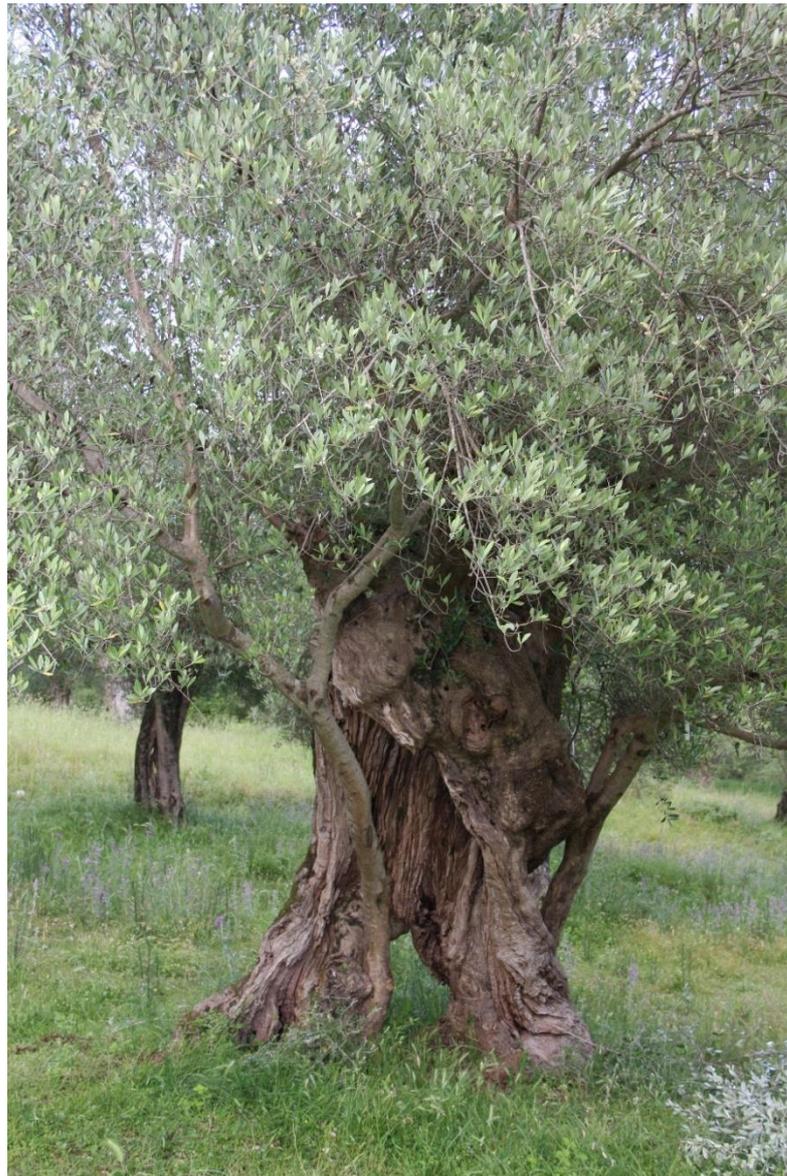


**CONVENZIONE TRA  
IL CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE – ISTITUTO PER LA  
VALORIZZAZIONE DEL LEGNO E DELLE SPECIE ARBOREE  
E  
L'ENTE PARCO REGIONALE DELL'OLIVO DI VENAFRO**

**Oggetto:** Consuntivo Attività di Ricerca svolta nell'ambito della Convenzione

***“L'OLIVETO DI VENAFRO” CARATTERIZZAZIONE DEI GENOTIPI DI OLIVO DEL  
“PARCO REGIONALE STORICO AGRICOLO DI VENAFRO”***



Responsabile scientifico del progetto: dr.ssa Raffaella Petruccelli

Collaboratore dott. Tommaso Ganino Università di Parma

Raccolta dati: Emilio Pesino, Ferdinando Alterio

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 oliveti di Venafro sono descritti fin dall'antichità: da Marco Porcio Catone, che nel De Agricoltura suggerisce di applicare le tecniche agricole usate a Venafro, e da Orazio che descrive una Venafro “ammantata di olivi”.

Del parco regionale si tratta già nella L. R. n. 23 del 20 ottobre 2004, (Realizzazione e gestione delle aree naturali protette), mentre con Legge Regionale n. 30 del 4 novembre 2008 è stato istituito il “Parco Regionale Agricolo Storico dell'Olivo di Venafro” (Statuto Ente Parco Venafro, 2011), *le cui finalità comprendono: salvaguardare gli esemplari monumentali di olivo, incoraggiare la coltivazione dell'olivo di Venafro quale elemento identitario, valorizzare e promuovere l'olio prodotto nell'area e salvaguardare il patrimonio genetico dell'olivo di Venafro promuovendo la diffusione delle cultivar locali*. Ad oggi il Parco degli Oliveti di Venafro indicato come “Paesaggio del Parco Regionale Storico Agricolo di Venafro” è iscritto al Registro Nazionale dei Paesaggi Rurali d'interesse storico (Decreto MIPAF 2018).

Nel Parco sono presenti sia alberi che possono identificarsi come “Patriarchi Vegetali”, che caratterizzano la tipicità del paesaggio storico-naturale di Venafro, non solo sulla base di valori estetici, ma anche attraverso le reciproche influenze tra elementi geomorfologici e attività antropiche, sia piante di olivo espressione del germoplasma varietale della Regione

La composizione varietale dell'olivo nella Regione Molise è molto ricca, anche se è prevalente la cultivar Aurina che caratterizza il paesaggio e le produzioni della zona. La cultivar è presente nel territorio comunale di Venafro da tempo memorabile, storicamente riferita alla varietà conosciuta dai Romani come “Licinia”, in omaggio al grande condottiero Licinio che la introdusse, nel IV sec. a.C., nel comprensorio di Venafro (Alterio, 2011). Nel territorio è rappresentata da olivi di antico impianto e spesso plurisecolari.

Altre 25 varietà di olivo caratterizzano il germoplasma autoctono della Regione, tra le quali le più diffuse sono: Gentile di Larino, Aurina, Oliva Nera di Colletorto, Rosciola, Cerasa di Montenero, Sperone di Gallo. Ognuna di queste cultivar caratterizza un particolare territorio della Regione, specificando una peculiare tipicità di zona agraria e di prodotto.

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Il lavoro ha interessato la caratterizzazione di 50 piante di olivo, presumibilmente più che centenarie e rappresentative del patrimonio olivicolo del Parco, attraverso:

- 1) le analisi morfologiche che hanno permesso di predisporre per ogni genotipo una scheda elaiografica descrittiva;
- 2) le analisi genetiche che hanno permesso di definire una «impronta digitale» molecolare (DNA fingerprinting) dei genotipi recuperati;

- 3) le analisi statistiche multivariate che hanno permesso di definire le similarità (o dissimilarità) morfologiche e genetiche tra individui e quantificare il livello di differenziamento tra essi;
- 4) le analisi di confronto genetico con le principali cultivar di olivo autoctone della Regione Molise conservate nel campo collezione del germoplasma olivicolo del CREA-OFA (MIPAF) di Rende (CS).

## **METODI**

### **Dati di passaporto e caratterizzazione morfologica**

#### *Caratteri morfologici*

Le analisi morfologiche e genetiche sono state condotte su 50 genotipi scelti sia perché rappresentativi del germoplasma olivicolo presente nel parco, sia perché ritenuti gli esemplari con più anni. Le accessioni sono state visitate, segnalate e fotografate (pianta intera e particolari) ed è stata rilevata e annotata la loro posizione tramite GPS. Le accessioni studiate sono state nominate con un numero progressivo.

Per misurare e classificare le accessioni allo studio sono stati utilizzati i caratteri descrittivi propri della specie. In particolare sono stati presi come riferimento i caratteri riportati nelle Schede Descrittive proposte dal C.O.I. (Barranco et al., 2000) e quelli riportati in altri descrittori accreditati (Oleadb, Bartolini et al.2001).

Le analisi morfologiche sono state condotte sia sulla pianta sia sui singoli organi vegetali. In particolare sono stati analizzati i caratteri dell'albero (2), della foglia (10), dell'infiorescenza (3), della drupa (14) e dell'endocarpo (12).

#### **Lista dei più comuni caratteri qualitativi e quantitativi rilevati e/o calcolati**

Albero: habitus, vigoria.

Fiore: Numero di fiori, forma, lunghezza.

Foglia: Lunghezza (L), larghezza (l), rapporto L/l, area fogliare, forma della foglia, forma angolo apicale, forma angolo basale, colore della pagina superiore e inferiore.

Frutto: Peso (g), lunghezza (L), larghezza (l), rapporto L/l, forma; simmetria, posizione massimo diametro, forma dell'apice, forma della base, profondità, forma e dimensione della cavità peduncolare, epicarpo, presenza di lenticelle rapporto frutto/endocarpo.

Seme: Peso (g), lunghezza (L), larghezza (l), rapporto L/l, forma; simmetria, posizione massimo diametro, forma dell'apice, forma della base, numero fasci fibrovascolari,, superficie del seme, presenza del rostro.

Il lavoro di caratterizzazione morfologica delle 50 piante è stato compiuto grazie alla fattiva e gratuita collaborazione del Prof. Ferdinando Alterio, Dott. Emilio Pesino, D.ssa Maria Vittoria Pesino. Dr. Antonio Rizzi.

### **Analisi statistica dei dati**

I dati ottenuti sono stati confrontati attraverso analisi statistiche (ANOVA e Cluster Analysis). Sono stati determinati i livelli di similarità tra i genotipi in esame. L'analisi dei coefficienti di similarità nel loro complesso ha permesso la costruzione di raggruppamenti (cluster) dove i genotipi sono stati collocati vicini o lontani tra loro in funzione del livello di similarità o dissimilarità. La costruzione del dendrogramma ha reso visivamente evidente la distinzione tra i 50 olivi del parco.

### **Caratterizzazione genetica**

#### *Estrazione e quantificazione del DNA*

Per 50 genotipi oggetto di studio il DNA è stato estratto da giovani foglie e per 9 piante rappresentative, da radici e foglie 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. Ad estrazione conclusa, la quantità e la concentrazione e la purezza del DNA estratto sono stati calcolati utilizzando il metodo spettrofotometrico (Spectrophotometer Uvikon 930, Kontron Instruments Inc., Boston, MA, USA), cioè misurando l'assorbanza a 260 nm (concentrazione degli acidi nucleici) e considerando i rapporti A260/280 (purezza degli acidi nucleici dalle proteine) e A260/230 (purezza degli acidi nucleici da sostanze fenoliche e altri contaminanti). La qualità del DNA estratto è stata verificata con gel d'agarosio (1.2 %).

#### *Analisi mediante marcatori SSR*

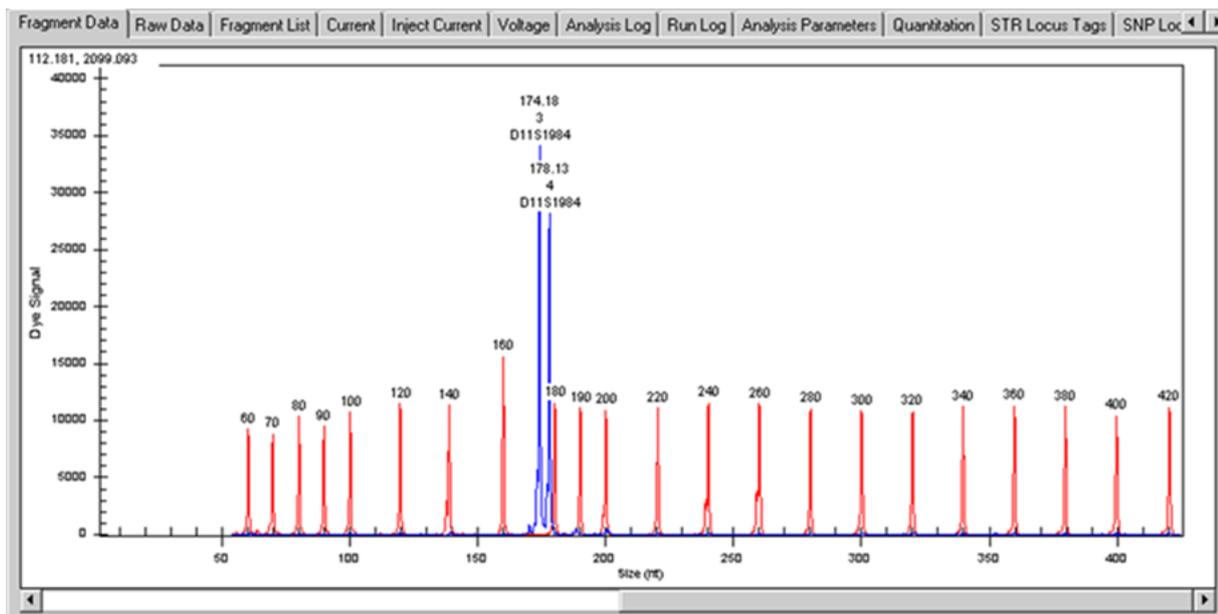
Il DNA genomico, isolato e purificato è stato amplificato tramite l'utilizzo di coppie di primer marcati con due fluorofori, e più precisamente alcuni sono stati marcati con fluorofori ad emissione di luce blu (CY5) e altri con fluorofori ad emissione di luce verde (IRD700). I primer utilizzati nell'analisi SSR sono stati 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.

**Tabella 1. Elenco degli oligonucleotidi utilizzati**

Locus	Primer sequences	Repeat motifs	References
DCA 3	CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC TGCTTTTGTCTGTTTGTAGATGTTG	(GA) <sub>19</sub>	Sefc et al., (2000)
DCA 5	AACAAATCCCATACGAACTGCC-3' CGTGTGCTGTGAAGAAAATCG	(GA) <sub>15</sub>	Sefc et al., (2000)
DCA 8	ACAATTC AACCTCACCCCATACCC TCACGTCAACTGTGCCACTGAACTG	(GA) <sub>18</sub>	Sefc et al., (2000)
DCA 16	TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>29</sub>	Sefc et al., (2000)
DCA11	GATCAAACACTGCACGAGAGAG TTGTCTCAGTGAACCCTTAAACC	(GA) <sub>26</sub> (GGGA) <sub>4</sub>	Sefc et al., (2000)
DCA 18	AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC GTTTTCTCTCTCTACATAAGTGAC	(CA) <sub>4</sub> CT(CA) <sub>3</sub> (GA) <sub>19</sub>	Sefc et al., (2000)
EMO 90	CATCCGGATTTCTTGCTTTT AGCGAATGTAGCTTTGCATGT	(CA) <sub>10</sub>	de La Rosa et al., (2002)
GAPU 71B	GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA ACAACAAATCCGTACGCTTG	(AG) <sub>8</sub> (AAG) <sub>12</sub>	Carriero et al., (2002)
UDO15	ATTCATCTATGGGCCGCTTC TCAACACAACCTACTAGCCTACCA	(TG) <sub>12</sub>	Cipriani et al., 2002
UDO12	TCACCATTCTTAACTTCACACCA TCAAGCAATTCCACGCTATG	(GT) <sub>10</sub>	Cipriani et al., 2002
OLEST14	TTTTCGAACGAATTGGAAGG CTCCATAAAGGAAATGGACGAA	(TTC) <sub>4-12</sub> AGATCACTATTTCATCT/ -	Mariotti et al., 2016
OLEST17	TTCATCATTGTTTCACATCCAA GGTGTATTTGGGACATAATCTCCA	(CGA) <sub>3-10</sub> - GAT/- - CAA/-	Mariotti et al., 2016
OLEST23	GAAGGAAACTTTTGAGCAGAGG TTGACAAGGAGGGCTGATTC	(GAA) <sub>4-10</sub>	Mariotti et al., 2016

I campioni sono stati amplificati in triplo su ogni locus microsatellite per confermare la ripetibilità del dato. 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.). Da ciascuna amplificazione sono stati ottenuti dei valori che corrispondevano alla dimensione del DNA amplificato per quella regione. Ogni varietà ha prodotto una stringa numerica. In Figura 1 è riportato un esempio di ferogramma.

**Figura 1.**



### **Analisi statistica dei dati**

Il livello di similarità tra le accessioni in esame è stato ottenuto attraverso la matrice di similarità genetica utilizzando distanze euclidee. L'analisi dei cluster e la costruzione del dendrogramma hanno permesso di individuare i probabili raggruppamenti (cluster) tra i genotipi analizzati in funzione del livello di similarità o dissimilarità.

### **Confronto con la cultivar Aurina e le principali cultivar autoctone del Molise**

L'analisi molecolare con i marcatori SSR è stata utilizzata per verificare la somiglianza tra i genotipi oggetto di studio e le principali cultivar di olivo presenti nel territorio. Anche in questo caso l'analisi a cluster e il relativo dendrogramma sono stati utilizzati per verificare il livello di similarità o dissimilarità tra le cultivar del germoplasma autoctono regionale e gli olivi oggetto di studio (in collaborazione con dott. Samanta Zelasco CREA-OFA).

## **RISULTATI**

### *Analisi dei caratteri morfologici*

I rilievi sulle foglie, frutti e semi hanno messo in evidenza differenze quali-quantitative dei caratteri analizzati. Le foglie variavano nelle dimensioni e nella forma (Tabella 2). La maggior parte dei frutti hanno tutti un peso inferiore ai due grammi, mentre solo 9 campioni hanno presentato frutti con peso superiore a 2g (Tabella 3). Esiste però una differenza tra le accessioni, infatti le drupe delle piante 12, 13, 18, 35 e 44 avevano drupe di peso molto basso (1.2-1.3 g) mentre in alcune accessioni avevano pesi compresi tra 1.9-2.3 g. Il peso maggiore delle drupe è stato registrato nella pianta 15. Una differenza marcata è stata osservata per i caratteri forma del frutto, forma della base e forma dell'apice (Tabella 3). I caratteri legati al seme hanno presentato un variabilità

tra le accessioni, ed in particolare le differenze delle dimensioni dei diametri hanno determinato differenze nella loro forma (Tabella 4). Nelle tabelle sono riportate le accessioni con le più evidenti differenze.

Nella scheda elaiografica di ciascuna pianta sono riportate le foto di foglie, frutti e seme della pianta e i relativi caratteri quanti-qualitativi (Allegati).

**Tabella 2. Caratteri della foglia**

Accessione	Rapporto L/l	Forma	Angolo apicale	Angolo basale
5V	3.42	Ellittica	Aperto	Aperto
19V	4.45	Ellittico-lanceolata	Molto aperto	Molto acuto
29V	3.36	Ellittica	Molto aperto	Acuto
23V	5.12	Ellittico-lanceolata	Acuto	Acuto

**Tabella 3. Caratteri della drupa**

Accessione	Peso g	Rapporto L/l	Forma	Forma dell' apice	Forma della base
12V	1.2	1.3	Ellittica	Rotondo	Arrotondata
39V	1.4	1.5	Allungata	Subconico	Rastremata
4V	1.4	0.9	Sferica	Rotondo	Arrotondata
50V	2.1	1.7	Allungata	Appuntito	Arrotondata

**Tabella 4. Caratteri del seme**

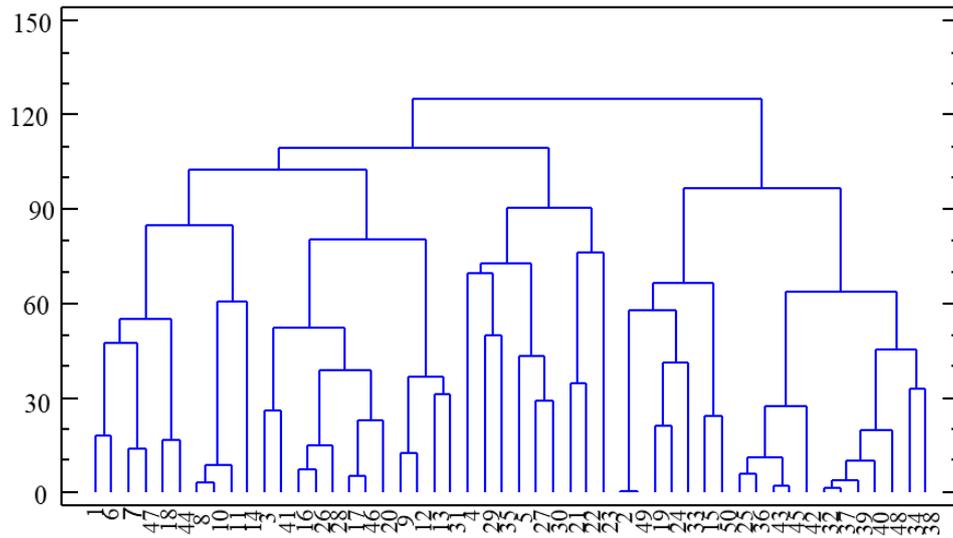
Accessione	Peso g	Rapporto L/l	Forma	Forma dell'apice	Forma della base
12V	0.22	1.7	Ovoidale	Rotondo	Arrotondata
3V	0.45	1.7	Ellittica	Conico	Arrotondata
4V	0.3	2.1	Allungata	Appuntito	Appuntita
50V	0.31	1.9	Ellittica	Conico	Rastremata

Il dendrogramma ottenuto dall'analisi multivariate (Cluster Analysis), usando le variabili morfologiche quantitative, ha raggruppato le accessioni in cluster con la loro rispettiva distanza (Figura 2).

Tutte le accessioni sono state raggruppate in 3 gruppi. Il primo gruppo, suddiviso in 2 sottogruppi, ha raggruppato 22 accessioni; nel primo sottogruppo sono rappresentate le accessioni con una ridotta area fogliare e frutti con peso maggiore di 1.5 g (1V, 6V, 18V, 44V). Il secondo sottogruppo ha raggruppato le accessioni 8V, 10V, 11V, 14V, che presentavano frutti di peso medio di 2.0g e semi con peso superiore a 0.35 g. Il secondo sottogruppo ha raggruppato 12 accessioni con frutti medio piccoli (valore medio < 1.6-1.7) e basso rapporto polpa/nocciolo. Il terzo gruppo ha raggruppato 19 accessioni suddivise in 3 sottogruppi. Il primo sottogruppo ha associato 7 accessioni (2V, 49V, 19V, 24V, 33V, 15V e 50V) con area fogliare medio-alta, frutti con peso medio superiore a 1.7 g e prevalentemente di forma allungata e infiorescenza lunga. Il secondo sottogruppo, ha incluso 5 accessioni che avevano la maggior area fogliare, frutti di peso compreso fra 1.6-1.8

g e forma allungata e semi prevalentemente di forma ellittica e di peso inferiore di 0.24 g. L'ultimo sottogruppo comprendeva le accessioni 32V, 37V, 39V, 40V, 48V 34V ev38V con frutti di forma allungata e presenza di umbone.

**Figura 2. Dendrogramma relativo alla popolazione di olivo in studio ottenuto tramite analisi dei caratteri quantitativi di foglia, frutto, seme e infiorescenza**



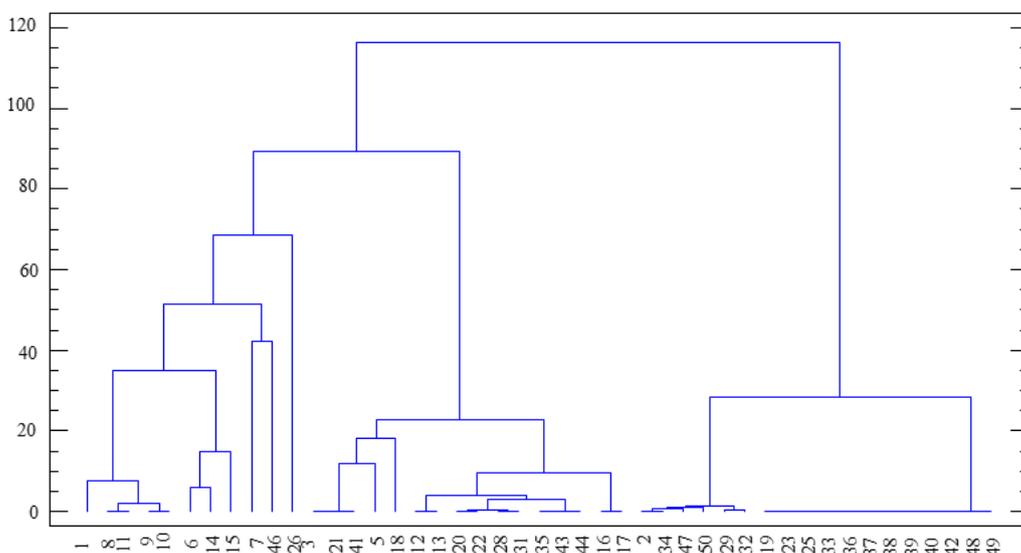
### Caratterizzazione genetica

Le coppie di primer utilizzate per la caratterizzazione dei genotipi di olivo, hanno evidenziato polimorfismo tra le accessioni del Parco. La Tabella 5 riporta i profili allelici dei genotipi di olivo ottenuti utilizzando 12 primer microsatelliti. La popolazione di piante di olivo del Parco di Venafro è caratterizzata da accessioni che presentano un profilo unico, come ad esempio le piante 22V, 6V, 1V, da accessioni che presentano una totale similitudine tra loro, ad esempio le piante 19V, 23V, 35V e le accessioni 8V, 11V e 9V, 10V e da piante con una elevata similitudine tra loro, come ad esempio le accessione 12V, 20V, 35V.

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.

Nel dendrogramma (Figura 3) generatosi è stato possibile distinguere 6 differenti gruppi che hanno raggruppato le 50 accessioni. Il genotipo 1 è rappresentato dalle accessioni 8V-11V (a completa identità genetica) e 9V-10V (a completa identità genetica) che si differenzino tra loro per due alleli nel locus GAPU71b (differenza di sole due paia basi); in questo gruppo è presente anche l'accessione 1V che si differenzia per gli alleli nel locus DCA8 e DCA5. Il secondo gruppo comprende le accessioni 6V-14V-15V che hanno mostrato marcate differenze tra i loro pattern molecolari e tra questi e quelli osservati nel resto della popolazione di genotipi. Nel terzo gruppo sono state associate 16 accessioni; le accessioni 3V, 21V e 41V a completa identità genetica tra loro, le accessioni 12V e 13V, le accessioni 22V e 28V e le accessioni 16V e 17V. Questo gruppo si caratterizza per minime differenze spesso per un allele. Gli individui all'interno di ognuno dei genotipi individuati rappresentano quindi dei cloni di uno stesso genotipo. Stessa situazione è stata osservata per l'ultimo raggruppamento dove sono raggruppate 18 accessioni e di queste 12 hanno presentato un profilo monomorfo per tutti i marcatori analizzati (19V, 23V, 25V, 33V, 36V, 37V, 38V, 39V, 40V, 42V, 48V e 49V).

**Figura 3. Dendrogramma ottenuto dai dati SSR dei 50 genotipi di olivo del Parco Regionale Storico Agricolo di Venafro**



**Tabella 5. Profili allelici dei genotipi di olivo ottenuti utilizzando 12 primer microsatelliti**

Accessione	PRIMER MICROSATELLITI											
	DCA 3	DCA18	GAPU71b	DCA 8	DCA 5	OLEST14	UDO 15	UDO 12	Emo 090	DCA 11	OLEST23	OLEST7
1V	239 243	175 179	127 130	137 155	194 212	276 276	107 107	155 155	190 190	143 149	210 216	269 269
2V	243 255	159 173	124 144	137 153	198 206	296 296	107 135	150 166	194 194	137 137	207 210	269 272
3V	243 255	173 185	124 144	141 167	198 206	290 290	nd nd*	166 166	194 194	137 137	210 216	266 272
5V	243 255	173 185	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	260 272
6V	232 239	173 179	124 127	127 143	198 206	290 296	107 107	164 166	186 194	127 127	207 210	260 260
7V	237 243	173 175	124 144	151 159	198 206	nd nd	107 107	157 157	nd nd	143 149	207 216	269 272
8V	239 243	175 179	124 144	137 151	196 214	276 276	107 107	155 155	190 190	143 149	210 216	269 269
9V	239 243	175 179	127 130	137 151	196 214	276 276	107 107	155 157	190 190	143 149	210 216	269 269
10V	239 243	175 179	127 130	197 151	196 214	276 276	107 107	155 157	190 190	143 149	210 216	269 269
11V	239 243	175 179	124 144	137 151	196 214	276 276	107 107	155 155	190 190	143 149	210 216	269 269
12V	243 255	173 185	124 144	141 153	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 194	135 135	210 216	266 272
13V	243 255	173 185	124 144	141 153	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 194	135 135	210 216	266 272
14V	232 243	173 185	124 124	141 141	198 206	296 296	107 107	157 166	188 194	137 137	210 216	266 272
15V	243 243	159 173	130 144	127 137	198 206	296 296	123 135	157 164	200 208	143 143	207 207	260269
16V	243 255	173 185	124 144	141 141	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 194	137 137	210 216	266 272
17V	243 255	173 185	124 144	141 141	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 194	137 137	210 216	260 272
18V	239 243	177 183	127 144	149 167	196 202	290 290	nd nd	157 166	194 194	149 149	207 210	260 272
19V	243 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	210 216	269 272
20V	245 257	173 185	124 144	141 151	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 200	135 135	210 216	266 266
21V	243 255	173 185	124 144	141 167	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 164	137 137	210 216	266 272
22V	245 257	173 185	124 144	141 151	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 200	135 135	210 216	266 266
23V	243 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
25V	243 255	195 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	nd nd	194 194	137 137	207 210	269 272
26V	243 243	159 173	130 144	127 137	198 206	nd nd						
28V	245 257	173 185	124 144	141 153	198 206	296 296	nd nd	166 166	194 200	135 135	210 216	266 266
29V	243 255	159 173	124 144	137 153	198 206	290 290	107 135	166 166	194 194	135 135	207 210	269 272
31V	245 257	173 183	124 144	141 153	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 200	135 135	210 216	266 266
32V	243 257	159 173	124 144	137 153	198 206	296 296	107 135	166 166	194 194	135 135	207 210	269 272
33V	245 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
34V	243 255	159 173	124 144	137 153	198 206	296 296	107 135	150 166	194 194	135 135	207 210	269 272
35V	245 257	173 185	124 144	143 153	198 206	296 296	nd nd	166 166	194 200	135 135	210 216	266 272
36V	243 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272

**Tabella 5**

Accessione	DCA 3	DCA18	GAPU71b	DCA 8	DCA 5	OLEST14	UDO 15	UDO 12	Emo 090	DCA 11	OLEST23	OLEST7
37V	243 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
38V	245 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 242
39V	243 255	159 173	124 144	137 137	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
40V	243 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
41V	243 255	173 185	124 144	141 167	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 194	137 137	210 216	266 272
42V	243 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
43V	245 257	173 185	124 144	143 153	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 200	135 135	210 216	266 272
44V	245 257	173 185	124 144	143 153	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 200	135 135	210 216	266 272
46V	243 255	173 185	nd nd	141 167	198 206	290 290	nd nd	166 166	194 194	137 137	210 216	266 272
47V	243 255	159 173	124 144	137 167	198 206	296 296	107 133	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
48V	243 255	159 173	124 144	137 137	198 206	269 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
49V	243 255	159 173	124 144	137 137	198 206	296 296	107 107	157 166	194 194	137 137	207 210	269 272
50V	243 255	159 173	124 144	139 153	198 206	296 296	107 132	157 166	194 194	135 135	207 210	269 272

\* non amplificato

### *Confronto con le principali cultivar della regione*

In questo studio è stata anche condotta un'analisi genetica che valutasse le relazioni che sussistono tra i genotipi del Parco di Venafro e le principali cultivar presenti nella Regione Molise. Come è noto una delle più rappresentative cultivar della regione è la varietà Aurina. Tuttavia, altre cultivar rappresentano il germoplasma autoctono della regione, pertanto la nostra indagine ha messo a confronto le accessioni del parco con le seguenti cultivar: Bottoni di Gallo, Cazzarella, Cellina di Rotello, Cerasa di Montenero, Gentile di Larino, Gentile nera di Colletorto, Gnagnaro, Grossa di Venafro, Noccioluta, Olivastro d'Aprile, Olivastro Dritto, Olivastro di Montenero, Olivetta nera, Paesana Bianca, Paesana Nera, Remugnana, Rosciola di Venafro, Rosciola di Rotella, Saligna, Sperone di Gallo.

Il dendrogramma ha prodotto 4 principali raggruppamenti (Figura 4) con una variabilità genetica tra 0.077 e 1. Il primo gruppo ha incluso la sola accessione 22V che rappresenta un genotipo unico differenziandosi dalle altre accessioni in studio e dalle cultivar molisane. Il secondo gruppo ha incluso 2 varietà note ('Gnagnaro' e 'Olivastro di Montenero') e l'accessione 18V.

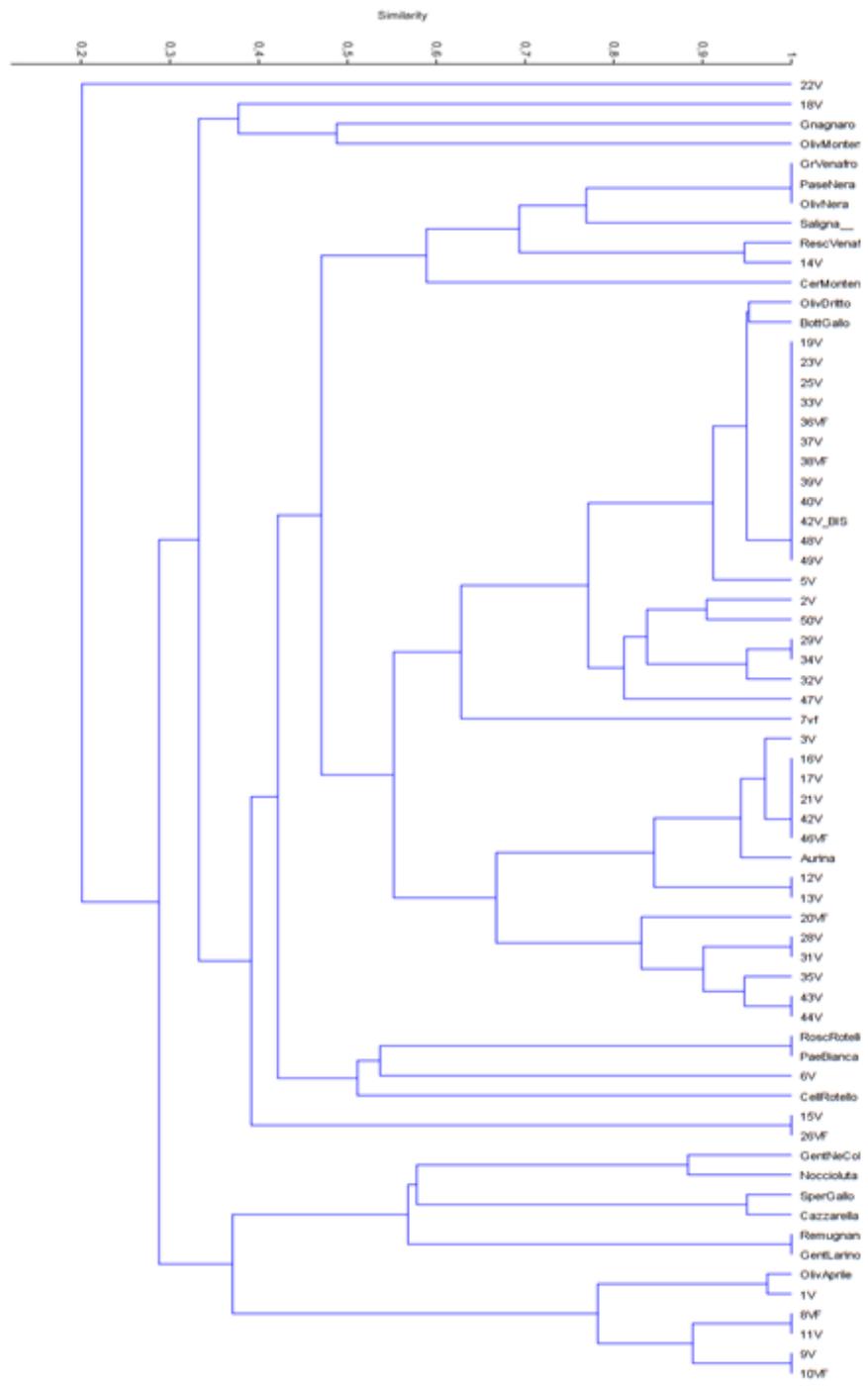
Il terzo gruppo è suddiviso in 5 sub-gruppi e comprende il maggior numero delle accessioni oggetto di studio. Il primo sottogruppo ha incluso 6 varietà ('Grossa di Venafro', 'Olivetta Nera', and 'Paesana Nera', con identico profilo genetico, 'Saligna' 'Cerasa di Montenero' e 'Resciola di Venafro') a cui è stato possibile associare l'accessione 14V. Questa accessione è molto vicina geneticamente alla cv Resciola di Venafro. Il secondo sottogruppo ha incluso le cultivar 'Olivastro Dritto' and 'Bottoni di Gallo' alle quali sono state associate 20 delle accessioni in studio. In particolare 12 accessioni (19V, 23V, 25V, 33V, 36V, 37V, 38V, 39V, 40, 42V, 48V e 49V) hanno presentato un modello monomorfo tra loro e un elevato indice di similarità con le cultivar note 'Olivastro Dritto' and 'Bottoni di Gallo'. Le rimanenti accessioni hanno presentato profili genetici dissimili tra loro e maggiori distanze genetiche con le varietà note.

Nel terzo sub-gruppo sono raggruppate 6 accessioni (16V, 17V, 21V, 42V, 46V e 20V), che hanno presentato un profilo genetico monomorfo (tutte le accessioni sono uguali) e le accessioni 12V, 13V, 20V, 26V, 31V, 35V, 43V e 44V con differenze genetiche tra loro. Nello stesso gruppo è inclusa la principale cultivar del territorio, la cultivar Aurina; che ha riportato elevata similarità con le accessioni 3V, 16V, 17V, 21V, 42V e 46VF, indicandone una probabile popolazione di cloni della cultivar stessa.

L'accessione 6V è nel cluster con le cv 'Cellina di Rotello', 'Paesana Bianca' e 'Rosciola di Rotello', ma geneticamente distante dalle stesse. L'ultimo sottogruppo ha incluso solo 2 accessioni geneticamente simili (15V e 26V) e non associate a nessuna delle varietà note. Il quarto gruppo ha unito 7 cultivar note (Noccioluta' and 'Gentile Nera di Colletorto', 'Sperone di Gallo' e 'Cazzarella', 'Remugnana' and 'Gentile di Larino') e l'accessione 1V strettamente associata con la varietà

‘Olivastro d’Aprile’. Nello stesso gruppo ma a una maggiore distanza sono raggruppate anche le accessioni 8V e 11V (uguali tra di loro) e 9V e 10V (uguali tra di loro).

**Figura 4. Dendrogramma relativo alla popolazione di olivo in studio e le principali cultivar di olivo della Regione Molise**



## Conclusioni

Nella presente ricerca è stata studiata la diversità genetica e morfologica delle piante di olivo presenti nel Parco degli Oliveti di Venafro. L'età della maggior parte di questi alberi era più di 100 anni, e quindi la distribuzione geografica non dovrebbe essere influenzata dalle moderne tecniche di vivaio o da recenti introduzioni.

I risultati ottenuti hanno evidenziato differenze morfologiche e differenze genetiche, queste ultime ottenute con analisi SSR. In particolare, l'analisi genetica ha permesso di individuare 7 accessioni uniche (accessioni 16V, 8V, 11V, 9V, 5V, 6V, 20V) non associabili ad alcuna cultivar presente nel database. Si potrebbe ipotizzare che queste abbiano avuto origine da riproduzione da seme, propagazione che ha avuto un ruolo importante nell'evoluzione delle cultivar di olive nella regione. Queste accessioni possono essere inserite nel germoplasma autoctono come nuovi genotipi.

Lo studio ha anche permesso di individuare variabilità intra-varietale. Infatti, nella popolazione in studio sono presenti “cloni” associati a varietà note del germoplasma della Regione (Aurina, Bottoni di Gallo). Questa variabilità clonale è estremamente interessante in quanto i differenti cloni possono rappresentare una potenziale fonte di materiale genetico con specifiche e utili caratteristiche agronomiche.

Da questo preliminare studio si deduce l'importanza del Parco come “depositario” di un importante patrimonio di biodiversità olivicola che rende il Parco un vero e proprio “Laboratorio olivetato storico”. Il patrimonio genetico varietale conservato da tempo è allo stesso tempo un ottimo punto di partenza per definire percorsi di sviluppo, affinché il Parco si mantenga un “paesaggio produttivo”, conservi la qualità territoriale e incrementi sistemi agricoli basati sulla biodiversità e la sostenibilità. Lo studio di interessanti agronomici ed economici caratteri di “nuovi genotipi” e di varietà tipiche potrà consentire la produzione di olio d'oliva caratterizzato da set unici di sapori e qualità organolettiche.