



CARATTERIZZAZIONE DELLA CULTIVAR DI OLIVO “AURINA DI VENAFRO”

Risultati preliminari (2014-2015)

Raffaella Petruccelli, Antonio Cimato IVALSA-CNR

Tommaso Ganino università degli Studi di Parma

con la collaborazione di Ferdinando Alterio e Emilio Pesino

Introduzione

Il Parco regionale agricolo storico dell'olivo di Venafro, noto anche come Parco Oraziano o Campaglione, è il primo parco regionale del Molise (WWF, 2008). È un parco agricolo storico nato per salvaguardare il patrimonio olivicolo del territorio di Venafro. L'agricoltura e gli uliveti di Venafro sono descritti fin dall'antichità: da Marco Porcio Catone, che nel De Agricoltura suggerisce di applicare le tecniche agricole usate a Venafro, a Orazio, che descrive una Venafro ammantata di olivi.

Del parco regionale si tratta già nella L. R. n. 23 del 20 ottobre 2004, recante "Realizzazione e gestione delle aree naturali protette". Il Parco Regionale Agricolo Storico dell'Olivo di Venafro è stato istituito con Legge Regionale n. 30 del 4 novembre 2008 (Statuto Ente Parco Venafro, 2011).

Nel territorio del parco dell'olivo di Venafro ricadono diverse varietà autoctone tra le quali la cultivar "Aurina" di Venafro, quella che gli antichi romani conoscevano come "Licinia" in omaggio al grande condottiero Licinio che la introdusse, nel IV sec. a.C., nel comprensorio del Parco storico dell'Olivo di Venafro.

Sinonimi e riferimenti bibliografici della cultivar Aurina

Sinonimo	Riferimento bibliografico
AUREA	Nola G. 1936; Lombardo N. 2001; Muzzalupo I., Lombardo N., Pellegrino M., Perri E. 2006
AURINA DI VENAFRO	Moschettini C. 1794; Ente Regionale Di Sviluppo Agricolo Per Il Molise 2000
LICINIA	Moschettini C. 1794; Caruso G. 1882; Bracci F. 1912; Nola G. 1936; De Leonardis A., Facciola V., De Felice M. 1999
LICINIANA	Moschettini C. 1794; Caruso G. 1882; Bracci F. 1912; Nola G. 1936; De Leonardis A., Facciola V., De Felice M. 1999; Lombardo N. 2001
OLIVA DI VENAFRO	Presta G. 1786; Caruso G. 1882; Leonardis A., Facciola V., De Felice M. 1999

Obiettivi dello studio

- 1) individuare le varietà e/o accessioni presenti nel parco;
- 2) predisporre una scheda pomologica descrittiva delle principali caratteristiche morfologiche delle piante;
- 3) individuare un profilo genetico riconducibile alla cultivar Aurina di Venafro.

Metodologie

1. Origine del materiale

nella primavera del 2014 sono state scelte e referenziate 50 piante rappresentative del patrimonio olivicolo del parco e, per le dimensioni del tronco, di età avanzata. Gli studi preliminari sono stati condotti su 9 piante scelte a random tra le 50. Da ciascuna pianta sono stati prelevati campioni di foglie, fiori, rami e radici per le successive analisi morfologiche e genetiche.

Le analisi sono state condotte presso i laboratori dell'IVALSA-CNR e presso i laboratori del Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università degli Studi di Parma

2. Analisi morfologiche

Il sistema di classificazione adottato è quello proposto dal C.O.I. (Barranco et al., 2000) e dall'Oleadb (Bartolini et al.1998), analizzando

3 caratteri dell'albero;

5 caratteri della foglia;

3 caratteri dell'infiorescenza;

9 caratteri della drupa;

11 caratteri del endocarpo.

La descrizione morfologica della pianta è riportata in una scheda nella quale sono riportati i dati del passaporto (nome più comune della cultivar o gli eventuali sinonimi, il paese d'origine, le zone predominanti di coltura), i caratteri morfologici e le considerazioni agronomiche e commerciali.

Allegati schede pomologiche delle 9 piante

Il livello di similarità tra le accessioni in esame è stato ottenuto attraverso l'analisi delle componenti principali e attraverso la matrice di similarità morfologica utilizzando distanze euclidee.

3. Analisi genetica

Le analisi genetiche sono state condotte su 9 campioni di foglie e 9 campioni di radici; Le accessioni studiate sono state nominate con un numero e una lettera identificativa della foglia (F) o della radice (R).

- Estrazione e quantificazione del DNA

Il materiale vegetale è stato conservato, previa immersione in azoto liquido, in congelatore alla temperatura di -80°C. In seguito il DNA è stato estratto utilizzando il kit Qiagen e/o il metodo CTAB (Belaj et al., 2001). Tali metodologie sono piuttosto rapide e permettono di ottenere una buona quantità e qualità di DNA estratto.

Il DNA è stato quantificato utilizzando il metodo spettrofotometrico (Spectrophotometer Uvikon 930, Kontron Instruments Inc., Boston, MA, USA), cioè misurando l'assorbanza a 260 nm. Il rapporto $R = OD_{260}/OD_{280}$ è stato considerato valido indice di purezza (qualità) del DNA. Infatti, mentre la misura di assorbanza a 260 indica la presenza di acidi nucleici, la misura dell'assorbanza a 280 indica la presenza di impurezze (soprattutto proteine). Un valore di R compreso tra 1.8 e 2 indica una buona purezza del DNA. In questo studio, e per i marcatori utilizzati, è stato considerato accettabile un valore di R compreso tra 1.6 e 2.

Quando da spettrofotometro il rapporto OD_{260}/OD_{280} è risultato basso, è stata effettuata una purificazione con fenolo e cloroformio (pH 7.8). Questa metodologia prevede l'estrazione del DNA con ugual volume di fenolo, quindi un passaggio in vortex e centrifuga, recuperando, al termine di questa operazione, la fase acquosa; il passaggio successivo ha previsto l'estrazione dal surnatante mediante aggiunta di ugual volume di una soluzione fenolo – cloroformio (1:1), quindi un passaggio in vortex e centrifuga, e recupero del surnatante; l'ultimo passaggio ha previsto l'estrazione dal surnatante mediante aggiunta di un uguale volume di cloroformio, quindi un passaggio in vortex e centrifuga, avendo cura di recuperare il surnatante. Successivamente il DNA è stato precipitato con isopropanolo e sodio acetato, e dopo tre lavaggi in etanolo al 75% è stato risospeso in tampone TE.

Quantificato il DNA gli estratti sono stati diluiti in tampone TE portando la concentrazione del DNA di ogni campione a 20 ng/μl.

- Analisi mediante marcatori SSR

Per l'amplificazione del DNA dei campioni sono state usate 8 coppie di primer SSR già utilizzati da altri Autori, in modo da poter comparare i risultato con database genetici già esistenti. I primer utilizzati sono indicati in tabella 1.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume di 25 μl contenente: 1x Tampone di Reazione (International PBI, Milano, IT), 1.5 mM MgCl₂ (International PBI, Milano, IT), 0.2 mM dNTPs (Amersham

Biosciences), 0.2 μ M primer (MWG Biotech, Ebersberg), 20 ng DNA genomico e 0.6 U di Taq polimerasi (International PBI, Milano, IT).

La reazione di amplificazione è stata ottimizzata in thermal cycler MJ PCT 100 Research (Watertown, Mass.) programmando un primo passaggio a 95°C per 5 minuti seguito da 30 cicli di 45 secondi a 94°C, 45 secondi alla temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primer, 45 secondi a 72°C rispettivamente per la denaturazione, l'annealing e l'estensione del primer, al termine dei cicli sono stati effettuati 8 minuti di incubazione a 72°C.

I primer utilizzati nell'analisi SSR sono stati marcati con due fluorofori, e più precisamente alcuni sono stati marcati con fluorofori ad emissione di luce blu (CY5) e altri con fluorofori ad emissione di luce verde (IRD700). La scelta dei due tipi di marcatura è dipesa dalla possibilità di analizzare contemporaneamente al sequenziatore due prodotti di amplificazione ottenuti con primer diversi (analisi multiplex). Le amplificazioni con primer marcati con fluoroforo ad emissione di luce verde ha richiesto 35 cicli per ottenere un buon risultato.

Elenco degli oligonucleotidi utilizzati e delle rispettive temperature di annealing.

Locus	Primer sequences	Repeat motifs	T _a (°C)	References
DCA 3	F 5'-CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC-3' R 5'-TGCTTTTGTCTGTTTGAGATGTTG-3'	(GA) ₁₉	50	Sefc et al., (2000)
DCA 5	F 5'-AACAAATCCCATACGAACTGCC-3' R 5'-CGTGTGCTGTGAAGAAAATCG-3'	(GA) ₁₅	50	Sefc et al., (2000)
DCA 9	F 5'-AATCAAAGTCTTCTTCTCATTTTCG-3' R 5'-GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC-3'	(GA) ₂₃	55	Sefc et al., (2000)
DCA 16	F 5'-TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG-3' R 5'-TTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC-3'	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	50	Sefc et al., (2000)
DCA 18	F 5'-AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC-3' R 5'-GTTTTGCTCTCTACATAAGTGAC-3'	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	50	Sefc et al., (2000)
EMO 90	F 5'-CATCCGGATTTCTTGCTTTT-3' R 5'-AGCGAATGTAGCTTTGCATGT-3'	(CA) ₁₀	55	de La Rosa et al., (2002)
GAPU 101	F 5'-CATGAAAGGAGGGGACATA-3' R 5'-GGCACTTGTTGTGCAGATTG-3'	(GA)8(G)3(AG)3	57	Carriero et al., (2002)
GAPU 103	F 5'-TGAATTTAACTTTAAACCCACACA-3' R 5'-GCATCGCTCGATTTTATCC-3'	(TC) ₂₆	57	Carriero et al., (2002)

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante l'uso di sequenziatore CEQ 2000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Inc.) su gel di acrilamide CEQ Separation Gel LPA-1 (Beckman Coulter, Inc.). I profili di corsa sono analizzati per confronto con un marker CEQ DNA Size Standard kit 400 (Beckman Coulter, Inc.). In figura 11 sono riportati due esempi di ferogrammi, il primo dato dall'amplificazione di un primer marcato con fluoroforo IRD700 mentre il secondo dato dall'amplificazione di un primer marcato con fluoroforo CY5.

- Sizing degli alleli

La capacità discriminante dei satelliti, come pure di altri marcatori molecolari, è legata alle variazioni di dimensioni degli alleli o dei frammenti analizzati. Queste dimensioni vengono espresse come numero di paia di basi (bp, base pair). Qualsiasi metodo di analisi soffre di un errore sperimentale che riduce più o meno la precisione della stima dei frammenti. L'errore sperimentale somma una serie di fattori di disturbo: la matrice usata per l'elettroforesi, il tipo e la composizione in basi degli standard di riferimento usati per la stima delle dimensioni degli alleli o dei frammenti, presenza nel DNA template di composti che interferiscono con la PCR o con la velocità di migrazione dei prodotti di PCR nella matrice usata per l'elettroforesi, errori della polimerasi (slippage, aggiunta di +A ecc.).

Per evitare questi errori è necessaria molta attenzione nella lettura dei dati. E' necessario, inoltre, ricorrere alla tecnica del binning. I valori rilevati non vengono presi in assoluto ma vengono attribuiti a intervalli

(bins), la cui larghezza varia in funzione del tipo di microsatellite (di-nucleotidico, tri-nucleotidico ecc.), dall'intervallo delle bande di stuttering, tipiche ad esempio degli SSR di-nucleotidici, della comparsa sistematica di bande +1 bp rispetto alla banda attesa, dovute all'aggiunta da parte della polimerasi di una A ai prodotti di amplificazione ecc. Il binning permette di fare una lettura "conservativa" dei risultati, che comporta da una parte una perdita di informazione (es. alleli con differenze di 1 bp non vengono generalmente considerati diversi tra loro) ma evita dall'altra i falsi positivi, cioè differenze legate all'errore del metodo di analisi e stima delle dimensioni. Nella popolazione in studio è stato usato il software R (R Development Core Team, 2005) per l'analisi dei binning.

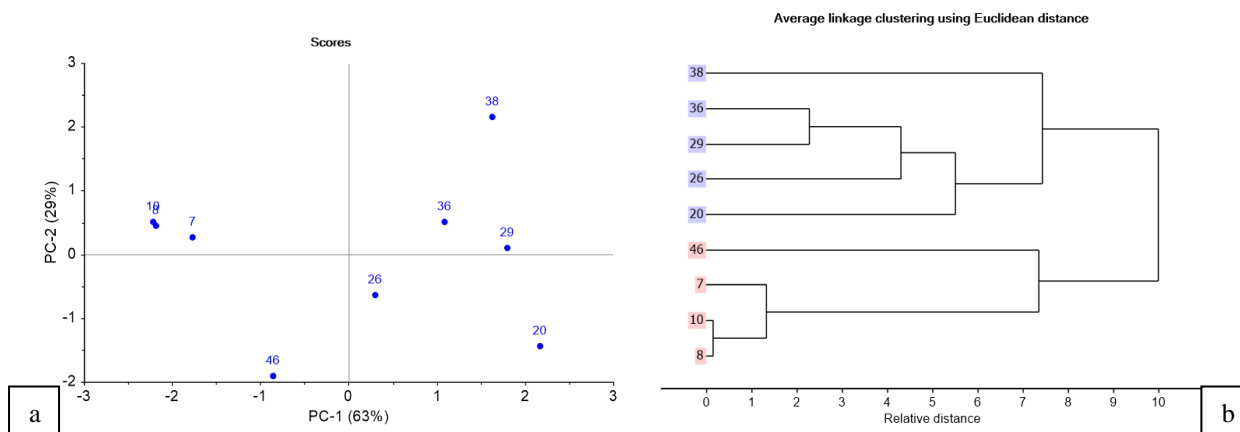
- *Elaborazione dei dati:*

Il livello di similarità tra le accessioni in esame e il germoplasma emiliano è stato ottenuto attraverso la matrice di similarità genetica utilizzando distanze euclidee.

L'analisi dei cluster e la costruzione del dendrogramma che si riferisce alle distanze genetiche sono state ottenute mediante il metodo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) mediante software Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., 2007).

4. Risultati

L'analisi dei Componenti Principali (PCA) **dei dati morfologici** (a) ha messo in evidenza la presenza di due gruppi nei quali sono stati raggruppati i genotipi oggetto di studio. lo stesso risultato è stato ottenuto con Cluster Analysis (b)-



I caratteri che hanno differenziato i nove genotipi sono stati la lunghezza della foglia e il numero dei fiori. I genotipi 46, 7, 16 e 8 presentavano foglie più lunghe e un maggior numero di fiori

I dati ottenuti in seguito **all'analisi genetica** sono stati elaborati statisticamente e mediante Cluster Analysis e distanza euclidea, è stato possibile generare un dendrogramma che individuasse le relazioni intercorrenti tra gli individui in esame, evidenziando differenze e similitudini all'interno della popolazione. Nelle 18 accessioni di olivo in studio (9 foglie e 9 radici), le 8 coppie di primer SSR selezionate hanno identificato il profilo allelico di ognuna delle accessioni in studio.

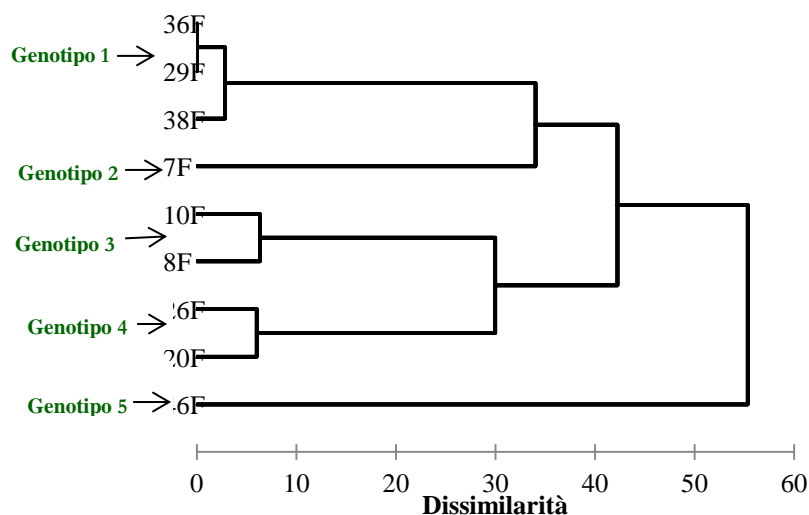
Nel dendrogramma generatosi è stato possibile distinguere 5 genotipi di olivo: genotipo 1 (29F-36F-38F), genotipo 2 (7F), genotipo 3 (8F e 10F), genotipo 4 (20F e 26F) e genotipo 5 (46F). Il genotipo 1 è rappresentato da tre individui di cui 2 a completa identità genetica (29F e 36F) e uno che differisce dai primi due per due alleli nel locus DCA3 (differenza di sole due paia basi) . Il genotipo 3 è caratterizzato da due individui con differenza nel locus DCA18. Infine il genotipo 4 è costituito da 2 individui differenti solamente per un allele nel locus DCA16. Gli individui all'interno di ognuno dei genotipi individuati rappresentano quindi dei cloni di uno stesso genotipo.

Profili allelici dei genotipi di olivo ottenuti utilizzando 8 primer microsatelliti

	DCA3	DCA5	DCA9	DCA16	DCA18	GAPU101	GAPU103	EMO90								
7F	239	243	203	209	175	175	151	166	177	177	186	186	160	198	nd*	nd*
8F	239	243	199	215	175	201	148	153	175	187	186	200	162	180	192	192
10F	239	243	199	215	175	201	148	153	177	181	186	200	162	180	192	192
20F	243	255	203	209	175	207	148	153	175	187	200	208	154	164	196	196
26F	243	255	203	209	175	207	142	153	175	187	200	208	154	164	196	196
29F	243	255	203	209	175	175	148	153	161	175	186	200	164	180	196	196
36F	243	255	203	209	175	175	148	153	161	175	186	200	164	180	196	196
38F	245	257	203	209	175	175	148	153	161	175	186	200	164	180	196	196
46F	245	257	203	209	175	207	157	157	147	147	200	208	154	164	196	196

* non amplificato

Dendrogramma relativo alla popolazione di olivo in studio ottenuto tramite cluster analysis e distanza euclidea



Per quanto riguarda le radici i profili di amplificazione sono risultati uguali ai risultati ottenuti dall'analisi fogliare.

Conclusioni

All'interno dei 18 individui in studio è stato possibile individuare variabilità morfologica e variabilità genetica. L'analisi morfologica ha raggruppato i genotipi in due gruppi, mentre l'analisi genetica ha identificato 5 genotipi di olivo.

Il DNA dell'apparato radicale delle piante è geneticamente simile a quello della parte aerea.

Il genotipo 4, da un confronto con database di altri laboratori sembra essere un clone della cv Aurina.

Riferimenti

- Belaj A., Trujillo I., Rosa R.D.L., Rallo L., 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126(1):64-71.
- Bracci F. 1912. Le condizioni degli uliveti nel territorio di Venafro (CB). *Boll. Uff. M.A.F.* Vol.: 11: 1-3.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F. and Giorio G., 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104:301-307.
- Caruso G. 1882. Monografia dell'olivo. *Enciclopedia Agraria Italiana* Vol: 3: 501-533. UTET Torino.

Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R., 2002. Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104:223-228.

de La Rosa, R., James, C.M., 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 Leonardis A., Facciola V., De Felice M. 1999. Varietà autoctone di olivo diffuse nel Molise: caratteristiche che mio-biometriche delle olive. 5° Convegno Nazionale Biodiversità 175-182 Regione Campania Caserta.

Ente Regionale Di Sviluppo Agricolo Per Il Molise 2000. Il germoplasma dell'olivo nel Molise. Quaderno divulgativo-ERSA, Molise, n. 5.

Lombardo N. 2001. Accessioni di origine italiana presso l'Istituto Sperimentale per l'Olivicoltura. Le Risorse Genetiche Vegetali presso gli IRSA Vol: 1 pp: 361-405 MIPAF.

Moschettini C. 1794. Osservazioni intorno alle varietà delle olive. (Vol 2: lettera IV: 179-229, lettera V: 230-258 - Accademia dei Georgofili) Coltivazione degli ulivi e della manifattura dell'olio Vol: 2(IV-V) pp: 179-229; 230-258 Aniello Nobile Napoli.

Muzzalupo I., Lombardo N., Pellegrino M., Perri E. 2006. Studio della variabilità genetica di ecotipi di olivo dell'Abruzzo e del Molise mediante l'uso di marcatori molecolari SSR. Atti convegno nazionale Maturazione e raccolta delle olive 31-35 ARSSA, Regione Abruzzo Alanno.

Nola G. 1936. L'olivicoltura in Agro di Venafro e le varietà coltivate. *L'olivicoltore*, 6: 13-19.

Moschettini C. 1794. Osservazioni intorno alle varietà delle olive. (Vol 2: lettera IV: 179-229, lettera V: 230-258 - Accademia dei Georgofili) Coltivazione degli ulivi e della manifattura dell'olio Vol: 2(IV-V) Pp: 179-229; 230-258, Aniello Nobile(ed) Napoli.

Presta G. 1788. Memoria intorno a sessantadue saggi diversi di olio. Stamperia Reale ed. Napoli.

R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.

Reale S., Angiolillo A., Baldoni L., D'Andrea M., Lima G., Scarano M.T. 2006. Olive autochthonous germplasm of Molise: molecular characterization by means of SSR and SNP. *Olivebioteq* Vol. 1: 195-198.

Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues Dos Santos M., Laimer Da Câmara Machado M. and Da Câmara Machado A., 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9:1171-1173.

StatSoft, Inc., 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

Statuto Ente Parco Venafro, 2011. http://www.parcodellolivodivenafro.eu/statuto_ente_parco.html

WWF, 2008. Anche il Wwf «saluta» la legge sul Parco regionale dell'olivo, comunicato stampa su Nuovo Molise, 9 novembre 2008.