
Caiazzana	242	248	128	162	120	152	122	180	110	130	169	173
Carpellese	236	242	128	130	146	146	120	140	142	146	169	173
Ogliarola	242	252	128	130	146	170	104	112	142	146	169	173
Tonda	230	242	128	128	146	146	108	178	138	152	169	191
Ortolana	242	244	128	128	120	170	112	180	108	150	169	179
Pampigliosa	242	244	128	162	120	170	108	110	108	150	169	187
Tenacella	238	242	130	138	146	146	122	140	144	150	167	167
Asprinia	230	242	162	186	146	146	110	112	142	150	167	167
Ortice	244	248	130	162	152	170	108	110	110	150	167	179
Ravece	242	244	130	138	120	152	110	112	138	150	169	169

\*nd: profilo allelico non determinato

### 5.1.3 Analisi della diversità genetica delle varietà di olivo dell' Italia meridionale

Le dimensioni alleliche dei profili ottenuti a ciascuno dei sei loci SSR analizzati, sono state impiegate per calcolare i principali indici genetici riportati in Tabella 5.2. Sono stati individuati un totale di 81 differenti alleli, con un valore medio di  $13,5 \pm 0,91$  (media  $\pm$  Errore Standard) alleli per locus. Il locus DCA 17, ha mostrato il numero di

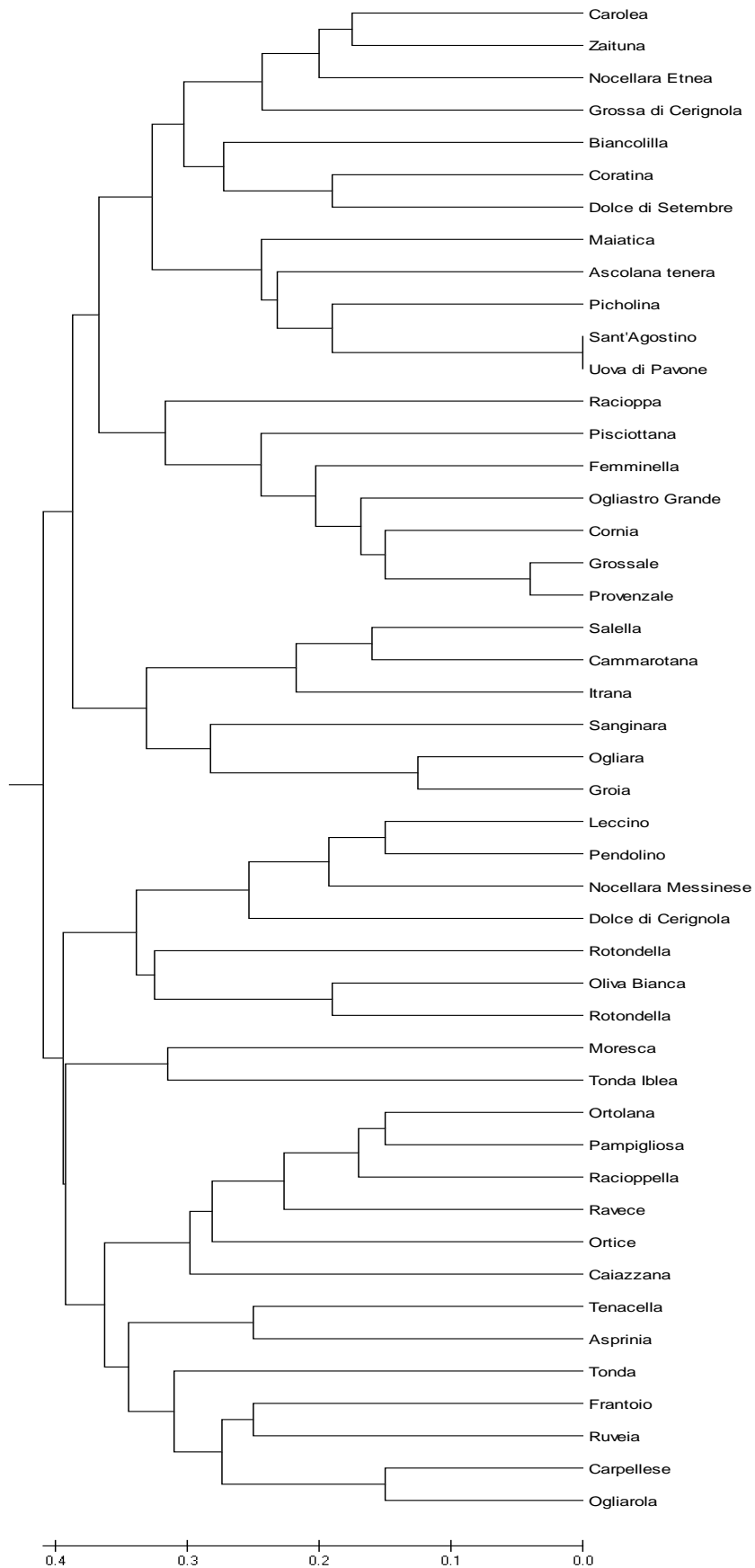
alleli più alto con un valore di Na pari a 18, mentre il valore più basso (11) è stato riscontrato al locus UDO99-031. Relativamente al numero effettivo di alleli (Ne) il locus con il valore maggiore è risultato essere il DCA 3 (7,819), mentre il valore minimo è stato rilevato al locus UDO99-031 (6,187). Il valore medio di Ne (7,029), per i sei loci SSR è quasi la metà del valore totale di alleli ottenuti, evidenziando che tutti i loci sono risultati similmente diversi nell'ambito dei campioni analizzati. L'indice di informazione (I), ha fornito il valore maggiore al locus DCA 17 (2,321), il valore minore al locus UDO99-031(1,991) ed un valore medio di 2,187. In riferimento all'eterozigosità osservata (Ho), che rappresenta il numero di eterozigoti all'interno della popolazione di campioni analizzata, si osserva che il valore più alto è stato riscontrato al locus DCA 17 (0,915), mentre il valore più basso è stato ottenuto al locus GAPU 47 (0,681). L'indice di fissazione di Wright è risultato molto vicino a zero per tutti i loci SSR. I loci maggiormente discriminanti fra i sei analizzati, aventi un valore massimo di D, risultano essere i loci DCA 3 (0,893) e DCA 16 (0,893), mentre il valore minimo è stato ottenuto al locus DCA 4 (0,858). La frequenza allelica è stata calcolata per ogni singolo allele per ciascuno dei 6 loci SSR analizzati. L'allele maggiormente frequente al locus DCA 3 è di 250 bp con una frequenza di 0,214; quello al locus DCA 4 è di 128 bp con un valore di 0,302; l'allele di 146 bp è il più frequente (0,235) al locus DCA 16; i due alleli più frequenti al locus DCA 17 sono di 108 bp e 110 bp con un valore di frequenza di 0,204 ed infine ai loci UDO99-031 e GAPU 47 gli alleli maggiormente frequenti sono di 150 bp e 193 bp con valori di frequenza rispettivamente di 0,239 e 0,277.

**Tabella 5.2:** Principali parametri genetici e loro media ottenuti dall'analisi SSR dei 49 genotipi di olivo analizzati.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	F	D
<b>DCA 3</b>	12.000	7.819	2.211	0.894	0.872	-0.025	0.893
<b>DCA 4</b>	15.000	6.080	2.157	0.848	0.836	-0.015	0.858
<b>DCA 16</b>	12.000	7.565	2.206	0.894	0.868	-0.030	0.893
<b>DCA 17</b>	18.000	7.243	2.321	0.915	0.862	-0.061	0.885
<b>UDO99-031</b>	11.000	6.187	1.991	0.804	0.838	0.041	0.859
<b>GAPU 47</b>	13.000	7.278	2.233	0.681	0.863	0.211	0.892
<b>Media</b>	13.5	7.029	2.187	0.839	0.856	0.020	0.88

**Note:** Na: No. Di Alleli differenti Ne: No. Effettivo di Alleli; I: Indice di Informazione; Ho: Eterozigosità Osservata, He: Eterozigosità attesa; F: Indice di Fissazione; D: Potere discriminante.

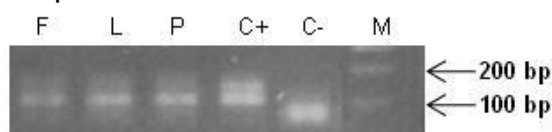
La relazione genetica tra le varietà di olivo è stata analizzata mediante una classificazione gerarchica che si basa sulla distanza genetica. L'albero filogenetico calcolato sulla base della matrice di dissimilarità genetica, ottenuto mediante l'algoritmo UPGMA (Michener e Sokal 1957) è riportato in Figura 5.4. Le varietà di olivo campane non sono raggruppate in un unico cluster, ma si presentano distribuite in gruppi ben distinti. L'informazione ottenuta dall'analisi genetica mediante i sei loci SSR ha permesso di distinguere tutte le singole varietà di olivo analizzate, fatta eccezione delle varietà 'Sant'Agostino' e 'Uova di Pavone', che hanno fornito lo stesso profilo allelico a tutti i loci. Questi genotipi potrebbero, pertanto essere caratterizzati anche a livello morfologico, per confermare il possibile caso di sinonimia.



**Figura 5.4:** Dendrogramma costruito mediante l'algoritmo UPGMA, delle varietà di olivo analizzate sulla base della matrice di dissimilarità genetica.

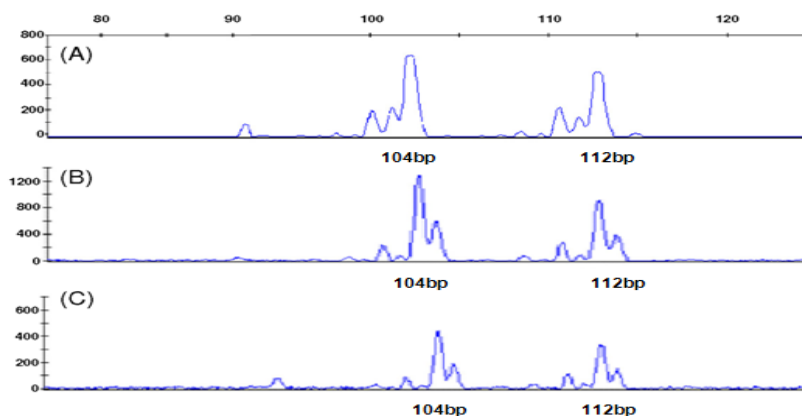
### 5.1.4 Tracciabilità genetica di olio d'oliva monovarietale

I sei loci SSR impiegati per la caratterizzazione dei 47 genotipi di olivo analizzati, forniscono profili cultivar specifici, pertanto si è pensato di testare la loro utilità per la tracciabilità degli oli. Il DNA è stato isolato dalle drupe e dall'olio monovarietale delle cultivar 'Pisciottana', 'Frantoio' e 'Leccino' ed amplificato con ciascuna delle sei coppie di primer SSR. Sebbene la resa di estrazione del DNA isolato dall'olio sia bassa, come già precedentemente dimostrato (Pasqualone *et al.*, 2004; Muzzalupo *et al.*, 2007) la qualità è risultata sufficiente per eseguire le amplificazioni PCR ai loci SSR analizzati. La Figura 5.5 mostra un esempio di separazione elettroforetica in gel di agarosio, di DNA estratto dagli oli monovarietali delle sopracitate varietà, amplificati con la coppia di primer DCA 4.



**Figura 5.5:** Esempio di separazione elettroforetica delle amplificazioni ottenute al locus DCA 4 a partire da DNA estratto dagli oli monovarietali delle varietà 'Frantoio' (F); 'Leccino' (L); 'Pisciottana' (P); C+: DNA isolato da foglia della varietà 'Frantoio'; C- Controllo negativo, miscela priva di template; M: 1kb plus ladder (Invitrogen).

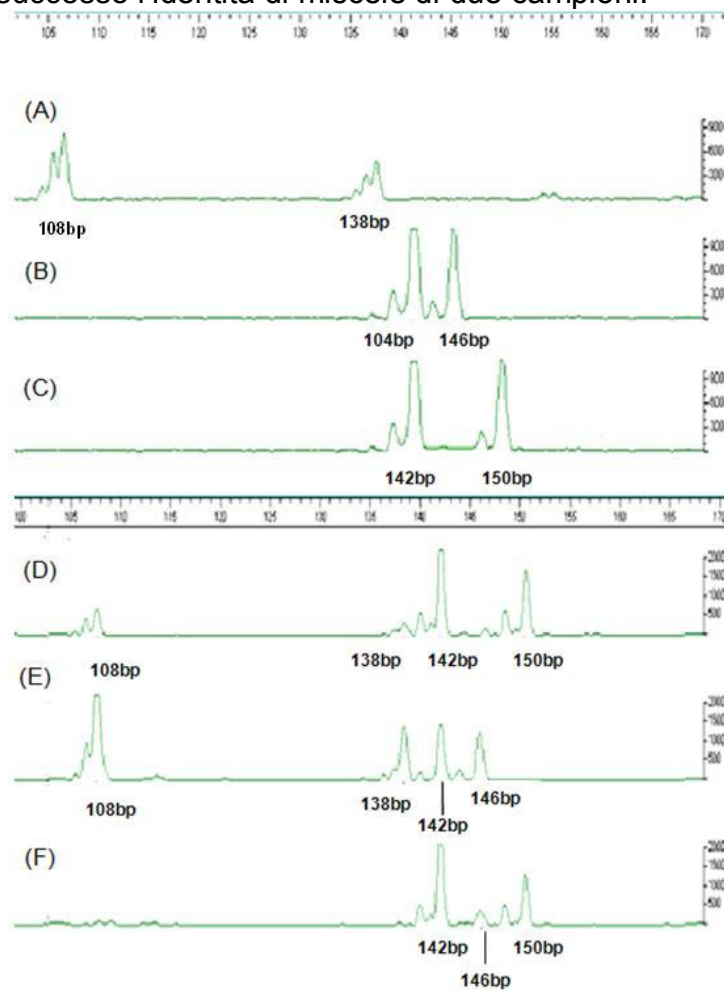
Non sono stati riscontrati alleli addizionali, diversamente da quanto riportato in letteratura (Doveri *et al.*, 2006; Muzzalupo *et al.*, 2007) nei profili degli oli e l'unica differenza emersa riguarda una riduzione della quantità di amplicone dopo la reazione PCR rispetto a quanto ottenuto amplificando il DNA estratto da foglia. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati, separati mediante elettroforesi capillare al fine di verificare la corrispondenza in termini di dimensioni alleliche degli amplificati del DNA estratto da olio con gli amplificati del DNA estratto da foglia e drupa della stessa varietà. Di seguito è riportato un esempio di profilo allelico eterozigote, ottenuto sottoponendo a separazione elettroforetica capillare prodotti di amplificazione ottenuti con la coppia di primer marcati DCA 17, usando il DNA isolato da foglie, drupe ed olio extra vergine di oliva della cultivar 'Pisciottana' (Figura 5.6).



**Figura 5.6:** Profilo allelico al locus SSR DCA17 del DNA estratto da foglia (A), da drupa (B) e da olio extra vergine di oliva (C) per la varietà 'Pisciottana'

Numerosi oli extra vergini di oliva che si fregiano di marchi di qualità come la Denominazione di Origine Protetta (DOP) sono costituiti da miscele derivanti da

diverse cultivar di olivo coltivate in una specifica area geografica. Pertanto, è stato saggiata la capacità degli SSR selezionati di rilevare il profilo allelico di templati complessi. DNA isolati da un olio di oliva monovarietale sono stati miscelati nel rapporto 1:1 con DNA isolati da un olio monovarietale ottenuto da cultivar differente. Queste diverse miscele, sono state usate come templat per le amplificazioni SSR. La Figura 5.7 mostra il profilo allelico al locus UDO99-031 ottenuto sottoponendo ad elettroforesi capillare gli ampliconi ottenuti da DNA isolato da foglie e da miscele di oli. I risultati indicano che gli alleli attesi sono individuabili nelle miscele di oli, ma che il rapporto quantitativo tra gli alleli cultivar specifici non correla con la quantità di templat utilizzata. L'elettroforesi capillare ha confermato da un lato la possibilità di amplificare DNA estratto da olio, dall'altro la capacità dei marcatori molecolari SSR di individuare con successo l'identità di miscele di due campioni.



**Figura 5.7.** Profilo allelico al locus UDO99-031 del DNA da foglia della varietà 'Pisciottana' (A), 'Leccino' (B) e 'Frantoio' (C) e da tre miscele di oli Pisciottana and Frantoio (D), Pisciottana e Leccino (E), Frantoio e Leccino (F).

## 5.2 Costruzione di *core subset* in olivo mediante l'uso dei marcatori molecolari SSR

Le collezioni *ex-situ* di germoplasma sono state sviluppate in diverse specie vegetali coltivate, per preservare e promuovere l'utilizzazione delle risorse genetiche in agricoltura (Diwan *et al.*, 1995; Grenier *et al.*, 2000). L'obiettivo principale è stato quello di sviluppare differenti *core subset* in olivo (*Olea europaea*), ai fini di individuare

quello che conserva maggiormente la diversità genetica della collezione di germoplasma di olivo mondiale. La costruzione di una *core collection* in olivo, costituirebbe un utile strumento per lo studio, la caratterizzazione e l'uso delle risorse genetiche di ampie collezioni di germoplasma, per lo scambio di materiale vegetale fra differenti paesi ed infine anche per stabilire una comune procedura per la sua costruzione (Rallo, 2005).

### **5.2.1 Comparazione dei *core subset* costruiti con l'intera collezione e valutazione delle distinte strategie usate**

I risultati dei parametri di variabilità calcolati per i cinque *core subset* comparati all'intera collezione iniziale (BGMO) sono riportati in Tabella 5.3. La caratterizzazione della collezione iniziale ha mostrato 236 frammenti di amplificazione ed un valore medio di eterozigosità osservata ( $H_o$ ) ed attesa ( $H_e$ ), rispettivamente di 0,766 e 0,734. Per i diversi metodi impiegati, in almeno uno dei *core subset* costruiti risultano significative ( $p < 0,05$ ) le differenze fra il numero di alleli di ciascun *core subset* ed il numero di alleli della collezione iniziale. Il valore più elevato del numero di alleli è stato ottenuto per il *core subset* del 30% e del 40% della dimensione della collezione iniziale, entrambi costruiti mediante il software MSTRAT (Gouesnard *et al.*, 2001). I due *core subset* hanno mostrato differenze significative ( $p < 0,05$ ) tra il numero di alleli fornito ed il numero totale degli alleli della collezione iniziale. Sono quindi necessari 133 o 151 genotipi per contenere il 99% del numero totale di alleli (236) presenti nella collezione iniziale. Il valore più basso del numero di alleli (89) è stato, invece riscontrato al *core subset* del 5%, costruito mediante il software Power Marker, al quale corrisponde chiaramente anche la più bassa percentuale di alleli trattenuti (7%). I cinque *core subset* costruiti presentano dal 38% al 99% dei alleli totali (236) della collezione iniziale, contenendo dal 7% al 99% degli alleli della collezione originale (considerando solo gli alleli con frequenze maggiori di 0,05%) (Tabella 5.3). I valori dell'eterozigosità osservata ottenuti sono risultati molto simili a quelli dell'intera collezione per tutti e cinque i *core subset* costruiti, fatta eccezione del *core subset* del 5%, dove i metodi MR e CH-MRNe hanno fornito valori leggermente più bassi, mentre con il metodo PM è stato osservato un valore di  $H_o$  leggermente più alto e del *core subset* del 10% (CH-MR), del 20% (CH-MR) e del 30% (CH-MR) che hanno fornito valori di  $H_o$  più bassi rispetto a 0,766 (BGMO). I valori di eterozigosità attesa ottenuti sono simili a quello della collezione iniziale per alcuni *core subset* e leggermente maggiori per altri. E' stata inoltre comparata la frequenza allelica a ciascun locus SSR per i cinque *core subset* costruiti con le frequenze alleliche osservate a ciascun locus all'interno della collezione originale: la migliore correlazione è stata ottenuta tra la collezione iniziale (BGMO) e il *core subset* del 40% costruita con il software Power Marker ( $R^2$ : 0,995), la peggiore correlazione è stata, invece riscontrata fra il *core subset* del 5% ( $H_e$ ) e la collezione iniziale ( $R^2$ : 0,734).

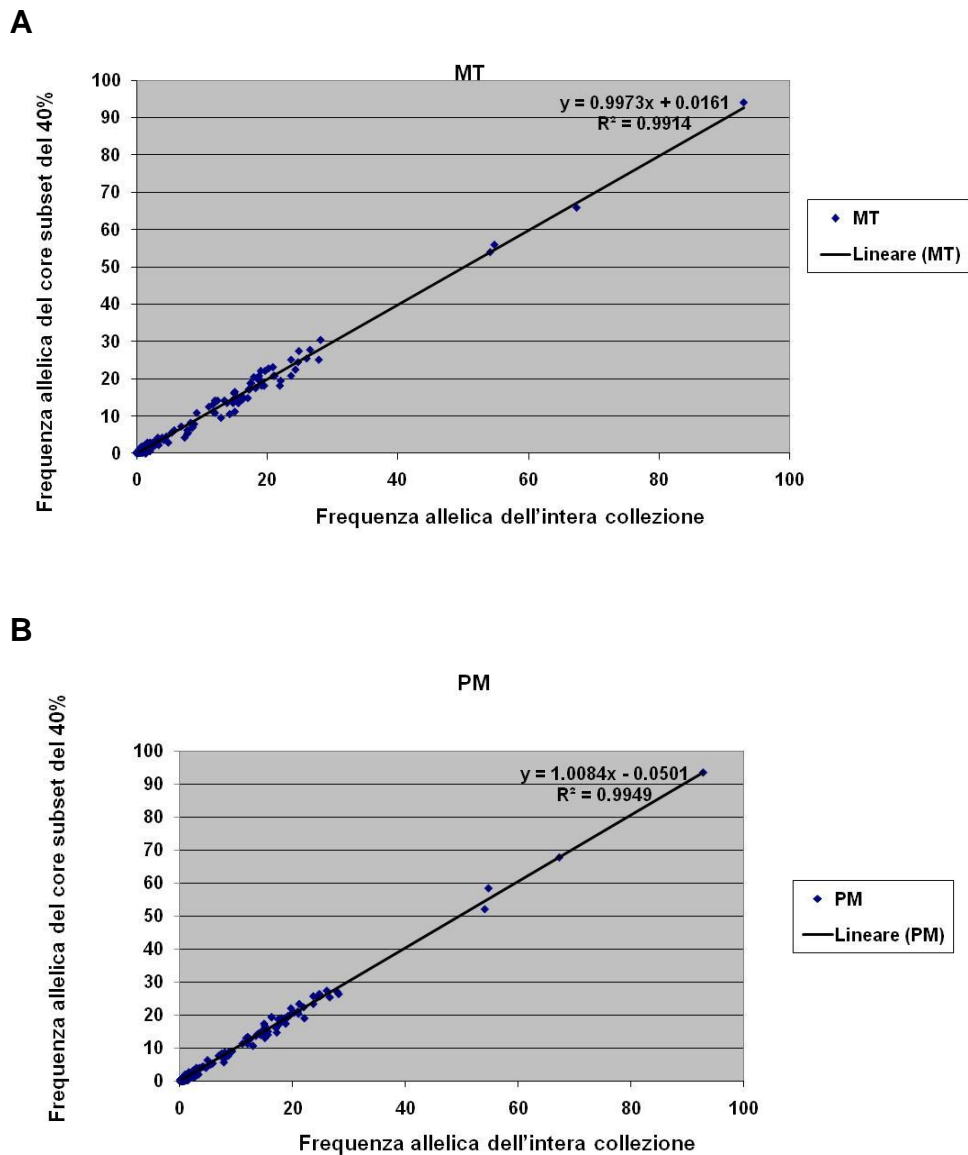
Tutti i metodi usati sembrano rappresentare abbastanza bene la diversità ( $H_e$ ) della collezione iniziale. Per i cinque *core subset* costruiti con ciascuna strategia è stata calcolata la distribuzione della frequenza allelica a ciascun locus SSR comparata con la frequenza allelica a ciascun locus all'interno della collezione originale. Di seguito sono riportati due esempi di rette di regressione ottenute rispettivamente, per il *core subset* del 40%, costruita mediante il software MSTRAT, secondo la M-strategy e il *core subset* del 40% costruita mediante il software Power Marker (Liu e Spencer, 2005) che hanno fornito i più alti valori di  $R^2$  (Figura 5.9).

**Tabella 5.3:** Parametri di variabilità calcolati all'interno di ciascun *core subset* rispetto alla collezione iniziale (BGMO).

Collezione	Metodo	Dimensione	Numero di alleli	Percentuale della diversità allelica totale	Percentuale della diversità allelica ristretta	Ho	He (Nei, 1987)	Correlazione della Frequenza allelica ai loci SSR ( $R^2$ ) con il BGMO
BGMO		378	236	100	100	0,766	0,734	1,000
5%	CH-He	18	159	67	38	0,766	0,869	0,734
	CH-Ne	18	166	70	38	0,762	0,832	0,816
	CH-MR	18	137	58	20	0,571	0,822	0,764
	CH-MRNE	18	164	69	33	0,690	0,838	0,793
	MT	18	174 <sup>a</sup>	74	44	0,794	0,847	0,744
	PM	18	89	38	7	0,805	0,716	0,952
10%	CH-He	36	185 <sup>a</sup>	78	49	0,790	0,842	0,828
	CH-Ne	36	193	82	56	0,770	0,822	0,872
	CH-MR	36	169	72	32	0,620	0,811	0,861
	CH-MRNE	36	194	82	56	0,720	0,829	0,849
	MT	36	209 <sup>a</sup>	89	69	0,767	0,817	0,868
	PM	36	129	55	14	0,778	0,743	0,977
20%	CH-He	75	201	85	58	0,777	0,820	0,876
	CH-Ne	75	211 <sup>a</sup>	89	70	0,770	0,803	0,902
	CH-MR	75	200 <sup>a</sup>	85	57	0,675	0,801	0,910
	CH-MRNE	75	211	89	70	0,748	0,807	0,902
	MT	75	227 <sup>a</sup>	96	90	0,757	0,771	0,955
	PM	75	157	67	21	0,769	0,738	0,989
30%	CH-He	133	207	88	64	0,770	0,806	0,924
	CH-Ne	133	219	93	79	0,772	0,794	0,926
	CH-MR	133	212 <sup>a</sup>	90	70	0,697	0,790	0,948
	CH-MRNE	133	217	92	77	0,760	0,798	0,925
	MT	133	234 <sup>a</sup>	99	99	0,767	0,742	0,986
	PM	133	178	75	41	0,778	0,731	0,988
40%	CH-He	151	221	94	81	0,769	0,794	0,942
	CH-Ne	151	225	95	86	0,764	0,785	0,944
	CH-MR	151	216	92	75	0,712	0,781	0,957
	CH-MRNE	151	225 <sup>a</sup>	95	86	0,755	0,787	0,940
	MT	151	234 <sup>a</sup>	99	99	0,760	0,735	0,991
	PM	151	189 <sup>a</sup>	80	48	0,763	0,731	0,995

**Note:** CH-He: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando la diversità all'interno di ciascun locus (% attesa di loci eterozigoti); CH-Ne: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando il numero effettivo di alleli; MR: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando la diversità genetica di Modified Rogers (MR); CH-MRNE: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando il 50% della distanza genetica di Modified Rogers (MR) ed il 50% del numero effettivo di alleli (NE); MT: *Core subset* costruito mediante il software Mstrat, massimizzando il numero effettivo di alleli e usando la distanza genetica di Nei come secondo criterio di ottimizzazione; PM: *Core subset* costruito mediante il software Power Marker massimizzando il numero effettivo di alleli.

Il *core subset* del 40% ottenuto applicando la M-strategy, mostra i più alti valori dei parametri di variabilità calcolati (He e Ho), trattenendo allo stesso tempo il più alto numero di alleli (234). Tale *core subset* di 151 individui ha mostrato frequenze alleliche a ciascun locus SSR simili a quelle ottenute per la collezione iniziale. La frequenza allelica fra tale *core subset* e l'intera collezione è altamente correlata ( $R^2$ : 0,97). In Figura 5.8 (A) è mostrata la retta di regressione lineare che meglio interpola la distribuzione della frequenza dei 236 alleli. In Figura 5.9 (B) è invece mostrata la distribuzione della frequenza allelica per il *core subset* che ha mostrato il più alto coefficiente di correlazione con la collezione iniziale, ma non i migliori valori dei parametri di validazione precedentemente calcolati.



**Figura 5.8:** Distribuzione della frequenza dei 234 (A) e 189 (B) alleli ai 14 loci SSR, recuperati nel *core subset* del 40% (151 individui) rispetto all'intera collezione iniziale (378 individui).

In Tabella 5.4 si riportano i valori medi dei diversi parametri calcolati mediante il software Core Hunter v.1.0b, per ciascuno dei metodi precedentemente descritti. L'intera collezione iniziale ha fornito i seguenti valori medi dei due indici della distanza genetica: 0,59 (MR) e 0,77 (CE) ed i seguenti valori dei tre indici della diversità: 4,39 (SH); 0,73 (He); 5,05 (Ne). Quando si è tentato di minimizzare il numero di alleli non informativi (PN) e massimizzare la copertura (CV) per il data set di accessioni, il Core Hunter ha individuato la soluzione ottimale nelle *core subset* del 30% e 40% costruite mediante il software MSTRAT, aventi rispettivamente valori di PN e CV di 0,01e 0,99. La copertura peggiore (CV: 0,38) è stata ottenuta per il *core subset* del 10% costruito mediante il software Power Marker, avente di conseguenza anche la più alta percentuale di alleli non informativi (PN: 62%). Osservando i risultati in Tabella 5.4, si nota inoltre, che soltanto il metodo CH-MRNe ha permesso di ottenere i valori più alti delle due distanze genetiche calcolate (MR e CE) e dei tre indici di diversità (SH, He e Ne) per i *core subset* dal 10% al 40%. Nello specifico le *core subset* del 10% e del 20% con il metodo CH-MRNe, hanno fornito i più alti valori dei parametri genetici calcolati (Tabella 5.4). Infine, soltanto il metodo CH-He ha permesso di ottenere i valori più alti per tre (CE, SH e He), dei sei



parametri di validazione calcolati, all'interno del *core subset* del 5%.

**Tabella 5.4:** Comparazione dei *core subset* costruiti mediante i software MSTRAT, Core Hunter e Power Marker, usando 20 repliche indipendenti per il calcolo di ciascun parametro. La diversità della *core subset* è stata misurata mediante sette criteri selezionati: due distanze genetiche (Modified Rogers MR e Cavalli-Sforza e Edwards CE), tre indici di diversità (Shannon SH; percentuale di loci eterozigoti per individuo He; numero di alleli effettivo Ne) e due variabili ausiliari (percentuale di alleli non informativi PN; percentuale di copertura CV).

Core	Metodo	MR	CE	SH	He	Ne	PN	CV
<b>BGMO</b>		0,59	0,77	4,39	0,73	5,05	0,00	1,00
<b>5%</b>	<b>CH-He</b>	0,70	0,89	4,76	0,84	7,54	0,33	0,67
	CH-Ne	0,67	0,87	4,72	0,81	7,96	0,30	0,70
	CH-MR	0,74	0,87	4,57	0,80	6,32	0,42	0,58
	CH-MRNE	0,70	0,88	4,73	0,81	7,86	0,31	0,69
	<b>MT</b>	0,67	0,87	4,76	0,82	7,37	0,27	0,73
	PM	0,55	0,74	4,13	0,70	4,29	0,62	0,38
<b>10%</b>	CH-He	0,67	0,86	4,75	0,83	7,23	0,22	0,78
	CH-Ne	0,66	0,86	4,76	0,81	7,84	0,18	0,82
	CH-MR	0,71	0,86	4,64	0,80	6,46	0,28	0,72
	<b>CH-MRNE</b>	0,68	0,87	4,77	0,82	7,76	0,18	0,82
	MT	0,66	0,85	4,75	0,81	7,19	0,12	0,88
	PM	0,59	0,77	4,32	0,73	4,86	0,46	0,54
<b>20%</b>	CH-He	0,65	0,84	4,70	0,81	6,88	0,15	0,85
	CH-Ne	0,64	0,84	4,72	0,80	7,40	0,11	0,89
	CH-MR	0,68	0,84	4,64	0,80	6,35	0,15	0,85
	<b>CH-MRNE</b>	0,66	0,84	4,72	0,80	7,35	0,11	0,89
	MT	0,62	0,81	4,60	0,77	6,00	0,04	0,96
	PM	0,59	0,77	4,33	0,73	4,85	0,34	0,66
<b>30%</b>	CH-He	0,65	0,83	4,66	0,80	6,63	0,12	0,88
	CH-Ne	0,64	0,83	4,68	0,79	7,01	0,07	0,93
	CH-MR	0,66	0,83	4,61	0,79	6,26	0,10	0,90

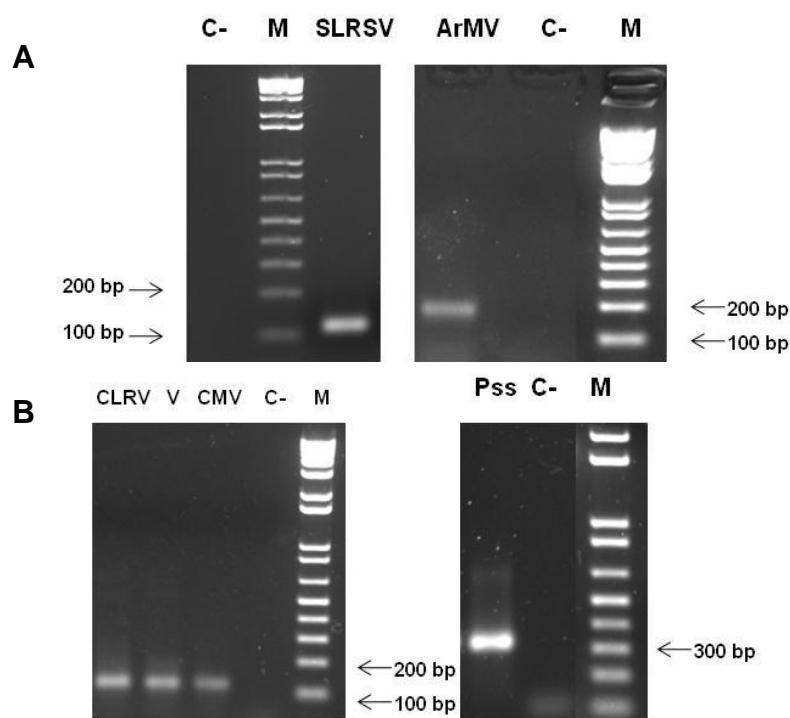
40%								
	CH-He	0,64	0,82	4,62	0,79	6,40	0,06	0,94
	CH-Ne	0,63	0,82	4,64	0,78	6,65	0,05	0,95
	CH-MR	0,65	0,82	4,58	0,78	6,06	0,08	0,92
	<b>CH-MRNE</b>	0,64	0,82	4,64	0,78	6,63	0,05	0,95
	MT	0,59	0,77	4,42	0,73	5,05	<b>0,01</b>	<b>0,99</b>
	PM	0,58	0,76	4,35	0,73	4,94	0,20	0,80

**Note:** CH-He: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando la diversità all'interno di ciascun locus (% attesa di loci eterozigoti); CH-Ne: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando il numero effettivo di alleli; CH-MR: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando la diversità genetica di Modified Rogers (MR); CH-MRNE: *Core subset* costruito mediante il software Core Hunter massimizzando il 50% della distanza genetica di Modified Rogers (MR) ed il 50% del numero effettivo di alleli (Ne); MT: *Core subset* costruito mediante il software Mstrat, massimizzando il numero effettivo di alleli e usando la distanza genetica di Nei come secondo criterio di ottimizzazione; PM: *Core subset* costruito mediante il software Power Marker massimizzando il numero effettivo di alleli.

## 5.2.2 Identificazione dei principali patogeni in olivo mediante analisi qualitativa Real Time PCR

La presenza di differenti patogeni nel materiale vegetale che si utilizza per la propagazione, limita a livello qualitativo e quantitativo la potenzialità produttiva delle piante ottenute dalla loro moltiplicazione. Una possibile strategia per ridurre in campo la presenza delle più gravi malattie dell'olivo, è la creazione di nuovi impianti che utilizzano piante esenti da patogeni (Rallo, 2005). Per l'identificazione molecolare del fungo patogeno *V. dahliae*, dei principali virus dell'olivo, così come del batterio *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*, sono stati messi a punto nuovi sistemi di diagnostica molecolare (Bertolini *et al.*, 2003; Mercado-Blanco *et al.*, 2003). Al fine di preservare le risorse genetiche esenti da agenti patogeni, nuove propagazioni di genotipi di olivo sono stati analizzati per valutare la presenza dei patogeni più importanti dell'olivo: *Verticillium dahliae*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e dei seguenti virus: *ArMV* (*Arabis mosaic virus*), *CLRV* (*Cherry leaf roll virus*), *CMV* (*Cucumber mosaic virus*), *SLRV* (*Strawberry latent ringspot virus*). Il materiale risultato esente da patogeni e virus è stato poi conservato all'interno di una serra di isolamento.

Sono state analizzate 174 delle 378 piante di olivo usate per la costruzione di *core subset*, propagate vegetativamente, appartenenti a genotipi di distinte aree geografiche. Per la identificazione dei principali virus dell'olivo, sono state utilizzate coppie di primer specifici descritti in letteratura (Bertolini, 2001). Per l'identificazione del batterio *Pseudomonas* è stata usata una coppia di primer che amplifica il gene IAA-L, che codifica la conversione di IAA in IAA-lisina. Per l'identificazione del fungo *Verticillium* la coppia di primer usata, amplifica una regione del gene che codifica l'RNA ribosomale 12S. I prodotti specifici di amplificazione (*P. savastanoi* 338 bp; *ArMV* 203 bp; *CLRV* 172 bp; *CMV* 171 bp; *SLRSV* 109 bp e *V. dahliae* 139 bp) sono stati ottenuti da tutti i controlli positivi batterici, fungini e virali (Figura 5.9)

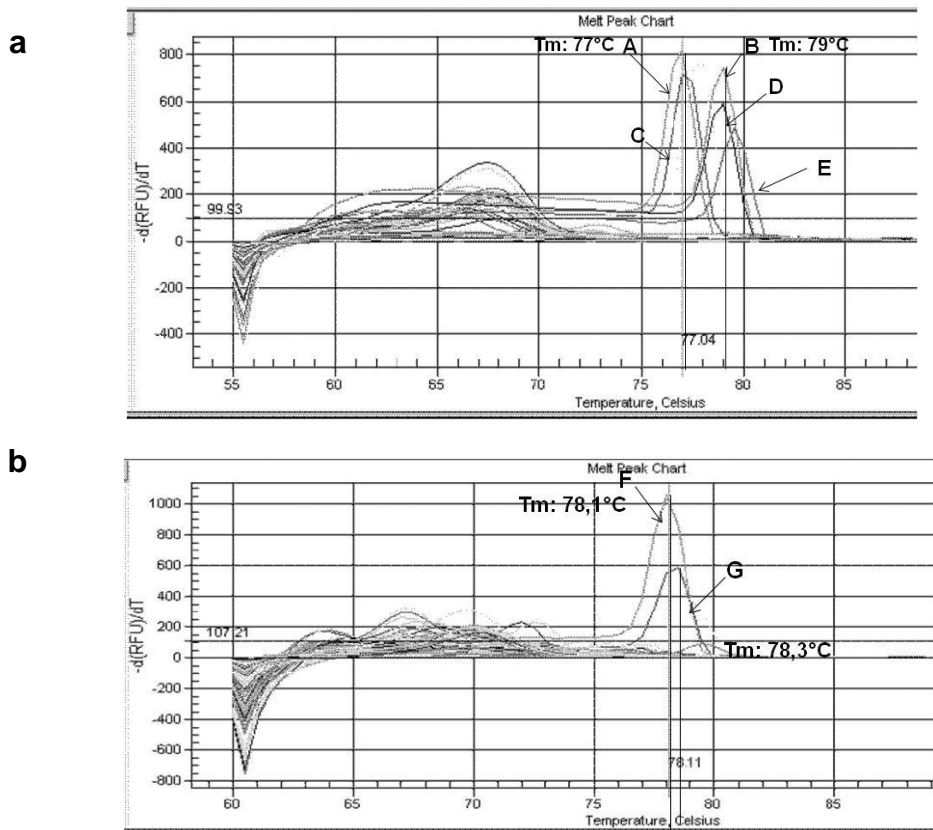


**Figura 5.9:** Esempio di separazione elettroforetica in gel di agarosio 2% (p/v) dei prodotti di amplificazione PCR del DNA fungo *V. dahliae* (V), del batterio *P. savastanoi* (Pss) e del cDNA dei virus: *ArMV* (*Arabidopsis mosaic virus*), *CLR*V (*Cherry leaf roll virus*), *CMV* (*Cucumber mosaic virus*), *SLR*V (*Strawberry latent ringspot virus*). C-: controllo negativo, miscela priva di template; M: 1kb plus ladder (Invitrogen).

Nessun prodotto di amplificazione è stato ottenuto dagli estratti di acidi nucleici da piante sane utilizzati come controllo negativo. La combinazione della Real time PCR, utilizzando come sonda fluorescente il Sybr Green, insieme con l'analisi delle curve di dissociazione ha permesso di identificare la presenza di patogeni e virus nelle piante di olivo analizzate.

Dall'analisi delle curve di dissociazione, un solo picco è stato ottenuto per il prodotto di amplificazione di ciascun controllo positivo amplificato con una coppia di primer specie-specifica. Il prodotto di amplificazione a doppia elica di ciascun controllo positivo, si dissocia ad una caratteristica temperatura ( $T_m$ ), alla quale il 50% del DNA o cDNA è in forma di singolo filamento. I controlli positivi impiegati presentano i seguenti range di temperatura di melting ( $T_m$ ):  $T_m$ -*CMV*: 76,5-77,5 °C;  $T_m$ -*CLR*V: 78,5-79 °C;  $T_m$ -*SLR*V: 78-79,5°C;  $T_m$ -*ArMV*: 78-78,5°C;  $T_m$ -*Pseudomonas*: 83-84°C;  $T_m$ -*Verticillium*: 74,5-75,5°C. Delle 174 piante di olivo analizzate, è stata riscontrata la presenza dell'agente patogeno o virale per quei campioni, il cui prodotto di amplificazione all'analisi delle curve di dissociazione, ha fornito un solo picco di altezza (dF/dT) superiore ad un valore fissato arbitrariamente a 100 dF/dT ed avente una temperatura di melting uguale o di un grado superiore o inferiore alla temperatura di melting del corrispettivo controllo positivo (Yu *et al.*, 2005; Osman e Rowhani, 2006).

Di seguito si riporta un esempio di valutazione della presenza dei virus per alcune piante di olivo. Come si nota in Figura 5.10, le curve di dissociazione dei cDNA dei virus *CMV* e *CRLV*, usati come controlli positivi, (picchi A e B) hanno fornito una temperatura di melting rispettivamente di 77°C e 79°C.



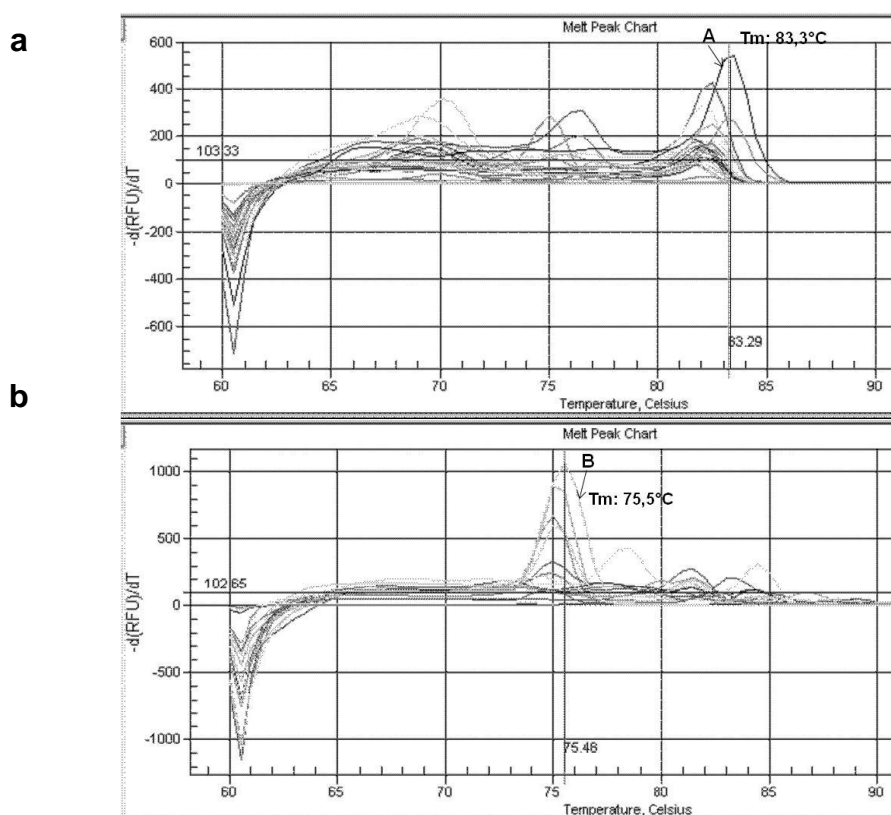
**Figura 5.10:** Analisi delle curve di dissociazione dei prodotti di amplificazione del cDNA, per l'identificazione dei virus *CMV* e *CLRV* (a); *ArMV* e *SLRV* (b). A: curva di dissociazione del DNA del virus *CMV* (*Cucumber mosaic virus*), usato come controllo positivo, la cui Tm è compresa nel range 76,5-77,5 °C; B: curva di dissociazione del DNA del virus *CLRV* (*Cherry leaf roll virus*), usato come controllo positivo, la cui Tm è compresa nel range 78,5-79,5°C; C: Campione di olivo positivo alla presenza del virus *CMV*; D e E: campioni di olivo positivi alla presenza del virus *CLRV*; F: curva di dissociazione del DNA del virus *ArMV* (*Arabis mosaic virus*), usato come controllo positivo, la cui Tm è compresa nel range di 78-78,5 °C. G: curva di dissociazione del DNA del virus *SLRSV* (*Strawberry latent ringspot virus*), usato come controllo positivo, la cui Tm è compresa nel range 78-79,5°C.

Dal confronto delle curve di dissociazione degli ampliconi delle piante di olivo analizzate e dei corrispettivi controlli positivi, evince che due piante di olivo (Figura 5.10) risultano infette dal virus *CMV* (*Cucumber mosaic virus*), mostrando picchi (C e D) di altezza  $(d(RFU)/dT)$  maggiore del valore soglia arbitrario fissato a 100 ed avendo una temperatura di melting di 77°C, uguale al controllo positivo (A); mentre una sola pianta risulta positiva alla presenza del virus *CLRV* (*Cherry leaf roll virus*), il cui prodotto di amplificazione (E) ha fornito una temperatura di melting di quasi un grado superiore al corrispettivo controllo.

Non è stata invece riscontrata la presenza dei virus *ArMV* (*Arabis mosaic virus*) e *SLRSV* (*Strawberry latent ringspot virus*) nelle piante analizzate, difatti come si nota in Figura 5.10 (b), sono visibili soltanto le curve di dissociazione dei controlli positivi (F e G).

Relativamente alla identificazione del fungo patogeno *V. dahliae* e del batterio *Pseudomonas savastanoi*, effettuando l'analisi delle curve di dissociazione si evince che risultano numerosi i campioni di olivo positivi alla presenza del fungo e del batterio. Osservando la Figura 5.11 (a), difatti, oltre alla curva del prodotto di amplificazione del fungo (A) con una temperatura di melting di 83,3°C, si nota la presenza di diverse curve con altezza  $(d(RFU)/dT)$  maggiore del valore soglia di 100,

e con una temperatura di melting uguale o inferiore di un grado rispetto al controllo positivo (A: Tm: 83,3°C). Una situazione analoga si osserva nella Figura 5.11 (b), in cui diversi campioni di olivo sono risultati infetti dal batterio, il cui prodotto di amplificazione mostra una temperatura di melting è di 75,5°C.



**Figura 5.11:** Analisi delle curve di melting dei prodotti di amplificazione del DNA isolato da piante di olivo analizzate per l' identificazione del fungo patogeno *V. dahliae* (a) e del batterio *Pseudomonas savastanoi* (b) A: curva di melting del DNA del batterio *Pseudomonas savastanoi* , usato come controllo positivo, la cui Tm è compresa nel range di 83-84 °C; B: curva di melting del DNA di *V. dahliae* , usato come controllo positivo, la cui Tm è compresa nel range di 74,5-75,5 °C.

In conclusione è emerso che il 15,5 % delle piante sono risultate infettate dal batterio *Pseudomonas svastanoi*; nel 7,5% è stata, invece, riscontrata la presenza del fungo patogeno *V. dahliae*. Inoltre in 4 piante è stata riscontrata la presenza di entrambi gli organismi patogeni *V. dahliae* e *P. savastanoi*. Relativamente ai quattro principali virus dell'olivo, è stato registrato un solo caso isolato di una pianta risultata positiva al virus *CLRV* (*Cherry leaf roll virus*), , mentre due piante sono risultate infettate dal virus *CMV* (*Cucumber mosaic virus*) su un totale di 174 analizzate (Tabella 5.5).

**Tabella 5.5:** Schema riassuntivo del numero (N°) e della rispettiva %, delle piante di olivo risultate positive alla presenza dei principali patogeni.

Piante di olivo analizzate	N° Piante positive al fungo ( <i>V. dahliae</i> )	N° Piante positive al batterio ( <i>Pseudomonas</i> )	N° Piante positive al virus ( <i>CMV</i> )	N° Piante positive al virus ( <i>CLRV</i> )	N° Piante positive al virus ( <i>SLRSV</i> )	N° Piante positive al virus ( <i>ArMV</i> )
174	27 (15,5%)	13 (7,5%)	2 (0,011%)	1 (0,005%)	0	0

### 5.3 Analisi di espressione sequenze EST diversamente espresse in olivo in risposta all'attacco della mosca *B. oleae*

La mosca dell'olivo *Bactrocera oleae* (Rossi), strettamente associata al genere *Olea*, è il principale insetto dannoso delle piante di olivo coltivate nei diversi paesi del Mediterraneo (Iannotta *et al.*, 1999). Purtroppo, nonostante il panorama varietale nostrano sia ricco e diversificato, non sono disponibili informazioni relative alla risposta dei genotipi autoctoni di olivo agli attacchi della mosca *B. oleae*. La caratterizzazione molecolare della risposta delle cultivar di olivo all'attacco della mosca rappresenta il primo passo verso la comprensione del complesso meccanismo molecolare alla base della resistenza/ tolleranza a *B. oleae*. Sebbene diversi studi siano stati condotti nell'ambito della ricerca biochimica e fisiologica per comprendere le modifiche dei metaboliti primari e secondari che avvengono nella drupa attaccata (Ucella *et al.*, 2000), ad oggi non vi è alcuno studio relativo alla identificazione di geni correlati alla risposta di difesa in olivo. Questo potrebbe essere anche dovuto al fatto che le informazioni genomiche sull'olivo sono molto limitate. Pertanto nel presente lavoro di tesi, sono stati caratterizzati alcuni trascritti della drupa differenzialmente espressi in una cultivar di olivo infestata rispetto al controllo sano che provenivano da una libreria sottrattiva, costruita mediante la tecnica SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*).

#### 5.3.1 Analisi dei trascritti differenziali

La libreria SSH disponibile nel laboratorio, presso il quale ho svolto l'attività di dottorato, è stata costruita sottraendo il cDNA di drupe sane al cDNA di drupe con all'interno la galleria larvale della varietà di olivo 'Moraiolo' (Varricchio *et al.*, 2008). Per verificare la presenza dell'insero e valutarne la sua dimensione, il DNA plasmidico di circa 590 cloni positivi alla selezione *blue/white* sono stati analizzati per digestione (Eco RI)

Duecentodiecine cloni isolati dalla libreria sottrattiva, aventi un inserto maggiore di 200 bp, sono stati sequenziati. La dimensione massima dell'insero è risultata essere di 920 bp, quella media di 371 bp (Tabella 5.6).

**Tabella 5.6:** Caratteristiche della libreria sottrattiva larva

Caratteristiche della libreria	Numero
Colonie positive allo screening b/w	1180
Cloni positive alla digestione	590
Sequenze analizzate	219
Lunghezza Min. EST (nt)	120
Lunghezza Max. EST (nt)	979
Lunghezza media EST (nt)	371
Sequenze non-ridondanti	84
Contigui (ESTs)	33 (168*)

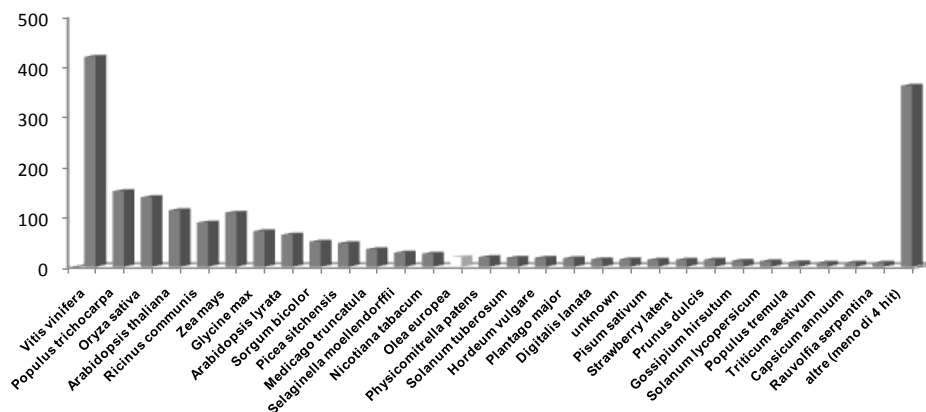
Singoletti	51
Ridondanza **	61
Trascritti aventi similarità con proteine note	113
Trascritti aventi similarità con proteine non note	206

\* Numero in parentesi indica le sequenze totali della libreria

\*\*Ridondanza: [(numero totale di sequenze – (numero totale di contigui + numero totale di singoletti))/(numero totale di sequenze)] (Cramer *et al.*, 2006)

Le sequenze sono state assemblate in cluster di contigui, mediante il software CAP3, ottenendo un totale di 33 contigui; le 51 sequenze non formanti contigui sono state considerate singoletti. E' stato ottenuto un livello di ridondanza accettabile pari a 61. Per assegnare una putativa funzione ai diversi trascritti, è stata effettuata l'analisi di similarità locale, eseguita per confronto di ciascuna sequenza selezionata con le sequenze non ridondanti della banca dati di NCBI mediante l'algoritmo di allineamento locale tblastxII livello di similarità di sequenza fra il clone e la sequenza nota della banca dati, è stato espresso dal valore *e*. Circa il 70% dei trascritti ha mostrato un valore di *e* basso (<0.001). Dall'analisi bioinformatica effettuata, è emerso che 113 trascritti risultano avere similarità locale con trascritti di proteine note depositate in banca dati, i restanti 206 mostrano similarità con proteine non note. La Figura 5.11 rappresenta la distribuzione del numero di sequenze delle diverse specie vegetali considerando le prime 30 hit, ottenute dall'analisi di similarità locale di ciascun trascritto mediante il software Blast2Go.

### Distribuzione delle specie

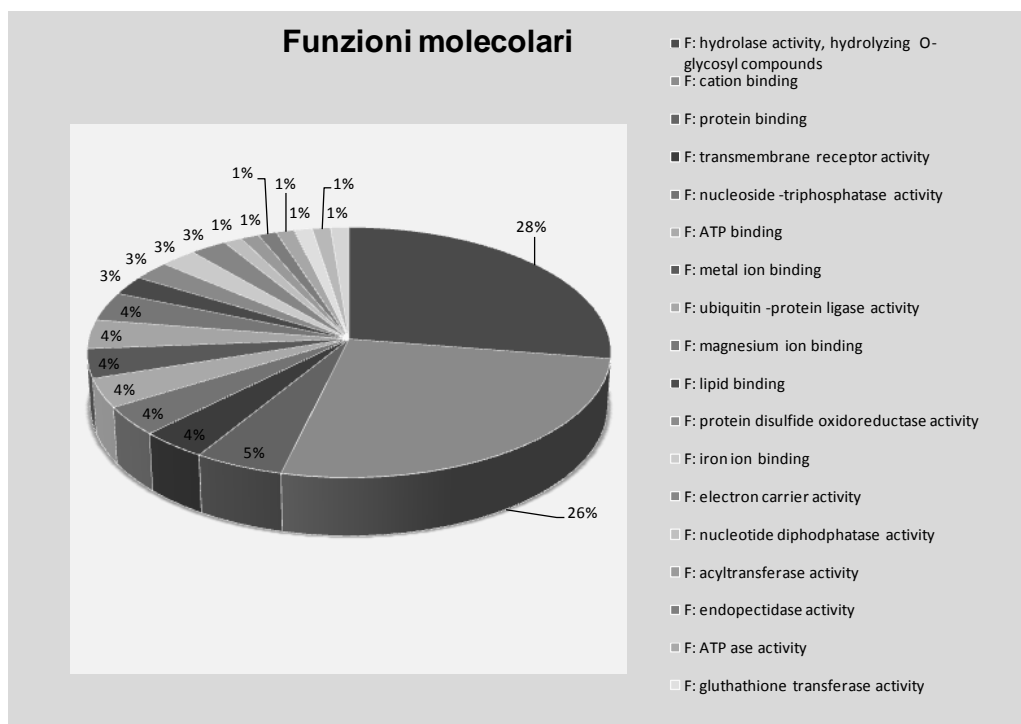


**Figura 5.12:** Distribuzione del numero di sequenze delle specie vegetali, per le prime 30 hit, ottenute per ciascun trascritto per confronto, mediante l'algoritmo di allineamento locale tblastx, della sequenza di interrogazione contro le sequenze nr della banca dati NCBI (*Viridiplantae*). La barra bianca indica il n° di sequenze della specie *Olea europea*.

E' emerso che i trascritti della libreria sottrattiva presentano similarità con sequenze codificanti identificate in altre specie vegetali, molte delle quali coinvolte nei meccanismi di risposta a stress biotici. La specie vegetale più rappresentata è la *Vitis Vitinifera*. Si può notare come solo quattordicesima si classifica l'*Olea europea*, a sottolineare ancora lo scarso numero di sequenze di olivo depositate in banca dati (ca 55857 EST, 1732 sequenze nucleotidiche e 630 sequenze proteiche).

### 5.3.2 Annotazione funzionale ed analisi dei trascritti diversamente espressi

L'annotazione funzionale dei trascritti isolati dalla libreria sottrattiva è stata eseguita mediante l'uso del software Blast2Go in accordo con il consorzio Gene Ontology. La scarsità delle informazioni sul genoma olivo potrebbe essere uno dei motivi per cui soltanto il 48% delle sequenze EST sono state annotate funzionalmente nelle diverse categorie funzionali (Processo biologico, Funzione molecolare, Componente cellulare). Il grafico in Figura 5.13, rappresenta la distribuzione percentuale dei trascritti annotati, in accordo alla specifica funzione molecolare rilevata. Le funzioni molecolari delle EST sequenziate suggeriscono che la risposta molecolare dell'olivo alla mosca sia molto complessa, comportando alterazioni delle vie metaboliche primarie e secondarie. La classe più rappresentata con una distribuzione percentuale pari a 28 è quella delle idrolasi, a cui appartengono diversi geni notoriamente coinvolti nella risposta di difesa delle piante a stress biotici. Tale risultato è in accordo con quanto emerso dall'analisi bioinformatica, che ha rilevato la presenza di circa 30 cloni aventi similarità locale con una  $\beta$ -glucosidasi dell'*Olea europea*, idrolasi notoriamente coinvolta nella idrolisi dell'oleuropeina (glucoside fenolico), un metabolita dell'olivo coinvolto nella difesa naturale della pianta contro l'attacco di patogeni e insetti (Iannotta *et al.*, 2007). La seconda categoria maggiormente rappresentata, con una distribuzione percentuale pari a 26, riguarda le proteine di legame con i cationi, come ad esempio il calcio, coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale tipici della risposta precoce delle piante agli stress biotici. È noto che gli eventi precoci dell'interazione pianta-insetto, inducono uno squilibrio ionico, che è responsabile di variazioni del potenziale di membrana che altera a sua volta la concentrazione del calcio citosolico che agisce da segnale. L'interazione a valle delle chinasi e fitormoni che mediano il segnale, porta all'attivazione dei geni notoriamente coinvolti nel meccanismo di difesa della pianta agli insetti (Maffei *et al.*, 2007)



**Figura 5.13:** Diagramma della distribuzione percentuale delle sequenze EST classificate in diverse categorie di funzione molecolare in accordo con il consorzio Gene Ontology.



Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi bioinformatica, sono stati selezionati i trascritti funzionalmente più interessanti, perché putativamente coinvolti nei meccanismi di difesa delle piante agli stress biotici (Tabella 5.7). Il trascritto che ha fornito la più alta identità locale (100%) è risultato essere una lipossigenasi; mentre la più lunga sequenza aminoacidica dedotta è stata fornita da un trascritto che ha mostrato similarità con una proteina PR27 identificata in *Nicotiana tabacum* (Okushima *et al.*, 2000). Pertanto, per i trascritti riportati in Tabella 5.6, è stata effettuata l'analisi di espressione mediante Real Time PCR, al fine di validare la differente espressione tra le drupe attaccate e le drupe non attaccate della cultivar 'Moraiolo'.

**Tabella 5.7:** Analisi di sequenza di alcune EST identificate in risposta all'attacco della *Bactrocera oleae*. Le ID appartengono alle tre categorie: ' Processo biologico' (P), 'Funzione Molecolare' (F) e 'Componente cellulare' (C), identificate mediante il software Blast2Go

Similarità	Specie vegetali	Identità locale	Lunghezza ORF (aa)	Valore e	Categorie Funzionali
Chitinasi classe I	<i>Vitis vinifera</i>	91%	64	2.00E-25	F: attività chitinasica; P: processo catabolico della chitina; P: processo catabolico della parete cellulare; F: legame con chitina; F: attività trans-cinnamato 4-monossigenasi P: trasporto di elettroni.
Cinnamato-4-idrolasi (C4H)	<i>Camptotheca acuminata</i>	85%	95	2.00E-50	P: processo metabolic L-fenilalanina; P: processi biosintetici della lignina, cumarina e stilbene.
Proteina indotta da TMV	<i>Capsicum annuum</i>	78%	70	8.00E-17	C: sistema di endomembrana; vescicole della membrana citoplasmatica.
Inibitore di tripsina/chimotripsina	<i>Lens tomentosum</i>	96%	86	2.00E-42	C: regione extracellulare; F: attività inibitoria di endopeptidasi contenenti serina.
Cellulosa sintasi	<i>Nicotiana tabacum</i>	71%	60	3.00E-14	C: membrana; P: processo biosintetico della cellulosa; F: attività cellulosa sintasica (UDP-froming).
Acquaporina (PIP2;1)	<i>Vitis vinifera</i>	82%	56	5.00E-25	
Tioredoxina di tipo H	<i>Capsicum annuum</i>	74%	133	4.00E-45	P: omeostasi redox cellulare; C: citoplasma; attività di trasporto di elettroni; F: proteina con ponti disolfuro con attività ossidriduttasica; P: electron tran sport.
Proteina correlata alla patogenesi (NtPRp27)	<i>Solanum tuberosum</i>	89%	170	5.00E-19	C: sistema di endomembrane; P: apoptosi; F: legame con ATP; F: attività nucleoside-trifosfatasi.
$\beta$ - glucosidasi	<i>Olea europea</i>	98%	112	2.00E-57	P: processo metabolic dei carboidrati; F: attività idrolasica.
Lipossigenasi	<i>Olea europea</i>	100%	40	8.00E-49	
Glutazione-S-trasferasi (GST)	<i>Hyosyamus muticus</i>	85%	62	4.00E-21	P: processo catabolico di tossine; P: risposta alle perdite di acqua; F: attività glutazione trasferasica; P: risposta a stress ossidativo; C: cloroplasti; via di trasduzione del segnale mediate dall'auxina.
Chitinasi di classe II	<i>Pyrus pyrifolia</i>	81%	60	8.00E-33	F: attività chitinasica; P: processo catabolico della chitina; P: processo catabolico della parete cellulare.

### 5.3.3 Analisi quantitativa mediante Real Time PCR del livello di espressione differenziale delle sequenze EST selezionate

I trascritti funzionalmente più interessanti isolati dalla libreria sottrattiva, sono stati analizzati mediante Real time PCR allo scopo di verificarne l'espressione differenziale nelle drupe attaccate dalla mosca dell'olivo rispetto a quelle sane. E' stata valutata l'espressione relativa dei trascritti riportati in Tabella 5.4, nelle drupe con all'interno la galleria larvale rispetto alle drupe sane per la cv 'Moraiolo'. Si è pensato, allo stesso tempo di valutare l'espressione relativa dei trascritti PR27, LOX e Chitinasi, anche in altre varietà di olivo caratterizzate da un differente livello di suscettibilità all'attacco della mosca, valutato da osservazioni in campo : medio-alta per la cultivar 'Leccino' (Iannotta *et al.*, 2007), resistentissima e sensibilissima rispettivamente per le cultivar 'Ruveia' ed 'Ortice' (Pugliano, 2002). Il controllo endogeno scelto è il gene EF1- $\alpha$ , che codifica per la subunità  $\alpha$  del fattore di elongazione 1 (Shewmaker *et al.*, 1990). Negli esperimenti di quantificazione relativa è, necessario usare un calibratore, che consiste in un genotipo di riferimento rispetto al quale normalizzare i valori di espressione dei geni in studio. Le quantità relative degli mRNA sono state calcolate utilizzando il metodo del Ct comparativo che prevede l'uso di un gene (EF-1 $\alpha$ ) la cui espressione, indipendentemente da fattori esterni, resta costante nei diversi campioni in analisi. Un valore medio dei Ct è stato calcolato per il gene target analizzato e per il gene EF-1 $\alpha$ , sia per il calibratore (pianta sana) che per il campione (pianta attaccata). Il livello di trascritto nelle drupe attaccate rispetto alle sane è stato calcolato mediante la formula che segue (Livak *et al.*, 2001):

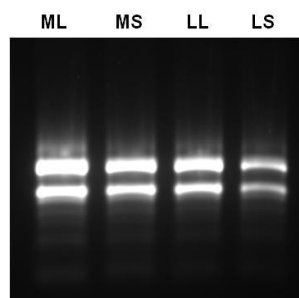
Ratio:  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$

$\Delta Ct = Ct(\text{gene target}) - Ct(\text{gene di riferimento})$

$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct(\text{campione}) - \Delta Ct(\text{calibratore})$

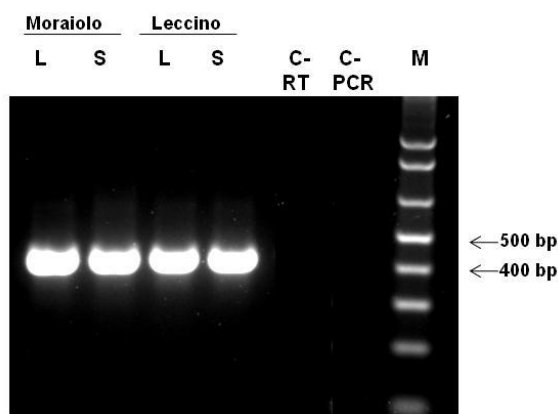
Pertanto per calcolare la variazioni in mRNA sono state effettuate due normalizzazioni per mezzo del software RQ Manager v1.2 (Applied Biosystem), una rispetto al controllo endogeno (EF 1- $\alpha$ ) ed un'altra rispetto al calibratore (pianta sana). La prima normalizzazione permette di esprimere il livello di espressione del gene target nella pianta attaccata rispetto ad un valore fissato a 1 per il gene EF-1 $\alpha$  nella pianta sana, mentre attraverso la seconda normalizzazione è possibile annullare eventuali differenze legate ad errori di stima della quantità di RNA o legate ad una diversa efficienza dell'enzima RT, che catalizza la retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA.

E' stato scelto come calibratore la drupa non attaccata delle cultivar di olivo in esame. La Figura 5.14 mostra un esempio di separazione elettroforetica dell'RNA totale estratto da drupe sane e con galleria larvale delle cultivar di olivo 'Moraiolo' e 'Leccino'.



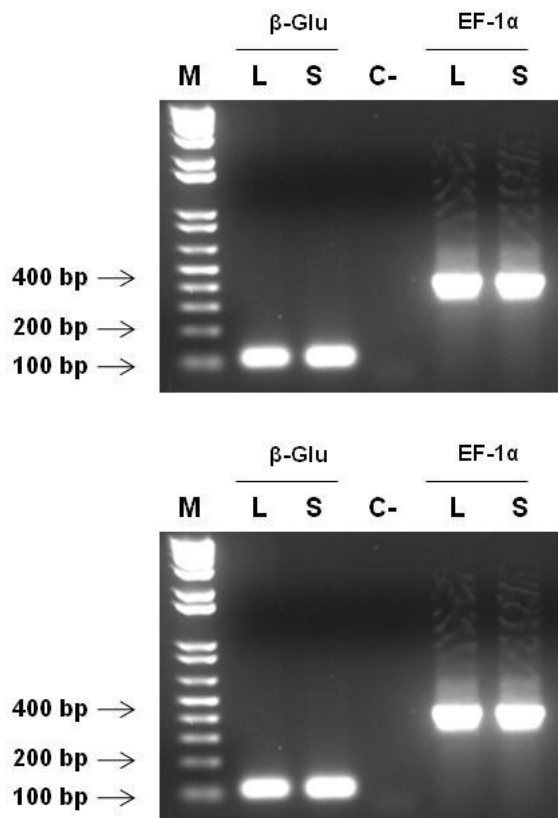
**Figura 5.14:** Esempio di separazione elettroforetica dell'RNA totale estratto da drupe delle varietà di olivo 'Moraiolo' e 'Leccino'. ML: drupe della cv Moraiolo contenenti la galleria larvale; MS: drupe non attaccate della cv 'Moraiolo', usate come controllo; LL: drupe della cv 'Leccino' contenenti la galleria larvale; LS: drupe non attaccate della cv 'Leccino', usate come controllo.

Per tutti gli esperimenti di Real Time PCR, sono state effettuate due sintesi di cDNA per ogni campione di RNA. Per verificare la qualità del cDNA sintetizzato è stata effettuata una reazione di amplificazione PCR con la coppia di primer che amplifica trascritti del gene EF1- $\alpha$ . Come si nota in Figura 5.15, la banda dell'amplificato del gene EF1-  $\alpha$  di dimensioni attese (410 bp), mostra simile intensità del segnale per tutti e quattro i campioni di cDNA analizzati.



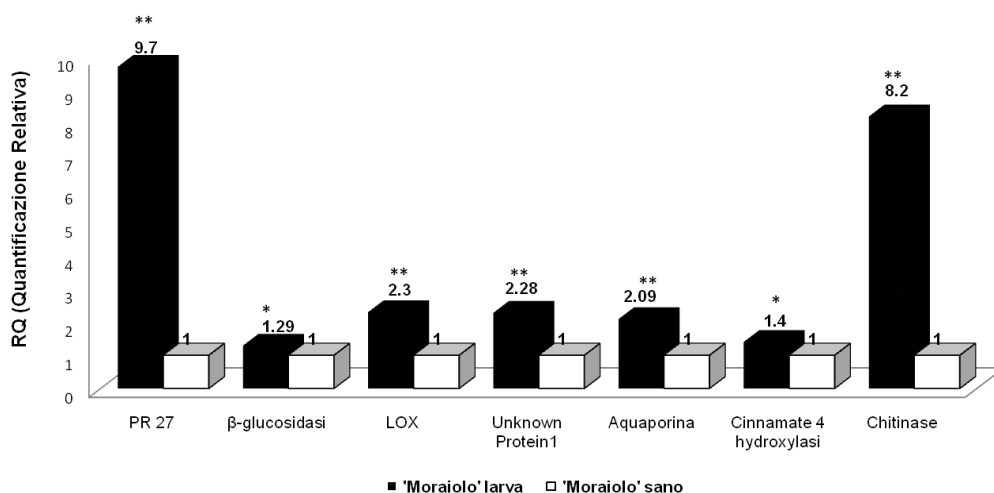
**Figura 5.15:** Esempio di monitoraggio della qualità dei retrotrascritti, mediante separazione elettroforetica in gel di agarosio degli amplificati del gene EF1- $\alpha$  per i campioni di cDNA sinteizzato a partire da RNA estratto da drupe attaccate e controllo delle cv 'Moraiolo' e 'Leccino'. M: 1Kb plus ladder (Invitrogen); L: drupa con galleria larvale; S: drupa sana; C-RT: controllo negativo della sintesi del cDNA; C-PCR: controllo negativo della PCR, miscela priva di template.

Dopo la verifica della buona qualità del cDNA sintetizzato si è proseguito, con l'analisi di espressione Real Time PCR. Di seguito è riportato un esempio di separazione elettroforetica di un'amplificazione PCR, applicando le condizioni Real Time, ai fini di verificare l'efficienza di amplificazione della coppia di primer disegnata, mediante il software "Primer Express", sulla sequenza del trascritto della  $\beta$ -glucosidasi isolata dalla libreria sottrattiva (Figura 5.16).



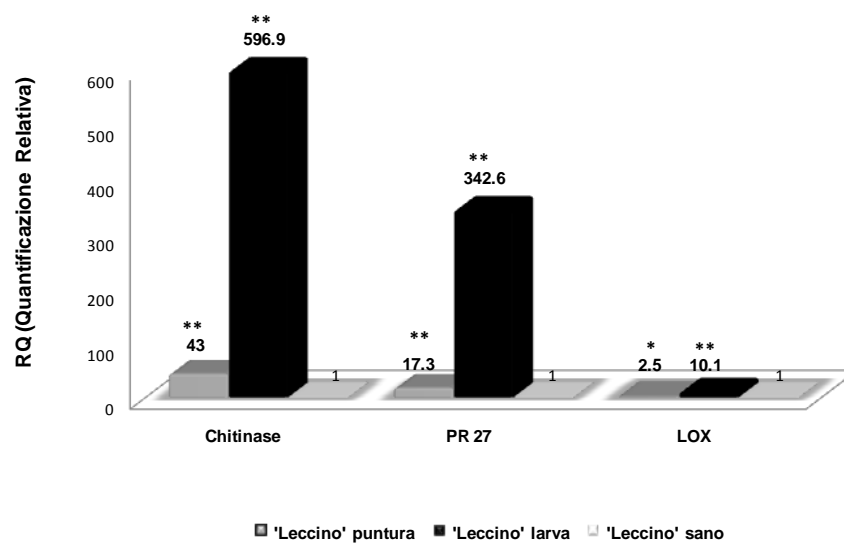
**Figura 5.16:** Esempio di separazione elettroforetica degli amplificati del gene  $\beta$ -glucosidasi ( $\beta$ -Glu) e del gene EF1- $\alpha$  della cv 'Moraiolo', applicando le condizioni di amplificazione usate per la Real Time PCR. M: 1Kb plus ladder (Invitrogen); L: drupa con galleria larvale; S: drupa sana; C-: controllo negativo della PCR, miscela priva di template.

E' stata valutata l'espressione relativa dei trascritti (PR 27,  $\beta$ -glucosidase, LOX, Unknown protein 1, GST, Acquaporina, C<sub>4</sub>H e Chitinasi) nelle drupe con all'interno la galleria larvale rispetto alle drupe sane per la cultivar 'Moraiolo', il risultato è mostrato in Figura 5.17.



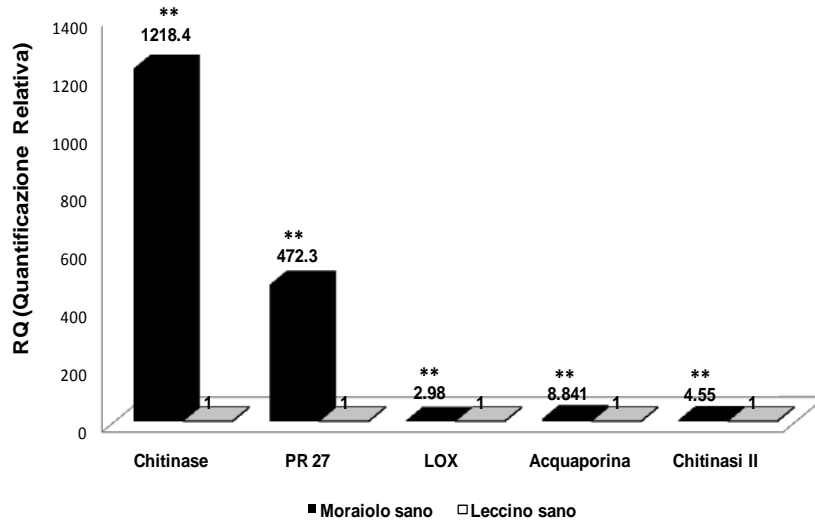
**Figura 5.17:** Espressione relativa dei trascritti, mediante Real Time PCR, nelle drupe attaccate dalla mosca rispetto alle drupe non attaccate della cultivar 'Moraiolo'. E' stato fissato ad uno il livello di espressione dei trascritti nelle drupe sane ed usato come riferimento per l'analisi dei medesimi nelle drupe con galleria larvale. Gli asterischi indicano differenze significative di espressione dei trascritti, fra drupe attaccate e drupe sane (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $0.05 < p < 0.1$ ; t-test).

Si nota che il livello dei trascritti, risulta essere più alto nelle drupe attaccate rispetto a quelle sane, indicando che i trascritti identificati appartengono a geni che sono sovraespressi. Le differenze di espressione dei trascritti in drupe sane e attaccate, risultano statisticamente significative per tutti i trascritti analizzati ( $p < 0.01$ ). I livelli di espressione maggiore (nelle drupe attaccate rispetto a quelle sane), sono stati riscontrati per i trascritti dei geni PR27, Chitinasi e LOX, con valori di RQ rispettivamente di 9,27; 8,2 e 2,3. Pertanto si è pensato di valutare l'espressione relativa di tali geni, anche in un'altra varietà di olivo ('Leccino'), caratterizzata da una suscettibilità alla mosca medio-alta, in due stadi di attacco differenti (drupe con punture di ovideposizione e drupe con galleria larvale). Anche in questo caso, La sovraespressione dei tre trascritti analizzati, è confermata nei due stadi di attacco della cultivar 'Leccino' rispetto alle drupe sane. Inoltre tale sovraespressione, risulta maggiore nella cultivar 'Leccino' rispetto alla cultivar 'Moriaiolo' in risposta all'attacco della mosca. (Figura 5.18).



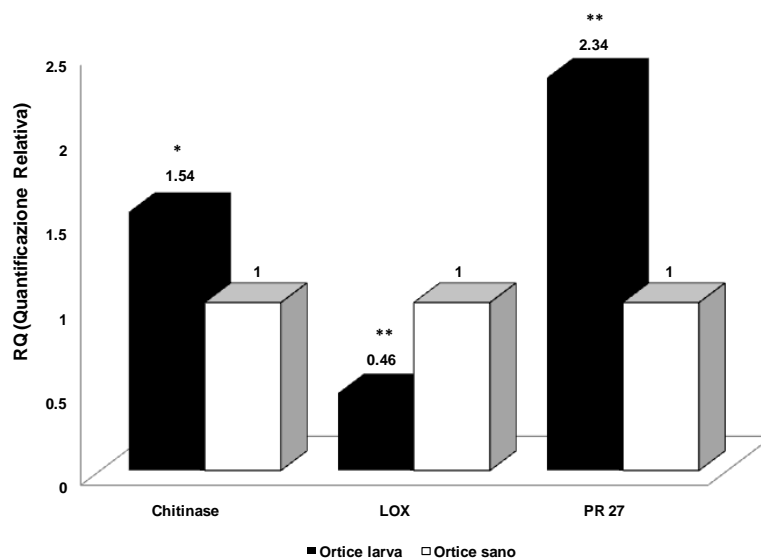
**Figura 5.18:** Espressione relativa dei trascritti, mediante Real Time PCR, nelle drupe attaccate dalla mosca rispetto alle drupe sane della cv 'Leccino'. L'espressione relativa dei trascritti nelle drupe sane della cultivar 'Leccino' è stata fissata ad uno e rispetto ad esso è stato valutato il livello di espressione nelle drupe attaccate. Gli asterischi indicano differenze significative di espressione dei trascritti fra drupe attaccate e drupe sane (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $0,05 < p < 0,1$ ; t-test).

I risultati Real Time hanno mostrato che i tre geni risultano sovraespressi rispettivamente 17,3; 43 e 2,5 volte in drupe con punture di ovideposizione e che la loro espressione aumenta da 8 a 100 volte nelle drupe con gallerie larvali. Visto il differente livello di induzione dei tre trascritti nei tessuti dei frutti attaccati per le due cultivar analizzate, si è ipotizzato un differente livello basale di espressione degli stessi, pertanto è stato ritenuto interessante valutare l'espressione costitutiva dei trascritti PR27, LOX e Chitinasi, nelle drupe non attaccate delle cultivar 'Moriaiolo' e 'Leccino'. E' stata inoltre analizzata anche l'espressione costitutiva dei trascritti Acquaporina e Chitinasi II. Si può osservare che l'espressione relativa dei cinque trascritti in esame (Chitinasi, PR27, LOX, Acquaporina e Chitinasi II) risulta essere maggiore nelle drupe non attaccate della cultivar 'Moriaiolo' rispetto alla cultivar 'Leccino', con valori di RQ rispettivamente di 1218,4; 472,3; 2,98; 8,84 e 4,55 (Figura 5.19).



**Figura 5.19:** Espressione relativa dei trascritti nelle drupe non attaccate delle cultivar 'Leccino' e 'Moraiolo'. E' stato fissato ad 1 il livello di espressione dei tre trascritti nello stadio sano, e rispetto ad esso calcolata l'espressione relativa degli stessi nelle drupe attaccate con galleria larvale. Gli asterischi indicano differenze significative di espressione dei trascritti fra drupe sane delle cv 'Moraiolo' e 'Leccino' (\*\*:  $p < 0,01$ ; t-test).

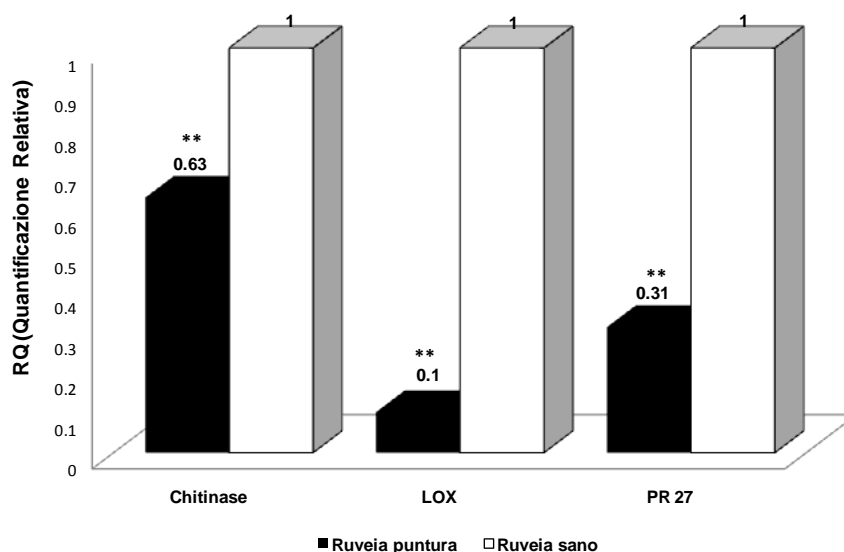
L'espressione relativa dei trascritti dei geni di interesse Chitinasi, LOX e PR 27, risultati sovraespressi nelle drupe attaccate delle cultivar 'Moraiolo' e 'Leccino', è stata valutata anche nelle drupe di olivo, contenenti la galleria larvale, della cultivar campana 'Ortice', sensibilissima all'attacco della mosca (Pugliano, 2002). Risultano sovraespressi i geni Chitinase e PR 27, mentre sottoespresso il gene LOX con un valore di RQ di 0,46 (-2,16 rispetto ad 1) (Figura 5.20).



**Figura 5.20:** Espressione relativa dei trascritti, mediante Real Time PCR, nelle drupe attaccate dalla mosca rispetto alle drupe sane della cultivar 'Ortice'. E' stato fissato ad 1 il livello di espressione dei tre trascritti nello stadio sano, e rispetto ad esso calcolata l'espressione relativa degli stessi nelle drupe attaccate con galleria larvale. Gli asterischi indicano differenze significative di espressione dei trascritti fra drupe attaccate e drupe sane (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $0,05 < p < 0,1$ ; t-test).

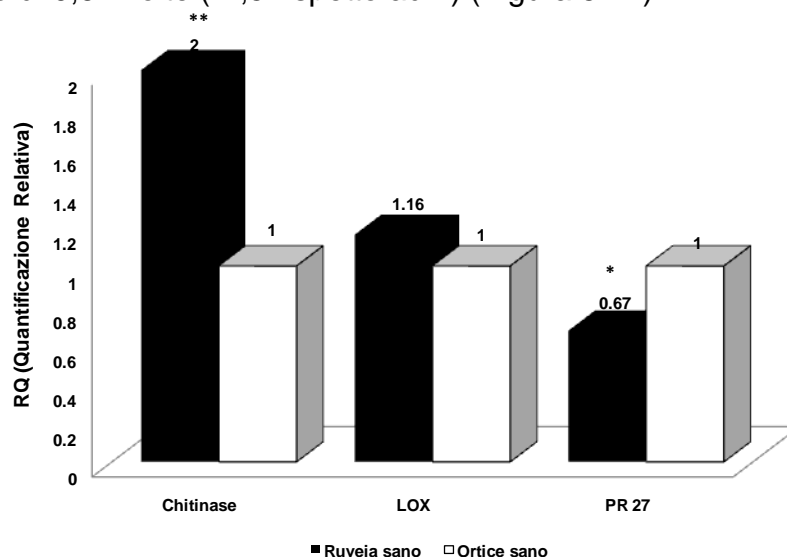
Per la cultivar di olivo 'Ruveia', resistentissima alla mosca (Pugliano, 2002), non è stato possibile riscontrare nelle drupe la presenza di una galleria larvale scavata nella polpa, per tanto si è proceduto valutando solo lo stadio biologico di attacco

puntura. Come si può notare i tre geni analizzati Chitinasi, LOX e PR27, risultano sottoespressi nelle drupe attaccate, con un valore di RQ rispettivamente di 0,63 (-1,58 rispetto a 1), 0,1 (-9,61 rispetto a 1) e 0,31 (-3,18 rispetto a 1) (Figura 5.21).



**Figura 5.21:** Espressione relativa dei trascritti, mediante Real Time PCR, nelle drupe attaccate dalla mosca rispetto alle drupe sane della cultivar 'Ruveia'. E' stato fissato ad 1 il livello di espressione dei tre trascritti nello stadio sano, e rispetto ad esso calcolata l'espressione relativa degli stessi nelle drupe attaccate con puntura di ovideposizione. Gli asterischi indicano differenze significative di espressione dei trascritti fra drupe attaccate e sane (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $0,05 < p < 0,1$ ; t-test).

Relativamente all'analisi dell'espressione costitutiva dei tre geni (Chitinasi, LOX e PR27) per le cultivar 'Ruveia' ed 'Ortice', si nota che il gene Chitinasi risulta sovraespresso 2 volte nelle drupe sane della cultivar 'Ruveia', mentre il gene PR 27 sottoespresso di 0,67 volte (-1,5 rispetto ad 1) (Figura 5.22).

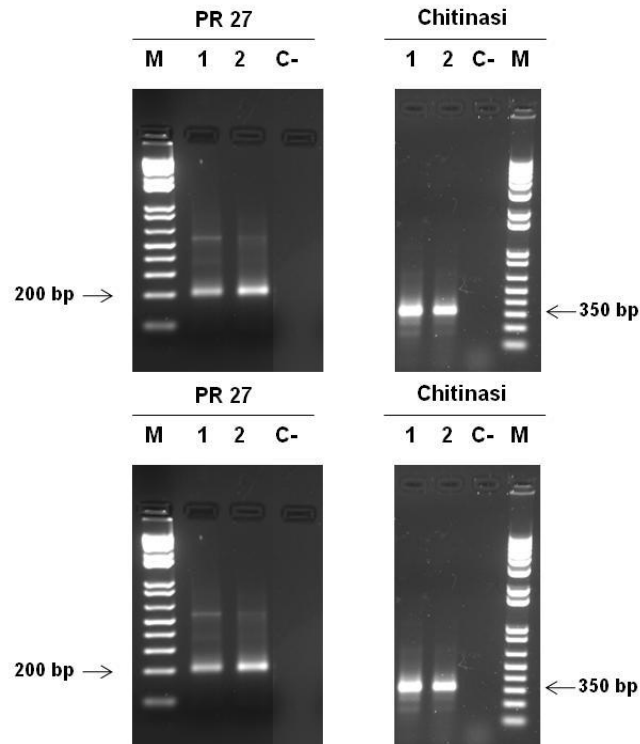


**Figura 5.22:** Espressione relativa dei trascritti nelle drupe non attaccate dalla mosca delle cultivar 'Ruveia' e 'Ortice'. E' stato fissato ad 1 il livello di espressione dei trascritti nelle drupe non attaccate della cultivar 'Ortice' e rispetto ad essa è stata valutata l'espressione relativa dei tre geni nella cultivar 'Ruveia'. Gli asterischi indicano differenze significative di espressione dei trascritti fra le drupe sane delle cv 'Ruveia' e 'Ortice' (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $0,05 < p < 0,1$ ; t-test).



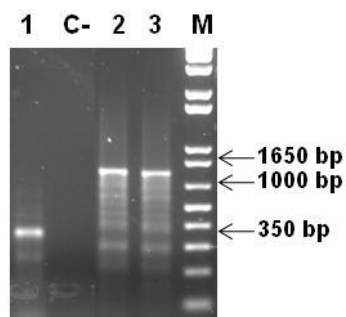
### 5.3.4 RACE PCR di due geni putativamente coinvolti nel meccanismo di difesa dell'olivo alla mosca: Chitinasi ed una Proteina correlata alla patogenesi (PR27)

In base ai risultati ottenuti dall'analisi di espressione, si è pensato di procedere con l'identificazione dei cDNA di una proteina coinvolta nella patogenesi (PR27) (Okushima *et al.*, 2000) e di una chitinasi di classe I, indotte dall'attacco della mosca. Pertanto è stata effettuata la RACE-PCR. Di seguito è riportato un esempio di separazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione della 3' e 5'-RACE per i geni Oe-PR27 e Oe-Chitinasi, ai fini di verificare la presenza della banda di dimensioni attese (Figure 5.23 e 5.24).



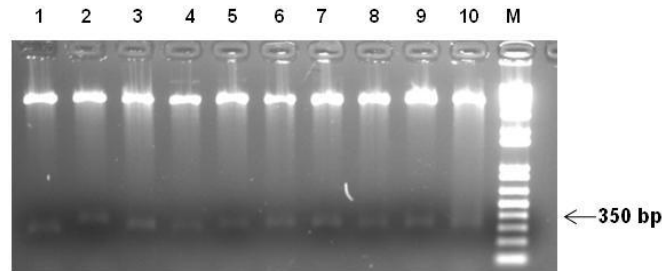
**Figura 5.23:** Separazione elettroforetica in gel di agarosio degli amplificati della 3'-RACE PCR per i geni PR27 e Chitinasi. 1: prodotto PCR amplificato ad una Ta di 58°C; 2: prodotto PCR amplificato ad una Ta di 60°C; M: 1Kb plus ladder (Invitrogen); C-: controllo negativo della PCR, miscela priva di template.

Come si può notare l'estensione al 3' per entrambi i trascritti, ha fornito una banda di ca 200 bp per Oe-PR27 ed una di ca 350bp per Oe-Chitinasi. La separazione elettroforetica dei prodotti PCR dei trascritti estesi al 5', ha mostrato una banda di circa 350 bp per Oe-Chitinasi ed una di circa 1300 bp per Oe-PR27 (Figura 5.24).



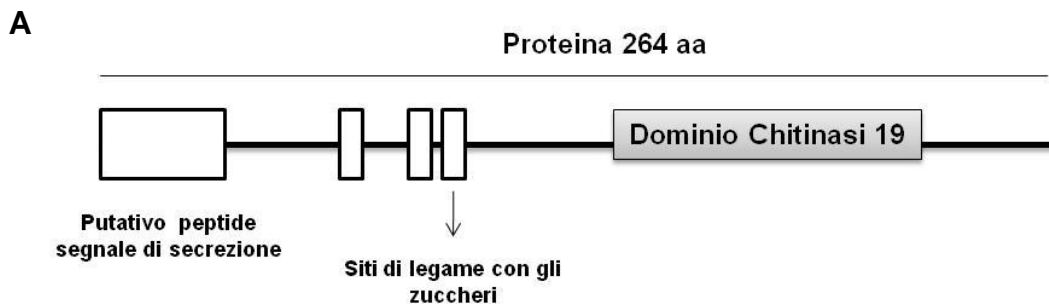
**Figura 5.24:** Separazione elettroforetica in gel di agarosio degli amplificati della 5'-RACE PCR per i geni Oe-Chitinasi e Oe-PR 27. 1: Oe-Chitinasi; 2 e 3: Oe-PR 27. M:1Kb plus ladder (Invitrogen); C-: controllo negativo della PCR, miscela priva di template.

I prodotti RACE ottenuti sono stati clonati nel vettore pGEM-Teasy (Promega) ed i cloni positivi alla digestione con l'enzima EcoRI, sono stati sequenziati mediante il metodo Sanger. In Figura 5.25 è riportato un esempio di separazione elettroforetica in gel di agarosio dei prodotti di digestione del plasmide ricombinante contenente i frammenti di amplificazione della 3'RACE del gene Chitinasi, ottenuti mediante l'enzima EcoRI .



**Figura 5.25:** Separazione elettroforetica in gel di agarosio del DNA plasmidico ricombinante dei prodotti 3'-RACE del gene Chitinasi, digerito con l'enzima EcoRI per la verifica della presenza dell'inserto. M: 1Kb plus ladder (Invitrogen).

Relativamente ai geni Oe-Chitinasi e Oe-PR 27, dall'assemblaggio delle sequenze dei rispettivi cloni, è stato possibile ottenere per la Chitinasi, la completa regione codificante del cDNA di 950 bp, riuscendo complessivamente ad estendere al 3' e al 5' la sequenza originaria (291 nt) del trascritto isolato dalla libreria sottrattiva, di 659 nt. Dall'analisi di similarità locale della putativa sequenza aminoacidica dedotta (268 aa) è stato possibile individuare un dominio conservato che conferma la funzione e l'appartenenza alla superfamiglia delle Chitinasi 19. Tale famiglia proteica, trovata principalmente nelle piante, comprende Chitinasi di classe I, II, III e IV. Le Chitinasi di classe I e di classe II mostrano domini catalitici simili. Le Chitinasi di classe I, presentano un residuo N-terminale ricco in cisteina ed un dominio di legame per la chitina che risulta separato dal dominio catalitico attraverso una regione ricca in prolina e glicina, tale dominio risulta assente nelle Chitinasi di classe II. Sono stati inoltre individuati tre putativi residui catalitici e quattro siti di legame con gli zuccheri. Per la predizione della localizzazione subcellulare, effettuata mediante i software TargetT e iPSORT, è stato individuata la presenza di un putativo peptide segnale di secrezione (SP) N-terminale di 19 aa (Figura 5.27).

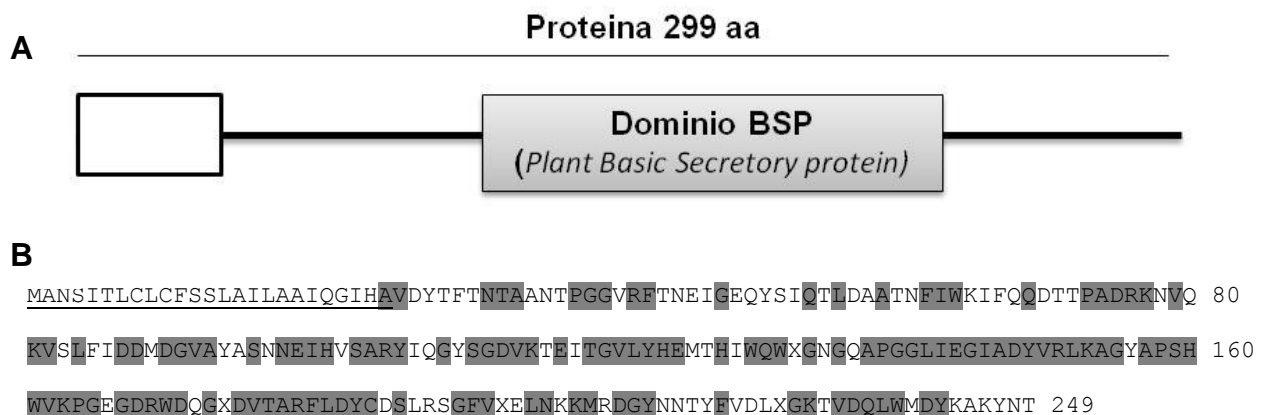


## B

MKTLVLVLLSLSSLMGAWAQGGVDSIIISKSLFDEMLKHRNDGNCPANGFYTYEAFIAAANSFGAFGTTGDTDRKREIAA 80  
FLAQTSHETTTGGWASAPDGPYSWGYCYKQEQGNPPDYCVASQEWPCAPGKKYFGRGPIQISYNNYGPAGKAIGSDLLND 160  
PDAVANDPTISFKTAFWFWMTXQAPKPSCHDAMSGVWKPSAADTAAGRVPGYGVVTNIIINGGIECGKGSNPOMEDRIGFY 240  
KRYCDLLGVGYGPNLDCNNQKSFA 264

**Figura 5.27:** Rappresentazione schematica (A) e rispettiva sequenza aminoacidica (B) di Oe-Chitinasi. Evidenziati in grigio, nella sequenza aminoacidica, risultano i residui catalitici. Il triangolo identifica, i siti di legame con gli zuccheri. Sottolineato in nero, risulta il putativo peptide segnale di secrezione di 19 aa.

La sequenza nucleotidica della completa regione codificante del cDNA di Oe-PR 27, ottenuta dall'analisi 3' e 5' RACE è pari a 926 nt. La sequenza amminoacidica (229 aa) dedotta è stata confrontata con l'insieme delle sequenze proteiche della banca dati, ottenendo la massima similarità locale con la proteina NtPRp27, nuovo membro della famiglia delle PR basiche identificato in *Nicotiana Tabacum* (Okushima *et al.*, 2000). Tale analisi ha rivelato, inoltre la presenza di un dominio conservato, confermando la putativa funzione e l'appartenenza alla super famiglia delle BSP (*Plant basic secretory protein*), le cui proteine si ritiene siano coinvolte nei meccanismi di difesa delle piante contro gli organismi patogeni. La predizione della localizzazione subcellulare della putativa proteina Oe-PR 27, ha permesso di individuare la presenza di un putativo peptide N-terminale di 25 aa che dovrebbe indirizzare la proteina all'interno della via di secrezione (Figura 5.28).



**Figura 5.28:** Rappresentazione schematica (A) e sequenza aminoacidica (B) di Oe-PR27. Evidenziati in grigio, nella sequenza aminoacidica, risultano i residui conservati. Sottolineato in nero, risulta il putativo peptide segnale di secrezione di 25

## 6. DISCUSSIONI

### 6.1 Studio della diversità genetica delle cultivar di olivo meridionali e tracciabilità genetica dell'olio di oliva monovarietale

I marcatori del DNA sono considerati un utile strumento, da affiancare ai marcatori fenotipici, per l'identificazione varietale e sono ampiamente usati per lo studio della variabilità e diversità genetica nell'ambito di una collezione di germoplasma. Nonostante il notevole sforzo compiuto nell'ultimo decennio per la caratterizzazione molecolare e identificazione delle cultivar di olivo, e di quelle italiane in particolare, probabilmente ciò che è mancato è il coordinamento fra i diversi gruppi, comportando così l'impossibilità di comparazione fra i dati ottenuti e la loro immissione in una banca dati (Baldoni *et al.*, 2005). Inoltre, in olivo i casi di sinonimia ed omonimia sono ancora frequenti (Rao *et al.*, 2009). Tra i diversi marcatori molecolari utilizzati, i microsatelliti sono considerati i marcatori per eccellenza, grazie alla natura codominante, alla capacità discriminante ed alla riproducibilità fra i diversi laboratori (Rallo *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Bracci *et al.*, 2009).

La Campania, è una regione caratterizzata da un patrimonio varietale olivicolo ricco, capace di produrre oli di ottima qualità e tipicità, quest'ultima garantita dalla interazione varietà-territorio (Pugliano, 2002). Nel presente lavoro di tesi sono state analizzate 47 cultivar di olivo, sia campane che del Sud Italia, mediante sei loci SSR. I risultati ottenuti confermano innanzitutto l'efficienza dei marcatori SSR scelti per la genotipizzazione delle cultivar di olivo, evidenziando la ricchezza genetica del germoplasma di olivo del Sud Italia. Il *fingerprinting* del DNA, come si evince dalla rappresentazione delle relazioni genetiche, evidenzia gruppi ben distinti in cui si collocano le varietà campane. È possibile che il germoplasma di olivo campano risulti essere geneticamente differente da quello delle regioni limitrofe, visto che molte cultivar di olivo con una diffusione limitata mostrano avere una origine locale (Besnard *et al.*, 2001). Si ritiene che la specificità locale potrebbe essere il risultato di incroci, mediante impollinazione, delle accessioni di olivo con popolazioni selvatiche locali (Owen *et al.*, 2005). È noto che le forme locali selvatiche di olivo siano state selezionate e coltivate o incrociate per migliorare caratteristiche agronomiche interessanti per gli alberi di olivo. Diversi autori ritengono che le cultivar di olivo e le piante selvatiche che hanno la stessa origine geografica mostrano genotipi tra loro correlati (Contento *et al.*, 2002; Belaj *et al.*, 2007; Baldoni *et al.*, 2006). Una stretta correlazione fra olivi selvatici e coltivati è emersa dopo analisi dei polimorfismi del DNA nucleare, cloroplastico e mitocondriale (Besnard e Bervillè 2000; Hess *et al.*, 2000).

I loci SSR utilizzati per il *fingerpinting* del DNA, sono stati scelti dalla letteratura per l'elevato potere discriminante e per la capacità di fornire un elevato numero di alleli, escludendo i marcatori monomorfici (Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; Carriero *et al.*, 2002). Tutte le coppie di primer SSR, hanno fornito un chiaro profilo di amplificazione e nessun locus è risultato monomorfico. Le cultivar che hanno fornito un solo allele sono state considerate omozigoti a quel locus SSR. La diversità genetica calcolata in teoria potrebbe essere sottostimata. In letteratura è riportato un caso in olivo, in cui il polimorfismo al "priming site" ha provocato la mancata amplificazione degli alleli (alleli nulli) al locus SSR IAS- oli12 (Rallo *et al.*, 2000). Quando le mutazioni ricorrono al livello dei "priming site", ne risulta una mancata amplificazione e quindi una sovrastima dell'omozigosità (Shaw *et al.*, 1999).

Amplificando il DNA di diverse cultivar con la coppia di primer IAS-oli12, sistematicamente l'amplificazione ha fallito o si è ottenuto un segnale piuttosto debole per alcuni alleli. Tale problema può essere superato, mediante il disegno *de-novo* di una coppia di primer in differenti posizioni nelle regioni *flanking* (Rallo *et al.*, 2000). L'identificazione degli alleli nulli è abbastanza comune, soprattutto nelle specie vegetali che hanno un elevato grado di variabilità ed eterozigosità. Gli alleli nulli sono stati individuati anche in altre specie vegetali legnose propagate vegetativamente come il melo (Gianfranceschi *et al.*, 1998), il pino (Fisher *et al.*, 1998) e il faggio (Tanaka *et al.*, 1999). La presenza degli alleli nulla è indicata da un eccesso di omozigosità. D'altro canto l'analisi di eventuali alleli nulli potrebbe essere condotta mediante studi di segregazione degli SSR, utilizzando popolazioni derivanti da incrocio controllato. Nel caso delle piante arboree questo richiede ovviamente diversi anni per verificare se le popolazioni saggiate siano poi in grado di fornire segregazioni del locus di interesse. Anche per i 37 marcatori SSR, testati per la definizione di un set comune di marcatori molecolari da usare per la caratterizzazione e identificazione delle cultivar di olivo in Italia, è stata stimata la frequenza degli alleli nulli. È emerso che tale frequenza è pari allo 0% per 16 loci e uguale al 32% per 3 loci, mentre è superiore al 5% per 14 loci SSR (Baldoni *et al.*, 2009).

L'alto numero di alleli ed il polimorfismo riscontrato, è atteso per i marcatori SSR, visto che hanno origine da regioni di DNA non codificante e per tanto non soggetti a pressione selettiva (Testolin *et al.*, 2000).

I valori di eterozigosità, sia attesa che osservata, ed il numero di alleli ottenuti a ciascun locus SSR analizzato, sono comparabili con quelli riscontrati in differenti studi di diversità genetica del germoplasma di olivo di altre regioni di Italia, sia meridionali come la Sicilia e la Campania (La Mantia *et al.*, 2005; Corrado *et al.*, 2009), che settentrionali come l'Emilia Romagna (Ganino *et al.*, 2007). Per identificare la coppia di primer, fra quelli usati, con la più spiccata capacità di discriminare fra le cultivar analizzate, è stato calcolato il potere discriminante (D). Tale indice, come suggerisce la letteratura (Aranzana *et al.*, 2002) può variare da zero, per i marcatori monomorfici a uno, quando tutti i campioni analizzati sono stati discriminati. I loci con il più alto potere discriminante sono risultati essere il DCA 3 ed il DCA 16, con un valore di D pari a 0,893 per entrambi i loci marcatori, ciò è in accordo con i diversi studi riportati in letteratura. Ad esempio in uno studio sulla caratterizzazione di 30 cultivar di olivo meridionali mediante l'uso di 16 loci SSR, è emerso che il locus più efficiente e con la migliore capacità di distinguere fra cultivar è il DCA3 (D: 0,947) (Alba *et al.*, 2009). Anche Sarri *et al.* (2006), caratterizzando mediante 20 SSR, 118 varietà di olivo provenienti da diversi paesi del Bacino del Mediterraneo, hanno rilevato che i loci più efficienti per l'identificazione sono il DCA 3 (D: 0,9541) ed il DCA 16 (0,9616). Infine anche in un recente studio, dove sono state caratterizzate 14 cultivar campane, con il medesimo set di loci SSR impiegato nel presente lavoro di tesi, è emerso che il locus SSR che meglio individua il polimorfismo all'interno di una popolazione è il DCA 16 (Corrado *et al.*, 2009). L'elevato livello di diversità genetica dell'olivo è principalmente il risultato della propagazione vegetativa tradizionale, della longevità, dell'abilità delle piante arboree a rigenerarsi spontaneamente e della capacità di sopravvivere anche in assenza di coltivazione (Carriero *et al.*, 2002). In letteratura si riporta che è possibile identificare 42 cultivar su 46 con soli cinque microsatelliti; per cui circa l'88% delle cultivar potrebbe essere identificato con appena tre microsatelliti (Rallo *et al.*, 2000). È noto che in molti casi risultano sufficienti pochi marcatori per discriminare gli individui e

classificarli in raggruppamenti ben differenziati (Franco *et al.*, 2001). L'appropriatezza dei loci selezionati è confermata dal valore medio degli alleli ottenuti per l'analisi genetica effettuata (ca 14).

In olivo, gli errori di denominazione sono più diffusi per le varietà coltivate a livello locale, poiché sono usualmente poco caratterizzate al livello morfologico (Rao *et al.*, 2009). I risultati ottenuti dal *fingerpinrting* del DNA delle 47 varietà analizzate, mostrano che è possibile distinguere tutte le singole varietà, fatta eccezione delle cultivar 'Sant'Agostino' e 'Uova di Pavone', che hanno fornito lo stesso profilo allelico a tutti e sei i loci SSR. Le due varietà, infatti, sono entrambe eterozigoti per 5 loci su 6, ed omozigoti al locus SSR UDO99-031. Sarebbe opportuno comparare i dati morfologici ed agronomici con quelli molecolari, per chiarire se effettivamente si è di fronte ad un caso di sinonimia o di erronea denominazione.

È oggi possibile identificare l'origine geografica degli oli di oliva mediante l'uso dei marcatori del DNA. Nonostante diverse tecniche chimiche e biochimiche siano state impiegate per garantire l'autenticità dei prodotti agroalimentari, negli ultimi anni i metodi che si basano sull'analisi del DNA sono diventati un validissimo strumento nell'ambito della tracciabilità di filiera. Difatti alcuni metodi impiegati per lo studio della composizione degli alimenti crudi, perdono di efficacia se applicati ai cibi processati (Woolfe e Primrose, 2004). Considerando l'alto potere discriminante dei loci impiegati in questo lavoro di tesi, si è verificata la loro funzionalità per la tracciabilità genetica nell'ambito della filiera olivo-olio. La letteratura indica che il DNA isolato dagli oli di oliva è sottoforma di frammenti le cui dimensioni sono sufficienti per ottenere ampliconi di ca 150 bp (Breton *et al.*, 2004; Pasqualone *et al.*, 2004). Per gli studi di tracciabilità sono stati analizzati gli oli monovarietali delle cultivar 'Frantoio', 'Pisciottana' 'Leccino'. Sono state inoltre testate ed individuate le condizioni ottimali di amplificazione del DNA. La procedura di estrazione del DNA da olio ha permesso di estrarre quantità sufficienti di DNA, allo stesso tempo riducendo o eliminando l'attività di eventuali inibitori della PCR (e.g polifenoli e polisaccaridi che inibiscono l'attività della Taq DNA polimerasi). Il DNA estratto dai tre oli vergini monovarietali usato per l'analisi SSR, ha fornito profili allelici identici a quelli ottenuti a partire da DNA isolato da foglie delle medesime cultivar. È stata inoltre verificata la capacità dei marcatori SSR di identificare la composizione varietale in miscele semplici di DNA isolati da oli monovarietali differenti. I risultati ottenuti mostrano che, almeno per i loci SSR impiegati, è possibile identificare il DNA di due distinte cultivar di olivo, quando miscelate in un rapporto di 1:1. I rapporti quantitativi dei segnali cv-specifici non sono però in perfetta corrispondenza con il rapporto iniziale delle molecole di template. Sono quindi necessari degli ulteriori approfondimenti per quanto riguarda gli aspetti quantitativi di tale metodologia di analisi. I dati hanno comunque indicato che il *profiling* delle cv è uno strumento che può integrare le analisi degli oli monovarietali per certificarne la loro genuinità genetica. In letteratura, inoltre, si riporta la presenza di alleli addizionali nei profili ottenuti a partire da olio di oliva estratto da paste, realizzate mediante gramolatura delle drupe intere non denocciolate. La presenza di alleli paterni è da ascrivere al contributo degli embrioni dell'endocarpo. È stato quindi dimostrato che i profili ottenuti dagli oli di oliva, sono una miscela di alleli materni e paterni, pertanto l'identificazione varietale mediante marcatori del DNA non è una semplice questione di corrispondenza fra profilo allelico dell'olio e del campione di foglia di riferimento. Difatti, il numero delle possibili combinazioni alleliche, è anche aggravato dagli elevati livelli di eterozigotità in olivo. Pertanto oltre ai problemi legati alla capacità di estrarre da olio quantità di DNA amplificabile, senza dubbio la presenza di DNA paterno proveniente dagli embrioni,

aumenta la difficoltà dell'analisi (Doveri *et al.*, 2006). Ad ogni modo la presenza di alleli paterni non è considerata un ostacolo insormontabile per l'analisi della composizione varietale di un olio, poiché gli oli DOP, sono ottenuti da cultivar che sono coltivate in specifiche regioni, dove risulta limitata la presenza degli impollinatori che crescono in aree lontane dagli alberi di olivo da olio. Pertanto il problema legato alla presenza di alleli paterni, potrebbe essere ovviato mediante l'uso di marcatori del DNA mitocondriale o cloro plastico (Doveri *et al.*, 2006). Nel presente lavoro di tesi, non è stata riscontrata la presenza di alleli addizionali, in accordo con i risultati precedentemente ottenuti da Muzzalupo *et al.* (2007). Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che il materiale di partenza usato per la produzione di olio di oliva ha un'origine genetica nota oppure potrebbe essere correlato anche alle differenze nei metodi di estrazione di olio impiegati. Difatti, è stato usato olio di oliva non è stato prodotto dalla rottura di drupe intere non denocciolate sottoposte a gramolatura, mediante l'uso di un omogeneizzatore, fino ad ottenere una fine pasta di olive, dalla quale attraverso la separazione delle fasi solido-liquida e successivamente liquida-liquida è stato estratto l'olio.

Nonostante andrebbero ulteriormente chiariti alcuni aspetti correlati alla sensibilità ed efficacia del metodo usato per l'identificazione della composizione varietale in miscele di oli più complesse, è possibile affermare che, gli SSR rappresentano un valido strumento per garantire la tracciabilità genetica in ciascuna fase della filiera produttiva olivo-olio, la rispondenza ai marchi DOP e IGP, ed infine la qualità del prodotto finito, salvaguardando così gli agricoltori, le aziende produttrici ed i consumatori, anche da eventuali frodi.

## **6.2 Costruzione di *core subset* per la conservazione della diversità genetica in olivo (*Olea europea* L.), mediante l'uso dei marcatori molecolari SSR**

La conservazione delle risorse di un germoplasma include tutte quelle attività correlate al *managment* del germoplasma stesso, come la costruzione di una collezione, il suo mantenimento, la valutazione dello stato sanitario delle piante, gli scambi di materiale fra diversi enti di ricerca e la documentazione e certificazione dell'identità varietale. Nel presente lavoro di tesi, sono state costruite cinque subset di dimensioni distinte, mediante l'uso di tre algoritmi, utilizzando i dati ottenuti dall'analisi *fingerprint* mediante marcatori molecolari SSR, a partire da una collezione di germoplasma di 378 genotipi provenienti da 21 paesi, che rappresentano le principali aree di coltivazione dell'olivo a livello mondiale. L'utilità di un *core subset* risiede nella sua capacità di contenere la diversità genetica della collezione iniziale. Dai risultati ottenuti evince che occorrono 133 e 151 individui (30% e 40% della collezione iniziale) rispettivamente, per rappresentare la diversità dell'intera collezione e per contenere tutti gli alleli maggiormente frequenti. Il confronto dei risultati ottenuti con gli altri studi riportati in letteratura non è semplice, sia per le diverse caratteristiche biologiche delle specie vegetali analizzate sia perché raramente le analisi sono eseguite allo stesso modo. I migliori subset ottenuti, rappresentano rispettivamente il 30% ed il 40% delle accessioni conservate nella collezione originaria. Tali valori risultano maggiori rispetto al 5-20% raccomandato da diversi autori (Brown *et al.*, 1987; Schoen e Brown, 1993; Van Hintum, 1999; Van Hintum *et al.*, 2000), ma sono comunque più bassi rispetto a quanto emerso da altri studi: ad esempio un *core subset* ottenuto mediante lo stesso metodo in *Anacardium occidentale*, ha richiesto il 60% degli individui selezionati per rappresentare più del 90% della diversità genetica (Dhanaraj *et al.*, 2002). Mentre valori simili sono stati

ottenuti per *Medicago trunculata* (Ellwood *et al.*, 2006) e *Santalum album* (Shashidhara *et al.*, 2003), dove il miglior *core subset* presenta rispettivamente il 34% ed il 41% delle accessioni conservate nella collezione iniziale. Inoltre, per i due migliori subset non sono state registrate differenze significative dei parametri variabilità (He e Ho) analizzati, rispetto alla collezione iniziale. Quando si è tentato di minimizzare il numero di alleli non informativi (PN) e massimizzare la copertura (CV), la soluzione ottimale è stata riscontrata nelle *core* del 30% e 40% costruite mediante il software MSTRAT, aventi rispettivamente valori di PN e CV di 0,01 e 0,99. L'intensità di campionamento influenza le diverse misure genetiche (MR, CE, SH, He ed Ne) calcolate, come è emerso da uno studio in mais, in cui a partire da una data set ottenuto dall'analisi delle frequenze alleliche di 521 individui a 26 loci SSR, sono state costruite *core subset* di tre distinte dimensioni: 10%, 20% e 30% (Thachuk *et al.*, 2009). È emerso che *core subset* con una intensità di campionamento del 10%, presentano generalmente valori medi delle distanze genetiche più alti rispetto a *core subset* del 20% e del 30%. Di contro, come atteso, *core subset* con una intensità di campionamento del 30% conservano gli alleli rari in maniera migliore rispetto a *core* di dimensioni inferiori, ma forniscono valori medi inferiori delle distanze genetiche (Thachuk *et al.*, 2009). Tra le sei distinte strategie utilizzate per la costruzione dei cinque *core subset*, soltanto la strategia di campionamento che usa l'algoritmo Core Hunter, che contemporaneamente massimizza due misure genetiche (la distanza genetica di Rogers modificata, e l'indice di Nei), ha permesso di ottenere i valori più alti dei parametri genetici calcolati (MR, CE, SH, He ed Ne). Ciò concorda con quanto riportato in letteratura, in cui dalla comparazione di diverse strategie di campionamento (MSTRAT, Metodo D e Core Hunter), è emerso che per ogni data set analizzato, l'algoritmo Core Hunter ha fornito un *core subset* che meglio massimizza ciascuna misura genetica (MR, CE, SH, He ed Ne) calcolata, fatta eccezione per la percentuale di alleli non informativi (PN) e la percentuale di copertura (CV), dove i valori ottimali sono stati ottenuti dal *core subset* costruito mediante il metodo MSTRAT (Thachuk *et al.*, 2009), come è emerso anche dai risultati qui presentati.

Le procedure di valutazione dello stato fitosanitario delle piante e di eradicazione delle malattie, sono infatti fondamentali per salvaguardare l'integrità del germoplasma. Le colture propagate vegetativamente possono infatti accumulare patogeni in maniera sistemica, dal momento che sono privi di una sorta di protezione dall'attacco dei patogeni offerta dallo stadio di produzione dei semi (McKey *et al.*, 2010). Per questo motivo disporre di tecniche capaci di identificare tanto gli agenti patogeni quanto quelli virali, in maniera precisa ed inequivocabile, è uno dei prerequisiti fondamentali per la conservazione in una collezione di germoplasma di genotipi fitosanitari sani. Attualmente le tecniche di diagnosi molecolare sono in rapida espansione in patologia ed in virologia vegetale (Bertolini *et al.*, 2003; Schena *et al.*, 2004; Quesada *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2008). I vantaggi di queste tecniche, rispetto a quelle classiche biologiche e sierologiche, sono legati al fatto che hanno come bersaglio gli acidi nucleici del patogeno, sempre presenti nella cellula ospite indipendentemente dalle fasi del ciclo vitale dell'ospite e del patogeno; analizzano il patogeno in modo specifico ed infine sono estremamente sensibili, in grado cioè di rilevare la presenza dei virus e del patogeno anche in piante asintomatiche. Tali tecniche sono utili soprattutto per la diagnosi dei virus, laddove le tecniche classiche sierologiche e biologiche, mostrano diverse limitazioni di impiego (Bertolini *et al.*, 2001; Bertolini *et al.*, 2003; Faggioli *et al.*, 2002; Faggioli *et al.*, 2005).



Per esempio per la diagnosi di virus che mostrano scarso potere immunogeno, virus difficilmente purificabili dalle piante ospiti, viroidi, etc (Saponari *et al.*, 2005). Per la valutazione dello stato sanitario di piante e materiali di propagazione di olivo, queste tecniche risultano l'unico mezzo da applicare per l'identificazione dei virus e risultano invece un valido strumento di supporto alle tecniche classiche di isolamento per la diagnosi precoce del fungo patogeno *V. dahliae* nel legno delle piante infette (Nigro *et al.*, 2002). Inoltre la scarsa reattività sintomatica dell'olivo alle infezioni virali, la latenza delle infezioni, la scarsa affidabilità delle tecniche immunologiche, sono tutti fattori che hanno spinto verso l'utilizzo di metodiche di diagnostica molecolare. Pertanto per l'identificazione dei principali patogeni e virus dell'olivo, sono state utilizzate tecniche molecolari descritte e messe a punto recentemente (Bertolini *et al.*, 2003; Mercado-Blanco *et al.*, 2003).

Nel presente lavoro di tesi è stata, investigata la presenza del batterio *Pseudomonas savastanoi*, responsabile della tubercolosi dell'olivo, meglio conosciuta come rogna dell'olivo, su di un totale di 174 piante propagate vegetativamente. È fondamentale che la lotta contro tale batterio sia di tipo preventivo, vista la scarsa disponibilità di efficaci battericidi. Di qui nasce l'esigenza di identificare tempestivamente la presenza del batterio in pianta (Penalver *et al.*, 2005). La presenza del batterio *P. savastanoi* è stata confermata mediante Real Time PCR, nel 7,5% delle piante di olivo analizzate, tale risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura (Bertolini *et al.*, 2003), in cui mediante l'associazione di una nested PCR e di una ibridazione *dot-blot*, è stata riscontrata in piante asintomatiche una diffusione del patogeno simile a quella qui riportata, con una percentuale di piante infestate variabile dal 11,6% al 20% a seconda della stagione in cui è stata effettuata l'analisi. È noto infatti che il batterio può crescere in un range di temperatura che varia da 5 a 37°C, anche se la temperatura ottimale di crescita è di 22-25°C (Protta, 1995). Pertanto periodi più favorevoli per l'infezione batterica sono l'autunno e la primavera, in cui la temperatura e l'umidità favoriscono la massima proliferazione della popolazione batterica. Ad ogni modo risulta poco frequente e non estesa la diffusione sistemica del batterio all'interno della pianta (Wilson e Magie, 1964), mentre la sua diffusione via seme non è stata mai dimostrata. È inoltre noto che la mosca dell'olivo può veicolare microrganismi, tra cui *P. savastanoi*, che è un tipico colonizzatore che stabilisce una relazione patogena con la pianta di olivo ospite (Scortichini *et al.*, 2004).

La verticilliosi, causata dal fungo patogeno *Verticillium dahliae* (Kleb.) è attualmente la malattia più importante dell'olivo, potendone causare finanche la morte. Un precedente studio, è stato condotto sulla valutazione della suscettibilità/resistenza di 23 piante di olivo, della banca mondiale del germoplasma di olivo di Cordoba, all'attacco del fungo patogeno *Verticillium* (Blanco-Lopez e Lopez-Escudero, 2005). La valutazione della resistenza ha previsto una inoculazione in condizioni controllate delle piante, con il patotipo defogliante (V177) e non defogliante (V4) del fungo patogeno, e successiva valutazione delle reazioni di risposta delle piante. Ogni esperimento prevedeva l'inoculazione di 10 piante per varietà analizzata insieme con due varietà di riferimento 'Oblonga' e 'Picual', rispettivamente moderatamente resistente e suscettibile al fungo. Da tale studio è emerso che nessuna varietà di olivo risulta resistente al patotipo defogliante, che è considerata la variante patogena più virulenta, responsabile di sintomi più severi rispetto a quelli provocati dal patotipo non defogliante (Lopez-Escudero e Blanco-Lopez, 2005). La rapida ed efficace identificazione del *V. dahliae* nelle piante di olivo è di fondamentale importanza per il *management* del fungo. L'identificazione precoce,

difatti aiuta a prevenire la diffusione del patogeno in nuove aree (Carder *et al.*, 1994). I risultati ottenuti, indicano che il fungo patogeno è stato identificato nel 15,5% delle piante analizzate. È da sottolineare che ad una valutazione fenotipica delle piante analizzate, nessuna ha mostrato possedere chiari ed evidenti sintomi della malattia. Inoltre è emerso che 4 piante di olivo delle 174 analizzate, erano infettate da entrambi gli organismi patogeni *Pseudomonas savastanoi* e *Verticillium dahliae*. In sostanza, i due patogeni principali, ovvero quelli aventi la maggiore percentuale di diffusione, sono stati il batterio *P. savastanoi* ed il fungo *V. dahliae*, considerati anche dal punto di vista fitopatologico, due importanti stress biotici dell'olivo.

Nonostante siano stati identificati in olivo, diversi virus (Martelli, 1999), per molti di questi resta ancora da chiarire come e in che misura i virus influenzano le caratteristiche vegetative e produttive delle piante di olivo. L'identificazione dei virus nelle piante di olivo, è ostacolata da una serie di fattori: 1) le infezioni virali sono spesso lievi e asintomatiche; 2) la trasmissione meccanica agli ospiti erbacei è irregolare ed ha una bassa sensibilità intrinseca; 3) saggi immunologici spesso poco adatti a causa della scarsa capacità dei virus di legarsi all'antigene. Ad oggi sono stati effettuati diversi studi sull'incidenza dei virus di olivo in Italia e sulla ottimizzazione dei saggi di identificazione basati sugli acidi nucleici. Relativamente ai principali virus dell'olivo (*Cucumber mosaic virus CMV*, *Cherry leaf roll virus CLRV*, *Strawberry latent ring spot virus SLRSV*, *Arabic mosaic virus ArMV*) è stata identificata la presenza dei virus *CLRV* e *CMV*, rispettivamente in una e due piante di olivo delle 174 analizzate.

In sostanza, i risultati hanno indicato che gli organismi patogeni con più alta percentuale di infezione nella collezione BGMO sono il fungo *V. dahliae* e il batterio *P. savastanoi*, mentre molto più ridotte sono state le infezioni virali. Le malattie provocate da *Verticillium* and *P. savastanoi* sono infatti considerate pericolose e dannose, rappresentando una seria minaccia per la conservazione e salvaguardia della diversità genetica delle collezioni di germoplasma di olivo (Rallo, 2005). È noto infatti che, i principali patogeni dell'olivo presentano una maggiore diffusione di infezione rispetto ai virus (Saponari *et al.*, 2001; Bertolini *et al.*, 2003; Faggioli *et al.*, 2005; Rallo, 2005), come è emerso anche dai risultati qui presentati. I casi sporadici di malattie virali spesso non sono indice di scarsa percentuale di infezione ma piuttosto di una scarsa reattività sintomatica dell'olivo a questo tipo di infezione, di qui l'esigenza dell'uso di metodiche altamente sensibili capaci di rilevare l'infezione virale, anche in assenza di chiare manifestazioni sintomatologiche (Saponari *et al.*, 2001).

### **6.3 Studio di espressione di putativi trascritti coinvolti nel meccanismo di resistenza/suscettibilità dell'olivo alla mosca (*B. oleae*)**

Il successo di una pianta a resistere agli stress biotici dipende dalla sua capacità a riconoscere rapidamente la preda, decifrare ed interpretare il segnale in arrivo e quindi alla capacità di rispondere adeguatamente ad un insieme di attacchi biotrofici (Reymond *et al.*, 2004). Lo studio dei meccanismi che sono alla base dell'interazione pianta-insetto, da tempo si focalizza principalmente sulla genomica e proteomica (Keon *et al.*, 2003; Godard *et al.*, 2007; Elvira *et al.*, 2008). Recenti studi hanno ampliato la nostra conoscenza sui meccanismi attraverso i quali la pianta riconoscerebbe gli erbivori e successivamente attiverebbe le risposte di difesa diretta ed indiretta (Dicke *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2006). Attualmente le strategie sostenibili per il *management* degli insetti erbivori, comprendono l'incrocio per la

selezione della resistenza, l'applicazione di composti chimici, ma anche i metodi di controllo colturale e biologico. Di recente tali approcci sono stati integrati sia dalle biotecnologie vegetali che dall'ingegneria genetica, ai fini di sviluppare genotipi più resistenti agli insetti dannosi, funghi patogeni ed altri stress biotici (Campbell *et al.*, 2002; Ferry *et al.*, 2006; Ranjekar *et al.*, 2003).

La mosca *B. oleae* è il principale stress biotico dell'olivo, responsabile di numerosi danni alle produzioni. Caratterizzare i geni coinvolti nei meccanismi di resistenza/suscettibilità di varietà di olivo a diverso grado di suscettibilità alla mosca, facendo chiarezza sulla loro regolazione in funzione delle diverse fasi di attacco, sarebbe di fondamentale importanza ai fini di individuare eventuali geni di difesa. Lo studio di questi geni e della loro variabilità potrebbe fornire le informazioni necessarie per sviluppare marcatori per la selezione di genotipi resistenti all'attacco di *B. oleae*. Nel presente lavoro di tesi, si sono riportati i primi dati trascrittomici di geni sovraespressi nelle drupe di olivo infestate dalla mosca. Tra i trascritti differenzialmente espressi isolati dalla libreria sottrattiva, otto, putativamente coinvolti nei meccanismi di difesa, sono risultati sovraespressi nei frutti di olivo infestati con galleria larvale. Quattro trascritti hanno mostrato deboli livelli di sovraespressione, con valori di RQ variabili da 1,29 a 2,28. Le differenze di espressione fra i frutti di olivo sani e attaccati (con galleria larvale) della cultivar 'Moraiolo', sono risultate statisticamente significative.

Tra i trascritti analizzati, il più rappresentato nella libreria ha mostrato elevata similarità con il trascritto di una  $\beta$ -glucosidasi, appartenente alla famiglia enzimatica delle glucoidrolasi, presenti in tutti i membri della famiglia delle *Oleaceae*, che causa, in risposta all'attacco dei patogeni o ai danni meccanici, l'idrolisi dell'oleuropeina in molecole altamente reattive (Bianco *et al.*, 1999). L'oleuropeina, è il composto fenolico più abbondante in olivo, fa parte delle molecole coinvolte nei meccanismi di difesa naturali della pianta. Le sostanze aldeidiche tossiche, altamente reattive che derivano dall'idrolisi dell'oleuropeina, impediscono l'ingresso, la crescita e la diffusione degli insetti (Uccella *et al.*, 2000). Tali molecole, si legano irreversibilmente alle proteine e riducendo la disponibilità delle sostanze nutritive causando la morte delle larve (Konno *et al.*, 1999).

Altro trascritto funzionalmente interessante codifica una cinnamato-4-idrolasi ( $C_4H$ ), che catalizza l'idrossilazione dell'acido cinnamico per dare acido *p*-cumarico, che rappresenta il secondo passaggio delle reazioni che portano alla biosintesi dei fenilpropanoidi. L'acido *p*-cumarico, a sua volta può essere idrossilato e metilato per formare, in sequenza, acido caffeico, acido ferulico e acido sinapico. L'acido caffeico può essere esterificato con acido quinico per ottenere l'acido clorogenico (Iriti e Faoro, 2004). La via dei fenilpropanoidi fornisce una ampia varietà di metaboliti secondari coinvolti nella differenziazione e protezione dei tessuti vegetali contro gli stress ambientali. In *Arabidopsis thaliana* è stato visto che  $C_4H$  si esprime costitutivamente nelle foglie ed è sinergicamente espresso insieme con altri enzimi (Fenilalanina ammonioliase PAL; idrossicinnamato-CoA ligasi  $4CL$ ) della via biosintetica dei fenilpropanoidi, in risposta a stress biotici (e.g infezione da patogeni) ed abiotici (e.g ferite nei siti danneggiati ed esposizione ai raggi UV) (Tang *et al.*, 2009).

Un ulteriore trascritto analizzato codifica una acquaporina. Le acquaporine (AQP) sono una superfamiglia di proteine canale che facilitano e regolano il flusso delle molecole di acqua all'interno o all'esterno delle cellule di specifici tessuti. In olivo sono state identificate tre acquaporine, due proteine intrinseche della membrana plasmatica (PIP1 e PIP2) ed una proteina intrinseca del tonoplasto (TIP1), la cui

espressione risulta ridotta dagli stress idrici. L'acquaporina isolata dalla libreria sottrattiva, non è stata ancora studiata, pur tuttavia l'analisi di similarità di sequenza ha evidenziato la sua appartenenza alla famiglia proteica altamente conservata delle proteine intrinseche di membrana (MIP). Le acquaporine coinvolte nella risposta agli stress idrici, riducono la permeabilità di membrana, limitando le perdite dei liquidi cellulari (Secchi *et al.*, 2006). Gli stress idrici influenzano fortemente l'espressione dei geni delle acquaporine, aumentandola o riducendola (Baiges *et al.*, 2002). La sovra espressione dei geni che codificano le acquaporine, aumenta la permeabilità di membrana, consentendo il trasporto dell'acqua, quando questa è disponibile (Li *et al.*, 2000), al contrario la sottoespressione consente di conservare l'acqua durante i periodi di siccità. La loro espressione può essere inoltre regolata sia dagli ormoni (Acido abscissico o Acido giberellico) che dalle condizioni ambientali avverse come la salinità o siccità. È però riportato in letteratura il caso di due acquaporine i cui livelli di espressione risulterebbero ridotti dall'attacco di un insetto fitofago *Homalodisca coagulata* "xylem-feeding", che si alimenta dei nutrienti contenuti nello xilema, in una specie legnosa perenne : *Citrus sinensis* (Mozoruk *et al.*, 2006).

I trascritti maggiormente sovraespressi nelle drupe con galleria larvale della cultivar 'Moraiolo', con valori di espressione relativa variabili da 2,3 a 8,7, hanno fornito similarità con i trascritti di una proteina correlata alla patogenesi (Oe-PR27), di una lipossigenasi (Oe-LOX) e di una chitinasi di classe I (Oe-Chitinasi). Il trascritto Oe-PR27, è risultato fortemente sovraespresso in drupe attaccate dalla mosca, sia con galleria larvale che con punture di ovideposizione. Le proteine PR comprendono una vasta gamma di proteine correlate alla difesa, che includono chitinasi, proteasi, perossidasi e proteine ricche in prolina secrete negli spazi extracellulari (Sels *et al.*, 2008). Le proteine PR sono state identificate in pianta in risposta ad infezioni virali e sono tipicamente classificate in cinque gruppi: da PR 1 a PR 5; altri sei gruppi sono stati proposti per il tabacco (van Loon *et al.*, 1994). I cinque gruppi di PR, comprendono sia isoforme acide che basiche, che differiscono per la localizzazione specifica in tessuti ed organi e per i differenti meccanismi di induzione. Le isoforme acide, che risultano indotte dalla infezione virale del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o dall'acido salicilico (SA), includono: la PR 1, la  $\beta$ -1-3-glucanasi e le chitinasi acide. Le proteine basiche (PR1b e chitinasi basiche) sono, invece indotte dai danni da ferita, dall'etilene e dai trattamenti con acido giasmonico (JA). Generalmente l'attivazione delle proteine PR è connessa con la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che portano ad un accumulo di acido salicilico. La sequenza proteica dedotta del gene Oe-PR27, risulta avere elevata similarità con la proteina NtPR27 identificata in *Nicotiana tabacum* (Okushima *et al.*, 2000). L'accumulo dei trascritti della proteina NtPR27, risulta indotto dalle infezioni virali di TMV e dai danni da ferita, rispondendo inoltre precocemente anche all'acido giasmonico e all'etilene. I trascritti di questa proteina si accumulano principalmente nelle radici e leggermente nei fiori, mentre nei rami e nelle foglie è stato riscontrato un basso livello di trascritti (Okushima *et al.*, 2000). Tale proteina ha mostrato avere un' espressione organo specifica e un meccanismo di induzione uguale a quello degli altri membri delle proteine PR basiche. Nonostante quindi la proteina NtPR27 abbia mostrato un profilo di induzione simile alle proteine basiche, non è stata però riscontrata alcuna omologia con le altre proteine PR note in tabacco, pertanto è considerato un nuovo membro della putativa famiglia di proteine basiche in *Nicotiana tabacum* (Okushima *et al.*, 2000). Il livello di trascrizione della proteina Oe-PR27 analizzata, risulterebbe indotto dall'attacco della mosca dell'olivo (insetto masticatore). Restano da chiarire tuttavia, le proprietà biochimiche e le funzioni molecolari delle proteine PR27 in *planta*, sebbene alcuni

membri sembrerebbero agire come proteasi. Dati recenti hanno inoltre dimostrato, nella specie vegetale *Capsicum chinense*, la presenza di una proteina PR27, i cui livelli di espressione, risulterebbero indotti da un'infezione virale (Elvira *et al.*, 2008). La proteina Oe-PR27 identificata in olivo, è inoltre caratterizzata dalla presenza di un putativo peptide segnale N-terminale, che indirizzerebbe la sua secrezione.

È noto che la resistenza delle piante agli erbivori è mediata da un differente set di geni di difesa che possono essere costitutivamente espressi oppure elicitati dagli erbivori (Agrawal *et al.*, 1999; Halitschke e Baldwin, 2003; Chen, 2008). Molte risposte di difesa sono attivate dalla cascata dei segnali della via biosintetica degli octadecanoidi (Blee, 2002; Raymond and Farmer, 1998). Gli enzimi coinvolti nella biosintesi degli octadecanoidi sono stati caratterizzati in diverse specie vegetali, inducendo o silenziando l'espressione dei relativi geni coinvolti (Halitschke e Baldwin, 2003). Le lipossigenasi (LOX) in pianta, fanno parte di una famiglia poligenica che può essere suddivisa, in base alla similarità della sequenza primaria, in due principali sottofamiglie: classe I e classe II. Secondo tale classificazione, a seconda che le lipossigenasi catalizzino la diossigenazione dell'acido grasso linolenico in posizione del carbonio C 9 o del carbonio C 13, si distinguono le 9-LOX e le 13-LOX. I prodotti di idroperossidazione che derivano dalla attività delle LOX, sono coinvolti nella germinazione dei semi, nei processi di crescita delle piante, nello sviluppo della senescenza e nelle risposte di difesa delle piante ai danni meccanici da ferita ed ai patogeni ed insetti (Siedow, 1991; Blee, 1998). Le 13-Lipossigenasi, appartengono alla classe II e sono caratterizzate dalla presenza di un peptide di transito cloroplastico. La biosintesi dell'acido giasmonico richiede una 13-LOX, per produrre l'intermedio iniziale della cascata (13-idroperossi-acido linolenico) (Schaller, 2001). È stato dimostrato in pomodoro, che l'espressione di una lipossigenasi 13 (TomLOXD) localizzata nei cloroplasti, viene rapidamente indotta dai danni meccanici da ferita (Ferri *et al.*, 1997); anche in patata, dove sono state individuate tre lipossigenasi (LOX1; LOX2 e LOX3), sia la LOX 2 che la LOX3, espresse rispettivamente nelle foglie e nelle radici e foglie, hanno mostrato aumenti dei livelli di trascritti in risposta ai danni meccanici (Royo *et al.*, 1996). In *Nicotiana attenuata*, invece è stato dimostrato che dal silenziamento di una specifica 13 lipossigenasi (NaLOX3), ne consegue un ridotto accumulo di acido giasmonico e quindi una minore resistenza alle larve dell'insetto erbivoro *Manduca sexta* (Halitschke e Baldwin, 2003). Le lipossigenasi possono quindi essere regolate positivamente dall'acido giasmonico, il cui coinvolgimento nelle risposte di difesa ad erbivori in olivo resta ancora da chiarire, mentre risulta ampiamente dimostrato in diverse specie vegetali sia erbacee che arboree. Vista la sovraespressione della Oe-LOX, analizzata nei tessuti dei frutti infestati dalla mosca dell'olivo, non è da escludere, quindi, un ipotetico coinvolgimento nella biosintesi dell'acido giasmonico, d'altro canto poiché resta ancora da caratterizzarla, potrebbe anche essere coinvolta in altri meccanismi biologici cellulari. L'unica lipossigenasi isolata e caratterizzata in olivo, risulta coinvolta nel meccanismo di maturazione dei frutti. Tale isoforma è stata purificata da drupe nere mature, raccolte in uno stadio avanzato di sviluppo (Palmieri Thiers *et al.*, 2009).

Anche le chitinasi, responsabili dell'idrolisi del legame  $\beta$ -1-4 glicoside presente nei biopolimeri delle N-acetilglucosammine che costituiscono la chitina, sono coinvolte nei meccanismi di difesa delle piante. Tali enzimi sono costitutivamente espressi in diversi tessuti vegetali (radici, fiori etc.) e sono fortemente indotti in risposta a fattori di stress abiotici (soluzioni saline, etilene, radiazioni, O<sub>3</sub> e radiazioni UV) e biotici (funghi, batteri, insetti e virus, viroidi) (Kasprzewska *et al.*, 2003). In pianta, le

chitinasi sono classificate come proteine correlate alla patogenesi (PR). È noto che i geni che codificano le PR non solo sono indotti da patogeni, virus, funghi, ma anche da alcuni fattori di stress abiotici (siccità, salinità, ferite, metalli pesanti del suolo). Le PR sono suddivise in 14 classi, in base alle proprietà biologiche, all'attività enzimatica ed alla similarità di sequenza. Le chitinasi appartengono alle PR di classe 3 e classe 4. Oltre al ruolo antifungino, molte chitinasi sono regolate dallo sviluppo, con isoforme specifiche che appaiono solo durante specifici momenti della vita della pianta ed in determinati organi vegetali (per esempio nei fiori) (Sels *et al.*, 2008). Diversi studi hanno dimostrato la capacità delle chitinasi di degradare la chitina delle pareti cellulari di funghi ed insetti, alcune mostrano, inoltre, attività lisozimica, essendo così coinvolte nei fenomeni di resistenza all'attacco di patogeni batterici, sono inoltre capaci di rilasciare elicitori nelle pareti cellulari che attivano le risposte di difesa (Libault *et al.*, 2007). Le chitinasi di classe I, sono proteine basiche contenenti un dominio N-terminale ricco in cisteina con proprietà legate alla capacità di legare la chitina. Dal punto di vista molecolare le chitinasi di classe I, possiedono un peptide segnale, un dominio di 40 residui ricco in cisteina, una regione ipervariabile di 20 residui ed un dominio catalitico. Tali chitinasi, solitamente sono vacuolari anche se alcune risultano extracellulari e hanno maggiore attività chitinolitica rispetto alle altre classi. Ciò è in accordo con i risultati ottenuti nel seguente lavoro di tesi, che indicano che la Oe-Chitinasi identificata, contiene un putativo peptide segnale di secrezione cellulare.

Dall'analisi di espressione evince una spiccata differenza nei livelli di trascritti di Oe-PR27, Oe-LOX e Oe-Chitinasi, indotti nelle drupe attaccate delle varietà di olivo 'Moraiolo' e 'Leccino'. Infatti, il livello di espressione relativa dei tre geni analizzati nei frutti con galleria larvale della cultivar 'Moraiolo' è risultato pari a 9,7; 2,3 ed 8,2; mentre nei frutti infestati della cultivar 'Leccino' la sovrpressione è risultata essere di 342,6; 10,1 e 596,9, ottenendo mediante il test t-student differenze di espressione statisticamente significative fra i tessuti dei frutti sani ed attaccati. Come gli organismi vegetali si adattano all'ambiente in continua evoluzione, resta un importante punto da chiarire in biologia. Nell'ambito di una medesima specie vegetale la variazione fenotipica ereditaria fra popolazioni o fra gli individui all'interno di una popolazione, riflette spesso le differenze genetiche (Doerge, 2002). Negli ultimi anni con il sequenziamento di diversi genomi, le analisi su larga scala, hanno rilevato la presenza di sostanziali variazioni genetiche intraspecifiche nei lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*; Brem *et al.*, 2002), in *Drosophila* (Nuzhdin *et al.*, 2004), in *Arabidopsis thaliana* (Schmid *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2007) etc. La variazione del livello di trascrizione di particolari geni, chiamata polimorfismo del livello di espressione, è probabilmente la causa dei differenti tratti fenotipici (Doerge, 2002). È stato visto che in accessioni distinte nell'ambito della medesima specie vegetale, polimorfismi del livello di espressione di alcuni geni producono variazioni nella resistenza a patogeni (Grant *et al.*, 1995), nella resistenza a erbivori e alla produzione di metaboliti secondari (Kliebenstein *et al.*, 2001, 2002). È noto che polimorfismi di espressione dei geni coinvolti nella difesa agli insetti, hanno causato la differente risposta molecolare di difesa di due distinte accessioni in tabacco (*Nicotiana attenuata*) (Wu *et al.*, 2008). La differente espressione dei tre trascritti analizzati (Oe-PR27, Oe-LOX e Oe-Chitinasi) riscontrata nei frutti attaccati delle due varietà di olivo 'Moraiolo' e 'Leccino' potrebbe rientrare in questi casi. È inoltre emerso che il livello dei tre trascritti, risulta maggiore nei due stadi biologici di attacco (puntura di ovideposizione e galleria larvale) dei frutti della cultivar 'Leccino', rispetto ai frutti sani. È quindi ipotizzabile che l'induzione dei tre geni in risposta alla mosca

avvenga già in uno stadio precoce di attacco, per poi come atteso subire un ulteriore aumento causato dai danni provocati dallo sviluppo delle larve nella galleria scavata all'interno della polpa. L'analisi dell'espressione costitutiva di Oe-Chitinasi, Oe-PR27e Oe-LOX, nei frutti sani delle due varietà di olivo, ha portato alla luce la presenza di un livello basale di espressione maggiore nella cultivar 'Moraiolo' rispetto a 'Leccino', con una sovraespressione di 1218, 472 e 2,98 volte. Quando è stata valutata l'espressione relativa dei trascritti in due varietà di olivo campane 'Ruveia' ed 'Ortice', definite rispettivamente resistentissima e sensibilissima all'attacco della mosca (Pugliano, 2002) è emersa una debole sovraespressione per Oe-Chitinasi e Oe-LOX, con valori delle differenze di espressione di 1,54 e 2,34, nei frutti con galleria larvale della cultivar 'Ortice' rispetto ai frutti sani. Mentre dall'analisi della variazione del livello di trascritto, dei tre geni, nei frutti con punture di ovideposizione non è emersa alcuna sovraespressione rispetto ai frutti sani, al contrario ne risulta un forte decremento negli stadi precoci dell'attacco della mosca. Infine, dall'analisi di espressione costitutiva dei tre geni nei frutti sani delle cultivar 'Ruveia' ed 'Ortice' è risultato leggermente più alto il livello di trascritto di Oe-Chitinase nella cultivar 'Ruveia' rispetto ad 'Ortice'. Pertanto le diverse quantità di espressione indotte potrebbero quindi determinare diverse risposte di difesa della pianta e ulteriori approcci "omici" saranno rivolti a chiarire questo tipo di differenze.

## 7. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi sullo studio della diversità genetica del germoplasma di olivo campano, confermano che i marcatori SSR rappresentano un valido strumento per gli studi sulla variabilità genetica delle varietà diffuse al Sud Italia. È emerso un solo possibile caso di sinonimia, che andrebbe approfondito mediante analisi morfologiche e confermando la correttezza della designazione dei genotipi ed il livello di polimorfismo delle cultivar analizzate. I marcatori SSR, sono inoltre un potente strumento per la certificazione vivaistica delle varietà di olivo principalmente utilizzate per l'ottenimento di oli monovarietalì. Dai risultati ottenuti emerge che tali marcatori sono strumenti essenziali per garantire la tracciabilità genetica in ciascuna fase della filiera produttiva olivo-olio, la rispondenza ai marchi DOP e IGP, ed infine la qualità e genuinità del prodotto finito, salvaguardando gli agricoltori, le aziende produttrici ed i consumatori, da eventuali frodi.

La costruzione di un *core subset*, fornisce un aiuto importante per lo studio, la caratterizzazione e l'uso delle risorse genetiche delle collezioni di germoplasma. Nel presente lavoro i cinque *core subset* costruiti e valutati mediante tre distinti algoritmi, rappresentano un primo passo importante per la costruzione di una prima *core collection* in olivo. Tale *core collection* potrebbe essere usata: sia per gli scambi di materiale vegetale fra i paesi delle principali aree di coltivazione dell'olivo, dove il mantenimento delle collezioni *ex situ* diventa sempre difficile da sostenere economicamente; che per stabilire una comune procedura di costruzione di una *core*. La costituzione di una *core collection* di olivo, deve prevedere una fase di valutazione dello stato fitosanitario del germoplasma disponibile, al fine di poter costruire un *core subset* che sia esente da problemi fitosanitari. Pertanto l'uso di tecniche molecolari altamente sensibili ed adeguate risulta fondamentale per identificare precocemente finanche bassi livelli dei principali patogeni e virus dell'olivo, prima della comparsa di una chiara manifestazione sintomatologica. Tale procedura consentirà di certificare come fitosanitariamente sane le piante di olivo costituenti una collezione di germoplasma e quindi di disporre di materiale di propagazione vivaistico qualificato e rispondente alle norme sanitarie vigenti.

Relativamente allo studio della risposta molecolare dell'olivo all'attacco della mosca, è possibile concludere che essa risulta complessa e che coinvolge numerose e differenti funzioni molecolari. L'identificazione di geni coinvolti nella risposta all'attacco della mosca rappresenta il primo passo per comprendere le funzioni di difesa attivate nell'*Olea europea* da questo insetto dannoso. Sarà necessario identificare e caratterizzare un più ampio set di geni di difesa della pianta di olivo e confrontarne l'espressione in varietà con diversa suscettibilità alla mosca. Se come è auspicabile che accada, in futuro si assisterà ad un incremento delle conoscenze genomiche sull'olivo, sarà possibile che l'analisi di espressione di specifici trascritti potrà rappresentare un prezioso strumento, per l'identificazione e la selezione di genotipi con livelli superiori di tolleranza alla mosca.



## 8. BIBLIOGRAFIA

- Agrawal A., Piotr A., Gorski M. and Tallamy D.W. (1999). Polymorphism in Plant Defense Against Herbivory: Constitutive and Induced Resistance in *Cucumis sativus*. *Journal of Chemical Ecology*. 25: 2285-2304.
- Alfei B., Pannelli G., Ricci A., (2007). Le possibilità che offrono gli oli monovarietal. *L'Informatore Agrario*. 33: 4-5.
- Amane M., Lumaret R., Nany V., Ouazzani N., Debain C., Vivier G., Deguillox M.F. (1999). Chloroplast-DNA variation in cultivated and wild olive (*Olea europea*L.) *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 133-139.
- Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L. (1999). Olive genetic diversity osesse Using amplified length polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 411-421.
- Anton, F.A. and E. Laborda. (1989). Estudio de la susceptibilidad/resistencia de variedades del olivo (*Olea europaea* L.) al patogeno *Cyloconium oleaginum* (Cast.) (*Spilocaea oleaginae* Hugh.). *Bol. San. Veg. Plagas*. 4: 385-403.
- Aranzana M.J., Garcia-Mas J., Carbò J., Arus P. (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*. 121: 87-92.
- Asmani T. (1999). Aplicacion de marcadores de AFLP a la identificacion de variedades de olivo (*Olea europea* L.). Tesis de Master, Universidad de Cordoba.
- Baiges I., Schaffner A.R., Affenzeller M.J, Mas A. (2002). Palnt aquaporins. *Plant Physiol*. 115: 175-182.
- Baldoni L., Pellegrini M., Mencuccini M., Angiolillo A., Mulas M. (2000). Genetic relationships among cultivated and wild olives revealed by AFLP markers. *Acta Hortic*. 521: 275–284.
- Baldoni L., Tosti N., Ricciolini C., Belaj A., Arcioni S., Pannelli G. (2006). Genetic structure of wild and cultivated olives in the Central Mediterranean Basin. *Ann Bot (Lond)*. 98: 935–942.
- Baldoni L. and Belaj A. (2009). Olive. *Handbook of Plant Breeding*. 4: 397-421.
- Baldoni L., Mariotti R., Cultrera N.G.M. (2005). Proposta di un protocollo comune di analisi molecolare per la caratterizzazione genetica delle varietà di olivo. *Accademia Nazionale dell'olivo e dell'olio Spoleto. Tradizione ed innovazione nel miglioramento genetico dell'olivo*. 61-66.
- Bandelj D., Jakse J., Javornik B. (2002). DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Tech and Biotech*. 40 (3): 185-190.
- Barba M., Mainolfi P. (1996). Certificazione volontaria del materiale di propagazione dell'olivo. *L'Informatore Agrario*. 52: 65-67.

- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G. (2005). Olive germplasm: cultivars and world-wide collections - Web site FAO: <http://www.apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp>.
- Bass D.A., Crossman N.D., Lawrie S.L., Lethbridge M.R. (2006). The importance of population growth, seed dispersal and habitat suitability in determining plant invasiveness. *Euphytica*. 148: 97-109.
- Belaj A., Trujillo I., de la Rosa R., Rallo L., Gimenez M.J. (2001). Polymorphism and discriminating capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Am Soc Hort Sci*. 126: 64-71.
- Belaj A. (1998). Identificación y calificación de variedades de olivo (*Olea europea* L.) del Banco de Germoplasma de Córdoba con marcadores RAPDs. Tesis de Master. Universidad de Córdoba.
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L. and Trujillo I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 107 (4): 736-744.
- Belaj A., Muñoz-Díez C., Baldoni L., Porceddu A., Barranco D., Satovic Z. (2007). Genetic diversity and population structure of wild olives from the north-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann Bot (Lond)*. 100:449-458.
- Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I., Baldoni, L. (2004). Using RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of Arbequina and Manzanilla de Sevilla olive. *HortScience*. 39: 1566-1577.
- Berg E.E. and Hamrick J. L. (1997). Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can. J. For. Res.* 27: 415-424.
- Bertolini E., Penyalver R., García A., Olmos A., Quesada J.M., Cambra M., López M.M. (2003). Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *J Microbiol Methods*. 52: 261-266.
- Bertolini E.; Moreno A., Capote N., Olmos A., de Luis A., Vidal E., .Pérez-Panadés J & M. Cambra. (2008) . Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathol*. 120:177–188.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martínez, M. C., Gorris, M. T., and Cambra, M. (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Methods*. 96: 33-41.
- Besnard G. and Bervillé A. (2000). Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Life Sci*. 323:173-181.
- Besnard G., Breton C., Baradat P., Khadari B., and Berville A. (2001). Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 126: 668–675.
- Bianco A.D., Piperno A., Romeo G., Uccella N. (1999). NMR experiments of oleuropein biomimetic hydrolysis. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 47: 3665-3668.

- Blanco-Lopez M. A., Jimenez-Diaz R. M., & Caballero J. M. (1984). Symptomatology, incidence and distribution of Verticillium wilt of olive trees in Andalusia. *Phytopathologia Mediterranea*. 23: 1-8.
- Blee E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci*. 7: 315-321.
- Bracci T., Sebastiani L., Busconi M., Fogher C., Belaj A., Trujillo I. (2009). SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae* 122: 209-215.
- Brem R.B., Yvert G., Clinton R., Kruglyak L. (2002). Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science*. 296: 752-755.
- Breton C., Tersac M. and Bervillè A. (2006). Olive and oleaster (*Olea europaea*) in the Mediterranean. *Journal of Biogeography*. 33: 1916-1928.
- Breton C.; Calux D.; Metton I.; Skorski G.; Berville R. (2004). A Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil sample to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *J. Agric. Food Chem*. 52: 531-537.
- Brown A.H.D. (1989) Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome*. 31: 818-824.
- Burrack, H. J. & Zalom F. G. (2008). Olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) ovipositional preference and larval performance in several commercially important olive varieties in California. *J Econ Entomol*. 101(3): 750-758.
- Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorno C., Cattapan F., Foghera C. (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry*. 83: 127-134.
- Buteler M.I., Jarret R.L., La Bonte D.R. (1999) Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theor Appl Genet*. 99: 123-132.
- Butler J.M. (2003). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques*. 43.
- Campbell M.A., Fitzgerald H.A., Ronald P.C. (2002). Engineering pathogen resistance in crop plants. *Trans. Res*. 11: 599-613.
- Carder J.H., Morton A., Tabrett A.M. and Barbara D.J. (1994). Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. In: Schots A, Dewey FM and Oliver R (eds) *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification*. CAB International, Oxford. 91-97.
- 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.
- Cavalli-Sforza L., Edwards A. (1967). Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*. 19(3): 233-257.

Chen M.S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review . *Insect Science* 15 (2): 101-114.

Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R., (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 R.M., Schweikert G., Toomajian C., Ossowski S., Zeller G., Shinn P., Warthmann N., Hu T.T., Fu G., Hinds D.A. (2007). Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 317: 338-342.

Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M. and Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics.* 21 (18): 3674-3676.

Content A., Ceccarelli M., Gelati M.T., Maggini F., Baldoni L. and Cionini P.G. (2002). Diversity of *Olea* genotypes and the origin of cultivated olives. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1229-1238.

Corrado G., La Mura M., Ambrosino O., Pugliano G., Varricchio P. and Rao R. (2009). Relationships of Campanian olive cultivars: comparative analysis of molecular and phenotypic data. *Genome* 52: 692-700.

Crossa, J., I.H. DeLacy, and S. Taba. (1995a). The use of multivariate methods in developing a Core Collection.. In T. Hodgkin et al (ed.) *Core collections of plant genetic resources.* JohnWiley & Sons Inc., New York. 77–89.

Crossa J., K. Basford S. Taba I. DeLacy and Silva E. (1995b). Three- Mode analysis of maize using morphological and agronomic attributes measured in multilocation Trials. *Crop Sci.* 35:1483–1491.

Crossa J., S. Taba S.A. Eberhart P. Bretting and R. Vencovsky. (1994). Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theor. Appl. Genet.* 89: 89-95.

De La Rosa R., James C.M. and Tobutt K.R. (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.

De la Rosa R., James C.M & Tobutt K.R. (2004). Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortSci.* 39: 351-354.

De la Torre F.; Bautista R.; Canovas F. M.; Claros G. (2004). Isolation of DNA from olive oil and oil sediments: application in oil fingerprinting. *Food Agri.* 2:84-89.

Dhanaraj A.L., Rao E.V.V.B., Swamy K.R.M., Bhat M.G., Prasad D.T., Sondur S.N. (2002) Using RAPDs to assess the diversity in Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) germplasm. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 77: 41-47.

- Dicke M., & Van Poecke R. M. (2002). Signalling in plant-insect interactions: signal transduction in direct and indirect defence. In D. Scheel & C. Wasternack (Eds.), *Plant signal transduction* Oxford: Oxford University Press. 289-316.
- Diwan N., McIntosh M.S., Baughan G.R. (1995) Developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 755-761.
- Dje Y., Heuertz M., Lefebvre C., Vekemans X. (2000) Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 918-925.
- Doerge R.W. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet*. 3: 43–52.
- Doveri S., O’Sullivan S. M. and 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 *J. Agric. Food Chem*. 54: 9221-9226.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul*. 19:11-15.
- Ellwood S.R., D’Souza N.K., Kamphuis L.G., Burgess T.I., Nair R.M., Oliver R.P. (2006) SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 977-983.
- Elvira M. I., Galdeano M. M., Gilardi P., Garcia-Luque I. & Serra M. T. (2008). Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *J Exp Bot*. 59(6): 1253-1265.
- 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 markers. *Genet Resour Crop Evol* . 57: 41-54.
- Escribano P., Viruel M.A. & Hormaza J.I. (2008). Comparison of different methods to construct a core germplasm collection in woody perennial species with simple sequence repeat markers. A case study in cherimoya (*Annona cherimola*, Annonaceae), an underutilised subtropical fruit tree species. *Annals of Applied Biology*. 25-32.
- Fabbri A., Hormaza J.I., Polito V.S. (1995). Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J Am Soc Hort Sci*. 120: 538-542.
- Faggioli F., Ferretti L., Albanese G., Sciarroni R., Pasquini G., Lumia V., Barba M. (2005). Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by ONE-STEP RT-PCR. *Journal of Plant Pathol*. 87 (1): 49-55.
- Faggioli G., Ferretti L., Pasquini G., Barba M. (2002). Detection of Strawberry latent ring spot virus in leaves of olive trees in Italy using one step RT-PCR. *Journal of Phytopathology*. 150: 636-639.

- Fajardo S., La Bonte D.R., Jarret R.L. (2002) Identifying and selecting for genetic diversity in Papua New Guinea sweetpotato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. germplasm collected as botanical seed. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 49:463-470.
- Felix M. R. and V Clara. (2002). Two necrovirus isolates with properties of olive latent virus 1 and tobacco necrosis virus from olive in Portugal. *Acta Horticulturae*. 586: 725-728.
- Ferretti L., Faggioli F., Pasquini G., Sciarroni R., Pannelli G., Baldoni L., Barba M.. (2002). Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) cause of differentiation among Raggiola and Frantoio cultivars. *Journal of Plant Pathology*. 84 (3): 182.
- Ferry N., Edwards M., Gatehouse J., Capell T., Christou P., Gatehouse A. (2006). Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. *Trans. Res.* 15: 13-19.
- Fisher P.J., Richardson T.E., Gardner R.C. (1998). Characteristics of single- and multi-copy microsatellites from *Pinus radiata*. *Theor Appl Genet*. 96: 969-979.
- Franco J. and J. Crossa. (2002). The modified location model for classifying genetic resources. I Association between categorical and continuous variables. *Crop Sci*. 42:1719-1726.
- Franco J., Crossa J., Ribaut J.M., Betran J., Warburton M.L. and Khairallah M. (2001). A method for combining molecular and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theor. Appl. Genet*. 103:944-952.
- Franco J., Crossa J., Taba S. and Shands H. (2003). A multivariate method for classifying cultivars and studying group 3 environment 3 trait interaction. *Crop Sci*. 43:1249-1258.
- Franco J., Crossa J., Taba S and H. Shands. (2003). A multivariate method for classifying cultivars and studying group 3 environment 3 trait interaction. *Crop Sci*. 43:1249-1258.
- Franco J., Crossa J., Taba S. and H. Shands. (2005). A sampling strategy for conserving genetic diversity when forming core subsets. *Crop Sci*. 45: 1035-1044.
- Frankel O.H., Brown A.H.D. (1984). Current plant genetic resources a critical appraisal. In *Genetics: New Frontiers*. Eds V.L. Chopra, B.C. Joshi, R.P. 4: 1-13.
- Ganino T., Beghe D., Valenti S., Nisi, R., Fabbri, A., (2007). A 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: 1531–1540.
- Gemas V.J., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R., Feveireiro P., (2000). Inter and intravarietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD techniques. *J. Hortic. Sci. Biotechnol*. 75: 312-319.
- Germini A., Mezzelani A., Lesignoli F., Corradini R., Marchelli R., Bordoni R., Consolandi C., and De Bellis G. (2004). Detection of Genetically Modified Soybean Using Peptide I. Nucleic Acids (PNAs) and Microarray Technology *J. Agric. Food Chem*. 52 (14): 4535-4540.

- Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M., Gessler C. (1998). Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet.* 96: 1069-1076.
- Girolami V., Strapazzon A., De Gerloni P.F. (1982). Insect/plant relationship in olive flies: General aspects and new findings. *CEC/IOBC Symposium Atenas.* 258-267.
- Giulietti A., Overbergh D., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R. & Mathieu C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 25: 386-401.
- Giulietti A., Overbergh, D. Valckx B., Decallonne R., Bouillon and Mathieu C. (2001). A overview of Real Time quantitative PCR: application to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 25: 386-401.
- Godard K. A., Byun-McKay A., Levasseur C., Plant A., Seguin A., & Bohlmann J. (2007). Testing of a heterologous, wound- and insect-inducible promoter for functional genomics studies in conifer defense. *Plant Cell Rep.* 26(12): 2083-2090.
- Gouesnard B., Bataillon T.M., Decoux G., Rozale C., Schoen D.J., David J.L. (2001) MSTRAT: an algorithm for building germ plasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. *Journal of Heredity.* 92: 93-94.
- Gower J.C. (1971). A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics.* 27:857-874.
- Grant M.R., Godiard L., Straube E., Ashfield T., Lewald J., Sattler A., Innes R.W., Dangl J.L. (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science.* 269: 843-846.
- Green PS (2002). A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bull.* 57: 91-140.
- Grenier C., Bramel-Cox P.J., Noirot M., Rao K.E.P., Hamon P. (2000) Assessment of genetic diversity in three subsets constituted from the ICRISAT sorghum collection using random vs non-random sampling procedures. A. Using morpho-agronomical and passport data. *Theoretical and Applied Genetics.* 101: 190-196.
- Grieco F., R. Alkowni, M. Saponari, V. Pantaleo, V. Savino, G. P. Martelli. (2002). Molecular detection of olive-infecting viruses. *Acta Horticulturae.* 586: 737-740.
- Halitschke R. and Baldwin I.T. (2003). Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *The Plant. Journal.* 36: 794-807.
- Hannachi H., Breton C., Msallem M., Ben El Hadj S., El Gazzah M. and Bervillé A. (2008). Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Scientia Horticulturae.* 116 (3): 280-290
- Hao C.Y., Zhang X.Y., Wang L.F., Dong Y.S., Shang X.W., Jia J.Z. (2006) Genetic diversity and core collection evaluations in common wheat germplasm from the Northwestern Spring Wheat Region in China. *Molecular Breeding.* 17: 69-77.

- Hernández P., de la Rosa R., Rallo L., Dorado G. and Martín A. (2001). Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 103 (5): 788-791.
- Hess J., Kadereit W., Vargas P. (2000) The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Mol Ecol*. 9:857-868.
- Hu J., Zhu J., Xu H.M. (2000) Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 264-268.
- Huang X. and Madan A. (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 9: 868-877.
- Hupfer C., Hotzel H., Sachse K., Engel K. H. (1998). Detection of the genetic modification in heat treated of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*. 106: 203-207.
- Iannotta N., Noce M.E., Ripa V., Scalercio S., Vizzarri V. (2007). Assessment of susceptibility of olive cultivar to the *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum* (Thum.) Zachos & Tzav-Klon. Attacks in Calabria (Southern Italy). *Journal of Environmental Science and Health*. 42: 789-793.
- Iannotta N., Perri L., Tocci C., Zaffina F. (1999). The behaviour of different olive cultivars following attacks by *Bactrocera oleae* (Gmel.). *Acta Horticulturae (ISHS)*., 472: 545-548.
- Iriti M, Faoro F (2004) Plant defence & human nutrition: phenylpropanoids on the menu. *Curr Top Nutr Res*. 2: 47-65.
- Iriti M. and Faoro F. (2004). Plant defence & human nutrition: phenylpropanoids on the menu. *Curr Top Nutr Res*. 2: 47-65.
- Kasprzewska A. (2003). Plant Chitinases-Regulation and Function. *Cellular & Molecular biology letters*. 8: 809-824.
- Keon J., Curtis R., Cabrera H. & Hargreaves J. (2003). A genomics approach to crop pest and disease research. *Pest Manag Sci*. 53: 143-148.
- Kliebenstein D., Pedersen D., Barker B., Mitchell-Olds T. (2002). Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 161: 325-332.
- Kliebenstein D.J., Lambrix V.M., Reichelt M., Gershenzon J., Mitchell-Olds T. (2001). Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 13: 681-693.
- Kojima Y., Ebana K., Fukuoka S., Nagamine T., Kawase M. (2005) Development of an RFLP-based rice diversity research set of germplasm. *Breeding Science*. 55: 431-440.



- Kombargi, W. S., Michelakis, S. E., & Petrakis, C. A. (1998). Effect of olive surface waxes on oviposition by *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol.* 91: 993-998.
- Konno K., Hirayama C., Yasui H. & Nakamura M. (1999). Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(16): 9159-9164.
- Koppel E., Stadler M. & Luthy J. (1998): Detection Of Wheat Contamination In Oats By Polymerase Chain Reaction (PCR) And Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 206: 399-403.
- 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. Biotechnol.* 80: 628-632.
- Lauzon C.R., Sjogren R.E., Prokopy R.J. (2000). Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: a postulated role in attraction. *J. Chem. Ecol.* 26: 953-967.
- Li L., Li S., Tao Y., Kitagawa Y. (2000). Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Sci.* 154: 43-51.
- Liang F., Holt I., Pertea G., Karamycheva S., Slazberg S. and Quackenbush J. (2000). Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nat Genet.* 25: 239-240.
- Libault M., Wan J., Czechowski T., Udvardi M. & Stacey G. (2007). Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol Plant Microbe Interact.* 20(8): 900-911.
- Liu F., Sun G.L., Salomon B., von Bothmer R. (2001) Distribution of allozymic alleles and genetic diversity in the American barley core collection. *Theoretical and Applied Genetics.* 102: 606-615.
- Liu K., Goodman M.M., Muse S., Smith J.S.C., Buckler E.S., Doebley J. (2003). Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics.* 165: 2117-2128.
- Liu K., Muse S.V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics.* 21: 2128-2129.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-DDCT</sup> Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lo Scalzo R., Scarpati M. L., Verzegnassi B. & Vita, G. (1994). *Olea europaea* chemicals repellent to *Bactrocera oleae* females. *J Chem Ecol.* 20: 1813-1823.
- Lopes M.S., Mendoca 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.

- López-Escudero F. J. and Blanco-López M. A. (2005). Effects of Drip Irrigation on Population of *Verticillium dahliae* in Olive orchards. *Journal of Phytopathology*. 153 (4): 238-239.
- Lopez-Escudero F.J., del Rio C., Caballero J.M. and Blanco-Lopez M.A. (2004). Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 79-85.
- Lumaret R., Amame M., Ouazzani N., Baldoni L., Debain C. (2000). Chloroplast DNA variation in the cultivated and wild olive taxa of the genus *Olea* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 547-553.
- Lyon E., Millson A., Lowery M.C., Woods R. Wittwer C.T. (2001). Quantification of Her2/neu Gene Amplification by competitive PCR using fluorescent melting curve analysis. *Clinical Chemistry*. 47: 844-851.
- MacCollom G.B., Lauzon C.R., Payne E.B., Currier W.W. (1994). Apple maggot (*Diptera: Tephritidae*) trap enhancement with washed bacterial cells. *Env. Entomol.* 23: 354-359.
- Maffei M. E., Mithofer A., & Boland W. (2007). Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*. 68(22-24): 2946-2959.
- Marita J.M., Rodriguez J.M., Nienhuis J. (2000) Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 47: 515-526.
- Marmioli N., Peano C., Maestri E. (2003). Advanced PCR techniques in identifying food components. In: Lees M (ed.) *Food authenticity and traceability*. Woodhead Publishing. 3-33.
- Marte M., Gadani E., Savino V., Rugini E. (1986). Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in Central Italy. *Plant Disease*. 70:171-172.
- Martelli G.P. (1999). Infectious diseases and certification of olive: an overview. *Bulletin OEPP- EPPO*. 29: 127-133.
- McKey D., Elias M., Pujol B., Duputie A. (2010). The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist*. 186: 318-332.
- McKhann H.I., Camilleri C., Berard A., Bataillon T., David J.L., Reboud X., Le Corre V., Caloustian C., Gut I.G., Brunel D. (2004) Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 38: 193-202.
- Mercado-Blanco J., Collado-Romero M., Parilla-Araujo S., Rodriguez-Jurado D., Jimenez-Diaz R.M. (2003). Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 63: 91-105.
- Moral J., Luque F. and Trapero A. (2008). First report of *Diplodia seriata*, anamorph of "*Botryosphaeria*" obtuse, causing fruit rot of olive in Spain. *Plant disease*. 92:311.

- Mozoruk J., Hunnicutt L. E., Cave R. D., Hunter W. B., & Bausher, M. G. (2006). Profiling transcriptional changes in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck challenged by herbivory from the xylem-feeding leafhopper *Homalodisca coagulata* (Say) by cDNA macroarray analysis. *Plant Sci.* 170: 1068-1080.
- Muzzalupo I., Pellegrino M. and 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., Perri E. (2009). Genetic diversity in olive tree cultivars from Italy and other countries of the Mediterranean basin as revealed by RAPD and SSR molecular marker. *Adv. Hort. Sci.* 23(4): 263-275.
- Muzzalupo, I.; Perri, E. (2008). Genetic Characterization of Olive Germplasm by Molecular Markers. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2: 1 60-68.
- Muzzalupo I.; Perri R. (2002). Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *Eur. Food Res. Technol.* 214: 528- 53.
- Nardi F., Carapelli A., Dallai R., Roderick G.K., Frati F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol* 14: 2729-2738.
- Nei M., Tajima F. and Tateno Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol.* 19:153-170.
- Nemedi E., Ujhelyi G., Gelencsér E. (2007). Detection of gluten contamination with PCR method. *Acta Alimentaria.* 36: 241-248.
- Nigro F., Schena L., Gallone P. (2002). Real-time diagnosis of verticillium wilt of olive by Scorpion-PCR. *Atti Convegno Internazionale di Olivicoltura, VI Giornate Scientifiche SOI, Spoleto (Pg), 23-25 Aprile.* 454-461.
- Nuzhdin S.V., Wayne M.L., Harmon K.L., McIntyre L.M. (2004). Common pattern of evolution of gene expression level and protein sequence in *Drosophila*. *Mol Biol Evol.* 21: 1308-1317.
- Ochando, M. D., & Reyes, A. (2000). Genetic population structure in olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin): gene flow and patterns of geographic differentiation. *J Appl Entomol.* 124: 177-183.
- Okushima Y., Koizumi N., Kusano T. and Sano H. (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* . 42: 479-488.
- Ortiz R., Ruiz-Tapia E.N., Mujica-Sanchez A. (1998) Sampling strategy for a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics.* 96: 475-483.

- Osman F. and Rowhani A. (2006). Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*. 133 (2006) 130-136.
- Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P., Di Giusto F. (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive tree (*Olea europaea* L.). *J. Hered.* 84:34-42.
- Owen C.A., Bitá EC., Sellianakis V., Aksoys U., Hepaskoy S., Chamoun R. (2005). AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germoplasma from the Eastern Mediterranean. *Theor Appl Gnet* 110:1169-1176.
- Owen R.W., Haubner R., Mier W. (2003). The isolation, structural elucidation and antioxidant potential of the major phenolic compounds in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol.* 41:703-717.
- Palmieri-Thiers C., Cannan S., Brunini V., Lorenzi V., Tomi F., Desseyn J.L., Garscha U., Oliw E.H., Berti L. and Maury J. (2009). A lipoxygenase with dual positional specificity in espresso in olives (*Olea europea* L.) during ripening. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791:339-346.
- Pannelli G. (2007). Il futuro dell'olivicultura italiana. *L'Informatore Agrario*. 45: 4-5.
- Pasqualone A., Montemurro C., Caponio F. and Blanco A. (2004) Identification of Virgin Olive Oil from Different Cultivars by Analysis of DNA Microsatellites. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1068-1071.
- Peeters, J.P., and J.A. Martinelli. (1989). Hierarchical cluster analyses as a tool to manage variation in germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 78:42-48.
- Penalver P., Huerta B., Borge R., Astorga R., Romero R. and Perea A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS*. 113(1): 1-6.
- Protta U. (1995). Le malattie dell'olivo. *Informatore fitopatologico*. 12: 16-26.
- Pugliano G. (2002). La Risorsa Genetica dell'Olivo in Campania. Se.S.I.R.C.A. (Regione Campania), Napoli, Italy. 69
- Quesada J. M., García A., Bertolini E., López M. M., R. Penyalver. (2007). Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees *International Microbiology*. 10:77-84
- Rallo L. (2005). Variedades de olivo en España. Ministerio de agricultura pesca y alimentación. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-Barcelona-Mexico.
- Rallo P, Dorado G & Martin A (2000) Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 984-989.
- Ranjekar P.K., Patankar A., Gupta V., Bhatnagar R., Bentur J., Kumar P.A. (2003). Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Curr. Sci.* 84:321-329.

- Rao R., La Mura M., Corrado G., Ambrosino O., I. Foroni, E. Perri and G. Pugliano (2009) Genetic diversity of olive cultivars using AFLP and morphological traits. *The Journal of Horticultural Science e Biotechnology*. 84 (3): 261-266.
- Reale S., Doveri S., Diaz A., Angiolillo A., Lucentini L., Pilla F., Martin A., Donini P., Lee, D. (2006). SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. (single-nucleotide polymorphism). *Genome*. 49(9):1193-205.
- Reymond P. And Farmer E.E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1: 404-411.
- Reymond P., Bodenhausen N., Van Poecke R. M., Krishnamurthy V., Dicke M., & Farmer E. E. (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell*. 16(11): 3132-3147.
- Rizzo R., Caleca V. (2006). Resistance to the attack of *Bactrocera oleae* (Gmelin) of some Sicilian olive cultivars. *Olivebiotech 2006- Mazara del Vallo, Marsala*. 2: 35-42.
- Robacker D. C., A. J. Martinez J. A. Garcia and R. J. Bartelt. (1998). Volatiles attractive to the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) from eleven bacteria taxa. *Florida Entomol.* 81: 497-509.
- Rogers J. S. (1991). A comparison of the suitability of the Rogers, modified Rogers, Manhattan and Cavalli Sforza and Edwards distances for inferring phylogenetic trees from allele frequencies. *Systematic Zoology*. 40(1): 63-73.
- Royo J., Vancanneyt G., Perez A. G., Sanz C., Stormann K., Rosahl S. & Sanchez-Serrano J. J. (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J Biol Chem*. 271(35): 21012-21019.
- Sacchetti P., Granchietti A., Landini S., Viti C., Giovannetti L. & Belcari A. (2008). Relationships between the olive fly and bacteria *J Appl Entomol*. 132: 682-689.
- Sacchetti P., Landini S., Granchietti A., Camèra A., Rosi M. C. & Belcari A. (2007). Attractiveness to the olive fly of *Pseudomonas putida* isolated from the foregut of *Bactrocera oleae*. *IOBC/wprs Bull*. 30: 37-42.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 207: 207-213.
- Santiago-Alvarez S.C. and Quesada Moraga. (2007). The olive fruit fly. *Olea*. *Fao Olive Network*. 26: 60-61.
- Sanz-Cortes F., Parfit D.E., Romero C., Struss D., Llacer G., Badenes M.L. (2003). Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. *Mol. Breed*. 122: 173-177.

- Saponari M. (2005). Valutazione dello stato sanitario delle piante di olivo mediante tecniche di dsRNA e RT-PCR. Accademia Nazionale dell'olivo e dell'olio Spoleto. Tradizione ed innovazione nel miglioramento genetico dell'olivo. 43-46
- Sarri V., Baldoni L., Porceddu A., Cultrera N.G.M., Contento A., Frediani M., Belaj A., Trujillo I., and Cionini P.G.. (2006). Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome*. 49(12): 1606-1615.
- Savino V., S. Sabanadzovic, G. Scarito, C. Laviola, G.P. Martelli. (1996). Due giallumi di possibile origine virale in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*. 5: 55-59
- Schaller F. (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* 52: 11-23.
- Schena L., Nigro F., and Ippolito A. (2004). Real Time PCR detection and quantification of soilborne fungal pathogens: the case of *Rosellinia nectarix*, *Phytophthora nicotianae*, *P. citrophthora*, and *Verticillium dahlia*. *Phytopathol. Mediterr.* 43: 273-280
- Schlotterer C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schmid K.J., Sorensen T.R., Stracke R., Torjek O., Altmann T., Mitchell-Olds T., Weisshaar B. (2003). Large-scale identification and analysis of genomewide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 13: 1250-1257.
- Schoen D.J., Brown A.H.D. (1993) Conservation of allelic richness in wild crop relatives is aided by assessment of genetic-markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 10623-10627.
- Scortichini M., Rossi M. P. and Salerno M. (2004). Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant Pathology* . 53: 491-497.
- Secchi F., Lovisolo C., Uehlein N., Kaldenhoff R., & Schubert, A. (2007). Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.). *Planta*. 225(2): 381-392.
- Sefc K. M., Lopes M . S., Rodrigues Dos Santos M.. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Laimer Molecular Ecology* 9: 1171-1193.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B. M., Cammue B. P. & De Bolle M. F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Bioche.* 46(11): 941-950.
- Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G., & Morozzi G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A*. 1054(1-2): 113-127.

- Shashidhara G., Hema M.V., Koshy B., Farooqi A.A. (2003). Assessment of genetic diversity and identification of core collection in sandalwood germplasm using RAPDs. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78: 528-536.
- Shaw P.W., Pierce G.J., Boyle P.R. (1999). Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*. 8: 407-417.
- Siedow J. N. (1991). Plant Lipoxygenase: structure and function. *Plant. Physiol Plant. Mol. Biol.* 42: 145-188.
- Skroch P.W., Nienhuis J., Beebe S., Tohme J., Pedraza F. (1998) Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. *Crop Science*. 38: 488-496.
- Sneath P. H. A. and Sokal R. R. (1973). *Numerical Taxonomy*, San Francisco: Freeman. 573
- Sokal R.R. and C.D. Michener. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bulletin* 38:1409-1438.
- Sokal R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bulletin* 38:1409-1438.
- Strapazzon A., Girolami V., Masia A. (1985). Host plant chemicals regulating the reproductive behavior of olive flies. in: *integrated pest control in olive groves*. Edit. Cavallaro R., Crovetto A. 122-127.
- Taba S., Diaz J., Franco J. and Crossa J. (1998). Evaluation of Caribbean maize accessions to develop a core subset. *Crop Sci*. 38: 1378-1386.
- Taba S., J. Diaz J. Franco J. Crossa and S.E. Eberhart. (1999). A core subset of LAMP, from the Latin American Maize Project. CIMMYT, Mexico DF.
- Taba S., Duncan K., Krakowsky M., and J. Diaz. (2001). Annual research report, maize genetic resources. CIMMYT, Mexico DF.
- Tanaka K, Tsumura Y, Nakamura T (1999) Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species *F. japonica*. *Theor Appl Genet*. 99: 11-15
- Tang J., Zielinski R., Aldea M. & DeLucia E. (2009). Spatial association of photosynthesis and chemical defense in *Arabidopsis thaliana* following herbivory by *Trichoplusia ni*. *Physiol Plant*. 137(2): 115-124.
- Tang J., Zielinski R., Aldea M. & DeLucia E. (2009). Spatial association of photosynthesis and chemical defense in *Arabidopsis thaliana* following herbivory by *Trichoplusia ni*. *Physiol Plant*. 137(2): 115-124.
- Testolin R. and Lain O. 2005. DNA extraction from olive oil and PCR amplification of microsatellite markers *J. Food Sci*. 70:108-112.

Testolin R., Marrazzo T., Cipriani G., Quarta R., Verde I., Dettori M.T., Pancaldi M., Sansavini, S. (2000). Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*. 43: 512-520.

Thachuk C., Crossa J., Franco J., Dreisigacker S., Warburton M. and Davenport G. F.. (2009). Core Hunter: an algorithm for sampling genetic resources based on multiple genetic measures. *BMC Bioinformatics*. 10: 243.

Thompson G. A. and Fiona L. G. (2006). Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany*. 57(4): 755-766.

Thompson S.K. 2002. *Sampling*. 2nd ed. JohnWiley & Sons, New York.

Torres-Villa L.M., Rodriguez-Molina M.C., Martinez J.A. (2003). Efectos del daño de la mosca del olivo y del atroje sobre la microflora en pasta y acidez del aceite virgen de oliva. *Grasas y Aceite*. 54: 285-294.

Trujillo I., Rallo L., (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 120:318-324.

Tzanakakis M.E. (2006). *Insects and mites feeding on olive. Distribution, importance. Habits, seasonal development and dormancy*. Edit. Brill, Leiden. Boston. 85-106.

Uccella N. (2001). Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends in Food Science and Technology*. 11: 328-339.

Alba V., Montemurro C., Sabetta W., Pasqualone A. and Blanco A. (2009). SSR-based identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy *Scientia Horticulturae* . 123:11-16.

van Hintum Th.J.L, Brown A.H.D., Spillane C. and Hodgkin T. (2000). Core collections of plant genetic resources. *IPGRI Technical bulletin No 3*. 1-51

van Hintum Th.J.L. (1999). The Core Selector, a system to generate representative selections of germplasm accessions. *Plant Genet. Resour. Newsl*. 118: 64-67.

van Loon L. C., Rep M. & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*. 44: 135-162.

van Treuren R., Tchoudinova I., van Soest L.J.M., van Hintum T.J.L. (2006) Marker-assisted acquisition and core collection formation: a case study in barley using AFLPs and pedigree data. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 43-52.

Veronese P., Narasimhan M. L, Stevenson R.A., Zhu J.K., Weller S.C., Subbarao K.V.; Bressan R.A. (2003). Identification of locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 35: 574-587.

Volk G.M., Richards C.M., Reilley A.A., Henk A.D., Forsline P.L., Aldwinckle H.S. (2005) Ex situ conservation of vegetatively propagated species: development of a seed-based core collection for *Malus sieversii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130: 203–210.



- Ward, J.H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Statist. Assoc.* 58:236-244.
- Weller S.A.J., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N. and Stead D.E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2853-2858.
- Woolfe M and Primrose S., (2004). Food forensic: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in biotechnology*. 22: 222-226.
- Wright S: (1978). *Evolution and the Genetics of Populations: A treatise in four volumes* Volume IV. University of Chicago Press.
- Wu J., Hettenhausen C., Schuman M. C. & Baldwin I. T. (2008). A comparison of two *Nicotiana attenuata* accessions reveals large differences in signaling induced by oral secretions of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Plant Physiol*. 146(3): 927-939.
- Yu D. J., Chen Z.L., Zhang R.J. and Yin W.Y. (2005). Real Time qualitative PCR the inspection and identification of *Bactrocera philippinensis* and *Bactrocera occipitalis* (diptera: tephritidae) using Sybr green assay. *The raffles bulletin of zoology*. 53(1): 73-78.
- Zohary D, and P. Spiegel-Roy. (1975). Beginning of fruit growing in the old world. *Science* 188: 319-327.

### **Periodo di ricerca trascorso all'estero:**

Stage formativo di 7 mesi (gennaio 2010-luglio 2010) nel gruppo di Pomologia del "Dipartimento di Agronomia E.T.S.I.A.M dell' Università di Cordoba", sotto la direzione scientifica del Prof. Luis Romero Rallo e del Prof. Diego Barranco Navero, svolgendo l'attività di ricerca sull' identificazione dei principali patogeni e virus dell'olivo (*Olea europea*) mediante Real Time PCR e sulla costruzione di *core subset* a partire da una collezione iniziale della banca di germoplasma mondiale di olivo (BGMO) di Cordoba.

### **Pubblicazioni:**

Imperato A, La Mura M, Corrado G, Rao R Molecular fingerprinting of olive cultivars of Southern Italy. Proceedings of the LI Congresso Nazionale SIGA Riva del Garda 2007.

Varricchio P, Imperato A, Alagna F, Baldoni L, Rao R and Corrado G. Identification of differentially expressed EST in olive as a consequence of the olive fruit fly attack. Proceedings of the LII Congresso Nazionale SIGA Padova 2008.

Varricchio P, Imperato A, Baldoni L, Rao R. Identificazione e caratterizzazione di sequenze EST differenzialmente espresse in olivo in risposta all'attacco della mosca. Giornate Scientifiche 2008 Facoltà di Agraria Portici.

Varricchio P, Imperato A, Baldoni L, Rao R, Corrado G. Selezione di sequenze EST differenzialmente espresse in olivo in risposta all'attacco della mosca. XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia (CNIE) Ancona 2009.

Imperato A., Alagna F., Varricchio P., Pastore N., Baldoni L., Corrado G., Rao R. - Identification of up-regulated genes in olive fruits under *Bactrocera oleae* attack. Atti del 53th Congresso Nazionale SIGA. Torino 2009.

Imperato A., Corrado G., Alagna F., Varricchio P., Baldoni L., Rao R. Selezione di sequenze EST ed identificazione di geni diversamente espressi in olivo a seguito dell'attacco della mosca *Bactrocera oleae*. *Italus Hortus* 17 (5), 2010: 25-28.

Imperato , A.; Corrado G.; Alagna F.; Varricchio P.; Baldoni L.; Rao R. Olive Molecular Response to the Attack of *B. Oleae*: Identification of up-Regulated Genes in Olive Fruits. Sottomesso per la pubblicazione a *Acta Horticulturae*.

G. Corrado, A. Imperato, M. La Mura, E. Perri, R. Rao, 2010, Genetic diversity of olive varieties from Southern Italy and olive oil traceability using SSR, sottomesso per la pubblicazione a *J Hort Sci & Biotec*.

### **Comunicazioni:**

Imperato A., Corrado G., Alagna F., Varricchio P., Baldoni L., Rao R. Selezione di sequenze EST ed identificazione di geni diversamente espressi in olivo a seguito dell'attacco della mosca *Bactrocera oleae*. Atti del I° Convegno Nazionale Dell'Olio ed Olio. Portici, 1-2 Ottobre 2009- Comunicazione orale.

Imperato , A.; Corrado G.; Alagna F.; Varricchio P.; Baldoni L.; Rao R. Olive Molecular Response to the Attack of B. Oleae: Identification of up-Regulated Genes in Olive Fruits. 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress. Poster Short oral presentation. 22-27 Agosto 2010, Lisbona, Portogallo. 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress.

## **MOLECULAR FINGERPRINTING OF OLIVE CULTIVARS OF SOUTHERN ITALY**

IMPERATO A., LAMURA M., CORRADO G., RAO R.

Department of Soil, Plant and Environmental Sciences and Animal Productions, University of Naples “Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

*SSR, Olea europea, genetic variability, variety identification*

Olive is one of the oldest cultivated plants and it is one of the most important oil-producing crop in Italy. Such plant is characterised by a high degree of genetic diversity because of its ancient domestication, the simplicity of the vegetative propagation, the long life span and the high self-incompatibility. A very large number of varieties are described in the Mediterranean countries, although it is likely that the variability of the morphological traits in different areas of cultivation, has contributed to the description of several synonymous. This large olive collection is valuable for germplasm resources as well as for research, and the evaluation and characterisation of these genetic resources is necessary to maximise the efficiency of germplasm management, preservation and pre-breeding programs. The development of various molecular marker techniques and their application in genetic diversity studies have resulted in improved discrimination among or within several olive cultivars. Here we are reporting on the molecular characterisation of 22 cultivars (for a total of 39 samples) locally cultivated in Southern Italy, and many of these cultivars are listed in the regulations for the production of DOP olive oil. The identification was carried out on fluorescent-based capillary electrophoresis and automated size estimation of six polymorphic DNA microsatellites (SSR), four of them belonging to the microsatellites set selected to carry out a ring-test on olive cultivar identification coordinated at national level by the IGV, Perugia. The total number of detected alleles was 48, with a minimum of 7 in three loci. The allele size range of all amplified fragments was from 100 to 250 bp. The average observed heterozygosity was 0,793. The results indicated that there is sufficient genetic diversity to distinguish all but two cultivars, as only Sant’Agostino and Uova di Pavone have an identical allelic pattern in all the loci analysed. However, principal co-ordinate analysis on the SSR data could not clearly cluster the cultivars according to the regions of diffusions or the destination of use. In conclusion, our data indicated the presence of genetic variability among the cultivars analysed and, furthermore, this work can provide data to enforce legislation for the control of olive oil genetic origin.

## IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED ESTs IN OLIVE AS A CONSEQUENCE OF THE OLIVE FRUIT FLY ATTACK

VARRICCHIO P.\*, IMPERATO A.\*, ALAGNA F.\*\*\*, BALDONI L.\*\*\*, RAO R.\*,  
CORRADO G.\*

\*) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, University of Naples “Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

\*\*) Institute of Plant Genetics - CNR, Research Division Perugia

*differential expression, Olea europea, Bactrocera oleae, suppression subtractive hybridization*

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) is the most harmful pest of olives worldwide and it causes significant yield losses in almost all countries of the Mediterranean Basin. Indeed, the threshold for olive fly infestation of table olives is near zero, and slightly higher for oil olives (8 - 10%). In EU the standard control method is based on insecticidal bait sprays from ground. The damages caused by the olive fruit fly are firstly due to the egg laying punctures of early maturing fruits. It has been proposed that fruits easier to puncture will attract more flies. Secondly, to the feeding tunnels of the growing larva, which usually causes the fruit to drop off the tree.

It is likely that the olive response to these two damages are different and the aim of this study is the identification of clones differentially expressed in *B. oleae*-olive fruit interaction. Specifically, we want to investigate the fruit response to oviposition and to feeding larvae, using the suppression subtractive hybridization (SSH) technique.

We constructed two subtracted cDNA libraries, one from punctured fruits and one from fruits with developing larvae, from olives of the ‘Moraiolo’ cultivar. The nucleotide sequences and putative amino acids translations of clones of the two subtracted libraries were analyzed using tBLASTX and tBLASTN algorithms of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). We then focus our attention to sequences with an e-value lower than 0.001. These ESTs were annotated and classified according to their biological function using Blast2GO.

The preliminary data suggest that olive response to puncture involves a number of genes that are different to those involved in the response to larva feeding. Furthermore, several biological classes of genes should be associated to the plant defense mechanisms, implying that the molecular response of olives is complex and involves numerous pathways.

## IDENTIFICATION OF UP-REGULATED GENES IN OLIVE FRUITS UNDER *BACTROCERA OLEAE* ATTACK

IMPERATO A.\*, ALAGNA F.\*\*\*, VARRICCHIO P.\*, PASTORE N.\*, BALDONI L.\*\*,  
CORRADO G.\*, RAO R.\*

\*) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, University of Naples  
“Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici, Italy

\*\*) CNR - Institute of Plant Genetics, Via Madonna Alta 130, 06128 Perugia, Italy

*Olea europea*, suppression subtractive hybridization, expressed sequence tags

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) is a serious pest of olive in most of the countries around the Mediterranean Basin, where it causes significant yield losses. Olive cultivars are characterized by different susceptibility level possibly related to the variability in plant defence responses to the insect pest attack.

To gain insight into molecular mechanisms involved in olive defence response to olive fly, we have constructed a SSH (Suppression Subtractive Hybridisation) cDNA library from infested fruits of ‘Moraiolo’ cultivar. The cDNA library was constructed by using RNA from olive with feeding tunnels as tester and undamaged olives as driver. Sequence analysis of 220 expressed sequence tags (ESTs) using tBLASTx algorithm indicated that 48% of the ESTs could be classified into putative known functions. Several biological classes of genes were identified, implying that the molecular response of olives to *B. oleae* is complex and involves several pathways.

ESTs with functions typically involved in stress response or more represented in the cDNA library were analyzed by Real Time PCR. Some clones such as a pathogenesis related protein (PR27) and a Chitinase class I confirmed to be largely over-expressed in the olive tissue infested by the fruit fly, suggesting their involvement in olive defence response.

The rapid amplification of cDNA ends (RACE) is in progress for a subset of interesting genes both to obtain full-length cDNA not yet available in public databases and to confirm their putative functions.

To our knowledge, our study reports the first transcriptomic data of genes up-regulated under olive fruit fly attack, an initial step towards the understanding of the molecular basis *B. oleae*-olive fruit interaction.

## Il contributo delle biotecnologie e del miglioramento genetico per l'innovazione dell'olivicoltura

Eddo Rugini\*, Valerio Cristofori e Patricia Gutiérrez-Pesce

Dipartimento di Produzione Vegetale, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo

### The contribution of biotechnologies and of genetic improvement for the oliviculture innovation

**Abstract.** Classical methods of genetic improvement such as clonal selection, induced mutation and recurrent selection have not given very advantageous results in olive breeding. Therefore, there is a need an hybridization program based on "gene pools", by using all the available biotechnological and molecular techniques. The unconventional techniques such as *in vitro* pollination, embryo rescue, constitution of dihaploids, spontaneous and under selective pressure somaclonal variation, somatic hybridization, genetic transformation, employment of molecular markers for the assisted hybridization, analysis of single alleles as well as the gene isolation, and techniques for reducing seedling juvenility have been described. All these techniques are essential both as a support to the classical hybridization and as techniques able to directly constitute new proper genotypes for a modern oliviculture, based on the culture intensification. Some successful results have been reported.

**Key words:** *Olea spp.*, *in vitro* culture, rootstocks, gene pools, cultivar.

### Introduzione

La coltivazione dell'olivo, diffusa prevalentemente in aree collinari, interessa tutte le regioni italiane, nelle quali sono spesso consolidate specificità storiche, paesaggistiche, di conduzione degli oliveti, sovente con impiego di cultivar adattate al particolare ambiente. Vista la pressante competizione mondiale nel settore oleario, diviene fondamentale promuovere un approccio innovativo all'olivicoltura italiana, tramite l'intensificazione degli impianti e la meccanizzazione integrale delle operazioni colturali, garantendo in ogni caso il mantenimento delle peculiarità del variegato comparto olivicolo nazionale, capace di garantire produzioni d'olio di elevata qualità. L'innovazione dell'olivicoltura italiana è legata allo

sfruttamento delle risorse e delle tecnologie disponibili, tradizionali e moderne, e non può più prescindere dalla sinergia del settore imprenditoriale e della ricerca scientifica, ancora troppo frammentaria e responsabile in parte della contrazione delle potenzialità produttive. Una olivicoltura competitiva necessita di genotipi adatti alla intensificazione culturale, che sono scarsamente disponibili e poco valutati, sia come cultivar autoradicate sia innestati su eventuali portinnesti nanizzanti. In conformità a tali premesse diviene prioritaria la ricerca di nuove varietà e/o portinnesti, utilizzando tutte le tecniche a disposizione. È ormai chiaro che la selezione clonale, la selezione massale ricorrente, l'ibridazione classica e la mutagenesi indotta, presentano notevoli limiti.

La *selezione clonale* e la *mutagenesi indotta* non hanno prodotto i risultati auspicati negli anni '60, prevalentemente a causa delle difficoltà nel migliorare certi caratteri senza peggiorarne altri e per le difficoltà riscontrate nell'isolamento di mutanti stabili. Testimonianza ne è il mutante a ridotta vigoria "Briscola" (Roselli e Donini, 1982), oggi impiegato soltanto come pianta ornamentale, e il mutante nano di Leccino (LD), con buone prospettive d'impiego sia come portinnesto nanizzante (Rugini *et al.*, 2001), sia come cultivar a fioritura molto tardiva, qualora si disponga di impollinatori adatti (fig. 1).

Anche l'*ibridazione* presenta difficoltà applicative a causa della prolungata fase giovanile, della prevalente autoincompatibilità e per limitata presenza di caratteri monogenici nella specie. Tuttavia, oggi sono disponibili tecnologie moderne di supporto, come l'impollinazione *in vitro*, il salvataggio di embrioni, l'impiego di marcatori molecolari per l'ibridazione assistita, l'analisi dei singoli alleli, la possibilità di costituire diaploidi e tecniche per accelerare l'ingentimento dei semenzali. Ben poche sono le "nuove varietà" costituite e statica appare la prospettiva per il futuro, sebbene si disponga di un'ampia quantità di germoplasma sia tra le varietà coltivate sia tra quelle selvatiche. Tuttavia, degne di menzione sono alcune cultivar selezionate recentemente (Fontanazza e Bartolozzi, 1998) quali la *FS17* (Patent IRO-CNR 1165/nv), *Don Carlo* (United States Patent PP13077) e *Giulia*, tutte caratterizzate da media vigoria, da por-

\* rugini@unitus.it

quelli condotti in condizioni controllate di laboratorio, effettuati mediante l'uso di uno o pochi individui (Kombargi *et al.*, 1998). Le varietà di olivo da tavola forniscono frutti la cui pezzatura maggiore consente una migliore sopravvivenza delle larve. Ciononostante le cultivar da olio, con drupe di minor pezzatura, sono comunque ospiti eccellenti per la mosca. Anche la durezza del frutto, sembra influenzare la scelta delle drupe in cui ovideporre. Esiste infatti una correlazione negativa fra durezza e infestazione (Burrack & Zalom 2008).

Nonostante il panorama varietale italiano sia ricco e diversificato, non molto si sa sulla risposta molecolare della pianta di olivo alla mosca *B. oleae*. È noto che durante il processo di interazione tra la pianta e gli organismi dannosi, si attivano una serie di geni coinvolti nei meccanismi di difesa. Studiare la variazione dei trascritti e caratterizzarne il loro ruolo può chiarire le basi del complesso meccanismo molecolare della risposta della pianta all'attacco della mosca. Considerando le scarsissime informazioni disponibili sul genoma dell'olivo, un'utile approccio sperimentale per lo studio delle risposte della drupa alla infestazione della mosca è rappresentato dalla tecnica SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*). Nel nostro lavoro abbiamo identificato sequenze EST e geni diversamente espressi nella drupa infestata della cultivar 'Moraiolo'.

### Materiali e metodi

È stata costruita una libreria, sottraendo il cDNA preparato a partire da drupe sane al cDNA ottenuto da drupe attaccate della varietà 'Moraiolo'. Tale tecnica consente di comparare due popolazioni di trascritti, il *driver* (tessuti di piante sane) ed il *tester* (tessuti vegetali di piante attaccate) ed ottenere una libreria sottrattiva di EST espresse in una popolazione (*tester*) piuttosto che nell'altra (*driver*). L'RNA totale è stato isolato dalle drupe come descritto nel kit RNeasy Mini (Qiagen) ed il cDNA ds è stato preparato seguendo quanto descritto nel kit PCR-select cDNA subtraction (Clontech, USA). I trascritti sottratti e amplificati, sono stati poi clonati utilizzando il vettore plasmidico pCRII-TOPO® (TOPO TA Cloning, Invitrogen). Il DNA plasmidico, purificato dalle colonie positive alla selezione *blue/white*, è stato digerito con l'enzima EcoRI e sequenziato mediante il metodo Sanger. Le sequenze dei trascritti sottratti sono state analizzate mediante Blast della banca dati NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ed ExPasy Proteomic Server (Gasteiger *et al.*, 2003). Le sequenze sono state assemblate in cluster di contigui, mediante il

software CAP3 (Huang & Madan, 1999); le sequenze non formanti contigui sono state considerate singoli. L'annotazione funzionale è stata eseguita utilizzando il software Blast2GO (Conesa & Gotz, 2007). La validazione dell'alterata espressione (drupe sane rispetto alle drupe attaccate) dei trascritti funzionalmente più interessanti, è stata eseguita mediante Real-Time PCR (Corrado *et al.*, 2007). Tre geni sovraespressi nelle drupe attaccate, sia della cv 'Moraiolo' che 'Leccino', sono stati sottoposti a 3' e 5' RACE (kit, Invitrogen), per completare le parziali cds (*Coding DNA Sequence*). I prodotti RACE, ottenuti sono stati clonati nel vettore pGEM-Teasy (Promega) ed i cloni positivi alla digestione con EcoRI, sono stati sequenziati, mediante il metodo Sanger.

### Risultati e discussione

Ai fini di identificare EST differenzialmente espresse coinvolte nel meccanismo di interazione olivo-mosca, si è impiegata la tecnica SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*). Duecentodiciannove cloni, aventi un inserto maggiore di 200 bp, sono stati sequenziati. La dimensione massima dell'inserto è risultata essere di 920 bp, quella media di 371 bp. Per assegnare una putativa funzione ai diversi trascritti. È stata effettuata l'analisi di similarità locale, eseguita per confronto della "query sequence" di ciascun trascritto, con la sequenza bersaglio, ovvero con le sequenze non ridondanti della banca dati di NCBI mediante l'algoritmo di allineamento locale tblastx. Circa il 70% dei trascritti ha mostrato un *e-value* significativo (<0,001). Dall'analisi bioinformatica effettuata, è emerso che 113 trascritti risultano avere similarità locale con trascritti di proteine depositate in banca dati. In figura 1 è riportata la distribuzione del numero di sequenze EST, considerando le prime 30 hit, ottenute per confronto della *query-sequence* di ciascun trascritto con le sequenze bersaglio della banca dati.

La specie di gran lunga più rappresentata è la *Vitis vinifera*. Soltanto tredicesima si posiziona l'*Olea europea*, a dimostrazione che ancora poche sono le sequenze nucleotidiche depositate in banca dati (ca 1.400). La scarsità delle informazioni sul genoma olivo potrebbe essere uno dei motivi per cui soltanto il 48% delle sequenze EST sono state annotate funzionalmente nelle diverse categorie (Processo biologico, Funzione molecolare, Componente cellulare), in accordo con il consorzio Gene Ontology. Il grafico in figura 2, rappresenta la distribuzione percentuale dei trascritti annotati, in accordo alla specifica funzione molecolare.



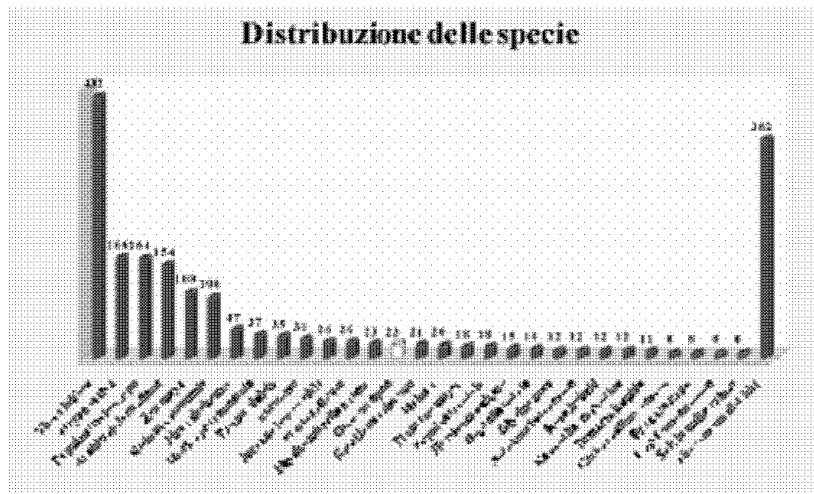


Fig. 1 - Distribuzione del numero di sequenze delle specie vegetali, per le prime 30 hit, ottenute per ciascun trascritto per confronto, mediante l'algoritmo di allineamento locale tblastx, della query sequence contro le sequenze nr della banca dati NCBI (Viridiplantae). La barra bianca indica il n° di sequenze della specie Olea europaea.

Fig. 1 - Species distribution of the first 30 hits for each transcript analysed by tBlastx against all nr sequences of NCBI data bank (Viridiplantae). The blanc bar indicates the sequences number of Olea europaea specie.

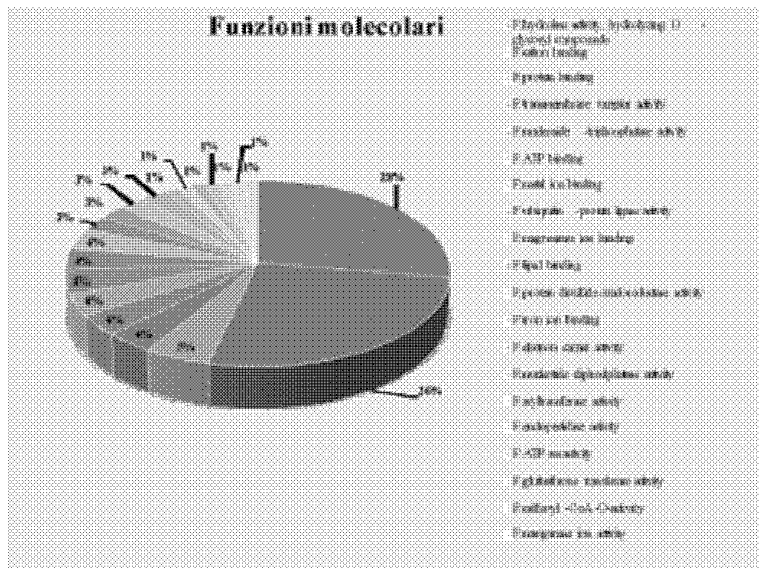


Fig. 2 - Diagramma a torta della distribuzione percentuale delle sequenze EST classificate in diverse categorie di funzione molecolare in accordo con il consorzio Gene Ontology.

Fig. 2 - The ESTs were classified into several molecular function categories. The pie graph shows the percentage of ESTs' distribution according to specific annotation of the Gene Ontology database.

La funzione molecolare delle sequenze EST sottolinea la complessità della risposta molecolare dell'olivo alla mosca. Tale risposta comporta un'alterazione delle vie primarie e secondarie del metabolismo. Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi bioinformatica,

sono stati selezionati i trascritti più interessanti, perché putativamente coinvolti nella risposta di difesa delle piante agli stress biotici. Pertanto, per dieci trascritti è stata effettuata l'analisi di espressione mediante Real Time PCR, al fine di validare la diffe-

rente espressione tra le drupe attaccate e drupe non attaccate della cv 'Moraiolo'. Il livello dei trascritti risulta essere più alto nelle drupe attaccate (galleria larvale) rispetto a quelle sane, indicando che i trascritti identificati appartengono a geni che sono sovraespressi. Si è pensato di valutare l'espressione relativa di tre trascritti, che hanno mostrato la maggiore espressione, anche in un'altra varietà di olivo ('Leccino'), in due stadi di attacco differenti (drupe punte e drupe con galleria larvale) rispetto alle drupe sane. Risulta confermata la sovraespressione dei tre trascritti nei due stadi di attacco rispetto alle drupe non attaccate. Inoltre la sovraespressione dei trascritti analizzati, è maggiore nella cv 'Leccino' rispetto alla cv 'Moraiolo' in risposta all'attacco della mosca. Sulla base dei risultati ottenuti, si è ritenuto interessante anche valutare l'espressione costitutiva dei tre trascritti nelle drupe non attaccate delle cv 'Moraiolo' e 'Leccino', che è risultata essere più elevata nella cv 'Moraiolo' rispetto alla cv 'Leccino'. In base ai risultati ottenuti dall'analisi di espressione, si è pensato di procedere con il *recovery* dei cDNA dei tre geni studiati indotti dall'attacco della mosca. Pertanto è stata effettuata la 3' e 5' RACE PCR ottenendo un cDNA *full length* per due geni sovraespressi. Le sequenze aminoacidiche dei due geni, rispettivamente di 229 e 268 aa, sono state sottoposte ad analisi di similarità locale per confronto con le sequenze proteiche della banca dati, evidenziando la presenza di un dominio conservato, che ne ha confermato la putativa funzione e l'appartenenza alla specifica famiglia proteica.

### Conclusioni

La risposta molecolare dell'olivo all'attacco della mosca è complessa e coinvolge numerose e differenti funzioni molecolari. L'identificazione di geni coinvolti nella risposta all'attacco della mosca rappresenta il primo passo per comprendere le funzioni di difesa attivate nell'*Olea europea* da questo insetto dannoso. Sarà necessario identificare e caratterizzare un più ampio set di geni di difesa della pianta di olivo e confrontarne l'espressione in varietà con diversa suscettibilità alla mosca. Se le conoscenze genomiche su questa specie saranno incrementate, come è auspicabile che accada in tempi brevi, si può ipotizzare che, in un futuro non troppo lontano, l'analisi di espressione di specifici trascritti potrà rappresentare uno strumento, per identificare e selezionare genotipi con livelli superiori di tolleranza alla mosca.

### Riassunto

La mosca *Bactrocera oleae* (Rossi) è il più importante stress biotico dell'olivo, responsabile di numerosi danni alle produzioni nei paesi del Bacino del Mediterraneo. Per identificare e caratterizzare geni diversamente espressi in risposta alla mosca, è stata costruita una libreria sottrattiva mediante la metodica SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*). Tra i 590 cloni della libreria, ne sono stati sequenziati 219 aventi un inserto di dimensioni maggiori di 200 bp. Le sequenze dei trascritti sono state annotate funzionalmente in accordo con il consorzio Gene Ontology. La validazione dell'espressione differenziale dei trascritti funzionalmente più interessanti è stata eseguita mediante Real-Time PCR. Per ottenere i trascritti *full-length* de geni indotti dall'attacco della mosca, è stata eseguita la RACE-PCR. Data la scarsa conoscenza sulle basi molecolari delle risposte di difesa dell'olivo, tale studio ha permesso di identificare i primi geni di olivo omologhi a quelli notoriamente coinvolti nella difesa delle piante contro insetti e funghi fitofagi.

**Parole chiave:** *Olea europea*, SSH-PCR Select, resistenza ad insetti.

### Bibliografia

- BURRACK H.J., ZALOM F., 2008. *Olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) ovipositional preference and larval performance in several commercially important olive varieties in California*. Journal of Economic Entomology 3: 750-758.
- CONESA A., GOYZ S., 2007. *Blast2GO: A Comprehensive suite for functional analysis in plant genomics*. International Journal of Plant-Genomics, 2008, 1-13.
- CORRADO G., SASSO R., PASQUARIELLO M., IODICE L., CARRETTA A., CASCONI P., ARIATI L., DIGILIO M.C., GUERRIERI E., RAO R., 2007. *Systemin regulates both systemic and volatile signalling in tomato plants*. J. Chem. Ecol. 33(4): 669-681.
- GASSTEIGER E., GAFFIKER A., HOOGLAND C., IVANYI L., APPEL D. R., BAIROCH A., 2003. *ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. Nucleic Acids Research, 31(13): 3784-3788.
- HUANG X., MADAN A., 1999. *CAP3: A DNA sequence assembly program*. Genome Res. 9 (9): 868-877.
- IANNOTTA N., NOCE M.E., RIPA V., SCALERCIO S., VIZZARRI V., 2007. *Assessment of susceptibility of olive cultivar to the Bactrocera oleae (Gmelin, 1790) and Camarosporium dalmaticum (Thum.) Zachos & Tzav-Klon. Attacks in Calabria (Southern Italy)*. Journal of Environmental Science and Health, 42: 789-793.
- IANNOTTA N., PERRI L., TOCCI C., ZAFFINA F., 1999b. *The behaviour of different olive cultivars following attacks by Bactrocera oleae (Gmel.)*. Acta Hort. 472: 545-548.
- KOMBORAGI W.S., MICHELAKIS S.E., PETRAKIS C.A., 1998. *Effect of olive surface waxes on oviposition by Bactrocera oleae (Gmel.)*. J. Economic Entomology. 91: 993-998.
- RIZZO R., CALECA V., 2006. *Resistance to the attack of Bactrocera oleae (Gmelin) of some Sicilian olive cultivars*. Olivebiotech 2006- Mazara del Vallo, Marsala. 2: 35-42.

seem to be extremely conserved within the variety of species studied. *Malus hupehensis*, which was origin in china, was strong resistance rootstock. In this study, we attempted to make out the expression pattern of PR genes which are downstream components of the SAR pathway in response to SA, MeJA and ACC in *Malus hupehensis*. Firstly, we isolated the partial sequence of three PR genes from *Malus hupehensis*, MhPR1, MhPR5 and MhPR8. Three PR genes were induced by SA, MeJA and ACC. However, MhPR1, MhPR5 and MhPR8 showed a distinct pattern of expression in leaves, stems and roots. The expression of MhPR1 was enhanced at 4h and gradually increases during the first 48h post-induced with SA, MeJA and ACC in leaves and roots. MhPR1 gene was intensively induced at 4 hour post-induced by MeJA and ACC and at 12 hour by SA in stems. MhPR5 was strongly induced by SA and ACC at 48 hour post-induced and by MeJA at 12 hour post-induced in leaves and delicate induced in stems and roots during the first 48h. MhPR8 was strong induced in stems, weakly induced in leaves and roots by SA, MeJA and ACC. The results showed that a distinct pattern of expression of PR genes in *Malus hupehensis* which differed from the reports previously for model plants arabidopsis, tobacco and rice. MhPR1, MhPR5 and MhPR8 gene were regarded as the marker genes in the SAR response in *Malus hupehensis*. Woody plants could have own signal pathway in response to SA, JA and ET in contrast with herbal plants.

#### S04.014

##### MicroRNA Expression Profiles in Strawberry Plants

Li, H.; Zhang, Z.; Huang, F.; Chang, L.; Ma, Y.; Zhao, X.

COLLEGE OF HORTICULTURE, SHENYANG AGRICULTURAL UNIVERSITY, DONGLING ROAD 120, 110866, SHENYANG, LIAONING, CHINA

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding regulatory RNAs which come from endogenous eukaryotic genome and play important regulatory roles in plant growth and development. To detect strawberry miRNAs and discover the expression difference in different organs and plants, we carried out the detection and quantification of strawberry miRNAs by microarray and real time RT-PCR. The main findings were that 74 miRNAs were checked in strawberry plants by gene chip. Among them, four miRNA families (miR159, miR166, miR167 and miR169) deeply conserved in many plants from eudicots to monocots, even to gymnosperms. At the same time, four miRNA genes displayed clear expression difference between conventional and micropropagated strawberry plants by microarray, including two up-regulated genes (miR3535 and miR390) and two down-regulated genes (miR169a and miR169d). The ratios of conventionally propagated strawberry plant/micropropagated strawberry plant for miR3535, miR390, miR169a and miR169d were 2.6884, 2.2673, 0.2496 and 0.3814, respectively. Real time RT-PCR with TaqMan probe was used to validate the microarray result and analyze the expression patterns in organs. The expression of miR164 in receptacle was obviously higher than that in root, shoot tip and leaf, while the expression of miR172 was very low in root

in RNA-Seq, each transcript is represented by about 200-500 fragments, in Tag-based approaches each transcript is represented only by one specific tag. Therefore, 50-100 times less sequencing is required to quantify the important rare transcripts. The most accurate, reliable and versatile Tag-based technologies available are SuperSAGE or its improved version, SuperTag Digital Gene Expression (ST-DGE) profiling. These methods provide a 500x more secure annotation over conventional SAGE technologies, because the SuperTag it produces is 26 bp long vs. the 14-20bp tags delivered by conventional SAGE. SuperTags are sequenced in their millions and thus provide PCR-bias free, quantitative data. SuperSAGE/ST-DGE has been used for the elucidation of responses to abiotic and biotic stresses in a vast number of crops and for the simultaneous analysis of the interacting transcriptomes of plant hosts and their pathogens. The technology not only quantifies the expression of sense (coding) transcripts, but similarly of Natural Antisense Transcript (NATs) as components of up-and downstream regulatory mechanisms.

#### S04.016

##### Olive Molecular Response to the Attack of *B. oleae*: Identification of Up-Regulated Genes in Olive Fruits

Imperato, A.<sup>1</sup>; Corrado, G.<sup>1</sup>; Alagna, F.<sup>2</sup>; Varricchio, P.<sup>1</sup>; Baldoni, L.<sup>2</sup>; Rao, R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO, DELLA PIANTA, DELL'AMBIENTE E DELLA PRODUZIONE ANIMALE, UNIVERSITÀ DI NAPOLI "PARTECIPAZIONE", VIA UNIVERSITÀ 100, 80135, PORTICI, NAPOLI, ITALY

<sup>2</sup>CNR-ISTITUTO DI GENETICA VEGETALE, VIA MADONNA ALTA, 130-06128 PERUGINA, ITALY

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) is the most important biotic stress of olive tree, where it causes a significant reduction of yield and fruit quality. In order to identify genes involved in olive defence response to olive fly, we have constructed a SSH (Suppression Subtractive Hybridisation) cDNA library, using RNA from non attacked olives and RNA from olives with feeding tunnels of 'Moraiolo' cultivar. Among 370 clones of cDNA library, 219 clones, showing an insert size greater than 200 bp, were sequenced. The sequences, analysed by tBlastX (NCBI) and ExPasy Proteomic Server, were functionally annotated by the software Blast2GO, indicating that 48% of the ESTs could be classified into putative known functions. The differential expression of the most interesting transcripts was analysed by Real-Time RT-PCR. The obtained results confirmed the overexpression of defence related genes in the olive tissue infested by the fruit fly. The full-length cDNA of some expressed sequences were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) in order to confirm their putative functions. The response of olives to *B. oleae* infestation is complex and involves numerous molecular functions. To our knowledge, our study reports the first data on gene up-regulation following olive fruit fly attack; it represents an initial step towards the understanding of the molecular basis *B. oleae*-olive fruit interaction.