

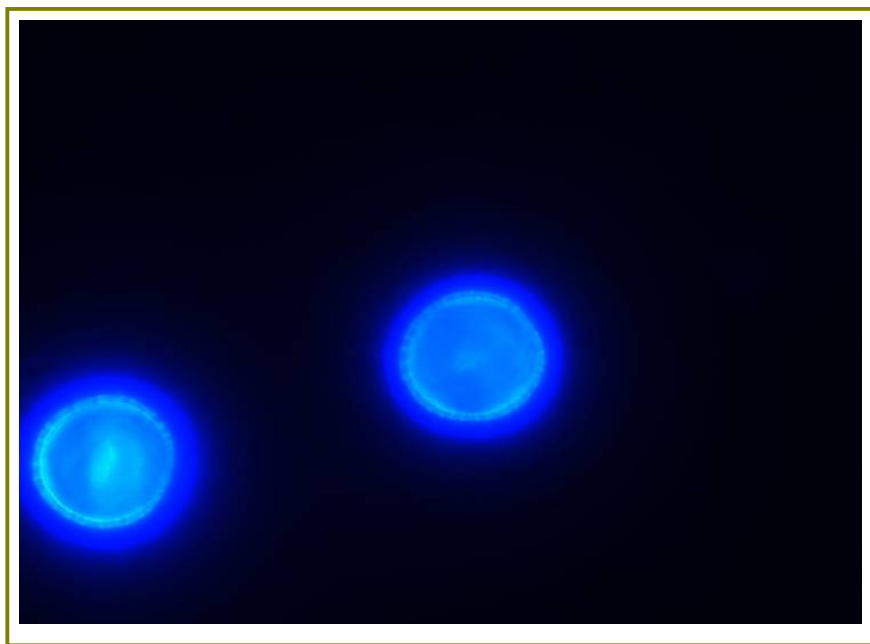


Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olivo
Spoleto

Collana divulgativa dell'Accademia

Volume III

BIOTECNOLOGIE



A cura di

Eddo Rugini e Luciana Baldoni

Realizzato nell'ambito del progetto "Ricerca ed Innovazione per l'Olivicoltura Meridionale", finanziato dal MiPAAF



Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olivo
Spoleto

Collana divulgativa dell'Accademia

Volume III

BIOTECNOLOGIE

A cura di

Eddo Rugini* e Luciana Baldoni**

* Dipartimento di Produzione Vegetale (DIPROV)
Università degli Studi della Tuscia
Via S. Camillo de Lellis snc
01100 Viterbo

E-mail: rugini@unitus.it

** Istituto di Genetica Vegetale
CNR, sezione di Perugia
Via Madonna Alta, 130
06128 Perugia

E-mail: luciana.baldoni@igv.cnr.it

Realizzazione editoriale
Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olivo
Palazzo Ancajani - Piazza della Libertà, 12
06049 Spoleto (PG)
Tel/ Fax 0743- 223603 – e-mail: andulivo@virgilio.it

Realizzato nell'ambito del progetto "Ricerca ed Innovazione per l'Olivicoltura Meridionale", finanziato dal MiPAAF

ISSN 2281-4930

Pubblicato online nel mese di ottobre 2011

PREFAZIONE

Sono trascorsi cinquanta anni dalla fondazione dell'Accademia Nazionale dell'Olio e dell'Olio. Cinquanta anni che hanno visto alla sua guida personaggi, di cui alcuni, purtroppo, non più presenti tra noi, che attraverso i loro alti comportamenti etici, morali, politici e professionali hanno realizzato le strutture portanti dell'Accademia e dato lustro alle attività svolte.

L'attuale Consiglio Accademico, per celebrare questo importante traguardo, ha deciso, in linea anche con gli obiettivi del "Progetto Network", di realizzare una Collana dell'Accademia, sottoforma di opuscoli, riguardante tutta la filiera produttiva e commerciale dell'olio extravergine di oliva. Sono state individuate numerose tematiche, affrontate alla luce dei più recenti aggiornamenti scientifici e tecnici sia per minimizzare i costi produttivi, sia per ottimizzare la qualità e la sua valorizzazione sui mercati.

In questa direzione notevole enfasi è stata data ai nuovi modelli d'impianto, alle tecniche colturali, alle prospettive della genomica, alle tecnologie di trasformazione, alla valorizzazione dei sottoprodotti, agli aspetti di medicina preventiva e salutistica, alla gestione economica aziendale ed alle strategie di marketing. Nella scrittura degli opuscoli si è cercato di utilizzare una forma divulgativa, ma al tempo stesso rigorosa nei termini scientifici utilizzati.

In ogni opuscolo sono fornite tutte le indicazioni necessarie per contattare, per eventuali approfondimenti, gli Autori.

GianFrancesco MONTEDORO
Presidente Accademia Nazionale
dell'Olio e dell'Olio

BIOTECNOLOGIE

Indice

	Pagina
Abstract	2
1. Introduzione	3
2. Biotecnologie per la produzione di piante di qualità	5
2.1. Micropropagazione per stimolazione di gemme preformate	5
2.2. Micropropagazione per organogenesi	8
2.3. Micropropagazione per embriogenesi somatica	9
2.4. Risanamento dai patogeni interni alle cellule	10
2.5. Produzione di semi sintetici	10
2.6. Microinnesti	11
3. Biotecnologie a supporto dei programmi di miglioramento genetico convenzionale	11
3.1. Conservazione del germoplasma	11
3.2. Salvataggio degli embrioni	12
3.3. Cambiamenti del livello della ploidia	12
3.3.1. Produzione di aploidi	12
3.3.2. Produzione di polipoidi	13
4. Biotecnologie nel miglioramento genetico non convenzionale	14
4.1. Variazione somaclonale spontanea e indotta in vitro	14
4.2. Ibridazione somatica	14
4.3. Trasformazioni genetiche	15
5. Caratterizzazione molecolare delle varietà	18
5.1. Le ragioni dell'analisi molecolare delle varietà	18
5.2. I marcatori molecolari	18
5.3. Estrazione del DNA	19
5.4. Analisi SSR	19
5.5. Analisi dei dati	20
6. Tracciabilità molecolare degli oli	20
Bibliografia	22

BIOTECHNOLOGY

Abstract

Recently, in industrialized and emerging countries a pressing demand has increased from consumers for more diversified and healthy products. In addition, it is increasing the sensitivity for the protection and conservation of the environment, by using healthy plants, more tolerant to biotic and abiotic stresses, thus requiring lower amounts of chemicals. For this reason, biotechnologies have been imposed with some success. Research has provided significant results in the field of in vitro cultures of cells and tissues, in the search for molecular markers (important research tools in supporting conventional breeding) and enzymes facilitating the extraction yields and degradation of primary and secondary products in many plant species, including the olive tree. In olive, the classical methods of genetic improvement have given rather scarce results up to now. At the same time, the need of new cultivars suitable for intensive cultivation demands for innovative strategies through the support of molecular and biotechnological techniques to speed up hybridisation methods by using "gene pools" method. This requires wide germplasm collections of both, cultivated and wild olive genotypes, and the knowledge of the olive genetic background. The present paper summarizes the state of art of the unconventional techniques (in vitro pollination, embryo rescue, dihaploids constitution, spontaneous and under selective pressure somaclonal variation, somatic hybridisation, germplasm conservation and genetic transformation). These techniques have provided good results in olive although they should be further encouraged with the aim to combine them with those derived from the classic genetics, genomics, biochemistry, cell biology, molecular and systems biology, to develop suitable strategies. All the aforementioned strategies can also be supported by the research on gene isolation and molecular markers used to characterize germplasm variability in order to improve the plasticity of cultivar behaviour and the quality of production. Suggestions concerning the use of both new molecular technologies and biotechnologies will be discussed.

BIOTECNOLOGIE

1. Introduzione

In questi ultimi decenni il sistema agricolo ha subito enormi cambiamenti a cui è seguito un aumento delle rese unitarie in gran parte dovute alle migliorate conoscenze relative alla fisiologia, alla chimica e alla meccanica, ma in misura più marcata al miglioramento genetico. Recentemente ci si è accorti che il solo aumento di produzione non soddisfa appieno le esigenze dell'uomo, sia dei paesi industrializzati sia di quelli emergenti, in quanto in modo sempre più pressante i consumatori richiedono prodotti più diversificati, più salubri e congiuntamente si assiste ad un aumento della sensibilità per la tutela e la conservazione dell'ambiente, in parte degradato in passato da scelte agronomiche e da un uso indiscriminato di prodotti chimici. Si è sentita l'esigenza di sviluppare nuovi metodi, processi e materiali adatti a soddisfare i rapidi mutamenti commerciali con la finalità principale di aumentarne l'efficacia e la rapidità di realizzazione. Per questo motivo le biotecnologie si sono imposte quasi prepotentemente, anche con un certo iniziale successo, nella speranza che avrebbero fornito anche in breve tempo risultati importanti, purtroppo nella realtà ostacolati per motivi etici e timori spesso ingiustificati nei confronti di una tecnologia potente come quella del DNA ricombinante (meglio conosciuta come "trasformazione genetica"). Per altre tecniche biotecnologiche la ricerca ha fornito significativi risultati, come nel settore delle colture in vitro di cellule e di tessuti, nella ricerca di marcatori molecolari (importanti strumenti di indagine a supporto del miglioramento genetico convenzionale) e nel campo enzimatico, per favorire le rese di estrazione e di degradazione di prodotti primari e secondari in molte specie vegetali, compreso l'olivo. Ancora oggi, quando si parla di biotecnologie, viene erroneamente posta l'attenzione da parte del cittadino proprio sulle tecniche della trasformazione genetica. La

definizione più chiara di questa tecnica è quella elaborata dalla EFB (*European Federation of Biotechnology*), che ben si adatta sia alle biotecnologie tradizionali che a quelle moderne: *"Integrazione delle scienze naturali, e inoltre di organismi, cellule, loro parti o analoghi molecolari, nei processi industriali per la produzione di beni e di servizi"*. In altre parole, è l'uso integrato della biochimica, della microbiologia e dell'ingegneria a fini industriali, sfruttando le proprietà dei microrganismi, delle cellule coltivate o parti di tali sistemi biologici. Le biotecnologie tradizionali sono impiegate dall'uomo da secoli per produrre alimenti tra i quali il vino, la birra, il pane e i formaggi, mentre quelle moderne abbracciano tutti i metodi di modificazione genetica basati sulle tecniche del DNA ricombinante, dalla fusione di cellule a tutte le innovazioni apportate ai processi biotecnologici tradizionali. Queste sono divenute quindi una nuova disciplina, imponendosi come una sfida inter-disciplinare. In agricoltura sono utili sia in campo vegetale che animale, al fine di migliorarne le qualità nutrizionali, la resistenza alle malattie, la produttività e la tolleranza ai fattori nocivi. I prodotti da esse derivati saranno immessi sul mercato in numero sempre crescente. Nel settore alimentare sono utilizzate per migliorare la qualità dei cibi e delle bevande, incluso il sapore e la salubrità, nonché per accelerare, con l'uso di enzimi, reazioni chimiche specifiche, per creare specifici convertitori molecolari (bioreattori) e per produrre sonde enzimatiche per dosaggi biologici. Di particolare interesse nel settore ambientale risulta la loro applicazione nello smaltimento dei rifiuti, incluse le acque di vegetazione dei frantoi oleari, area importante per i risvolti per la sostenibilità ecologica della coltura. In particolare oggi viene posto l'accento soprattutto sulla necessità di affiancare a quelli tradizionali nuovi processi per la conservazione e il riciclaggio dei materiali utili sia per l'industria alimentare, dei fertilizzanti e dei biocombustibili. Nel settore specifico della

olivicoltura e dell'elaiotecnica, soprattutto in Italia, finora si è guardato troppo al passato con uno spirito conservatore adattando materiali e tecniche tradizionali piuttosto che studiando e applicando nuovi metodi pur, in qualche caso, disponibili. E' necessario, quindi, recuperare il tempo perduto, dovuto spesso ad una certa deferenza nei confronti di questa specie, a causa della complessa tradizione storica, sociale e culturale che essa ha svolto nei secoli. Oggi non si può più pensare ad una moderna olivicoltura da reddito senza disporre di cultivar adeguate, cioè adatte alla meccanizzazione integrale delle operazioni colturali e allo stesso tempo capaci di assicurare una costante ed abbondante produzione di olio di elevata qualità. E' necessario pertanto uno sforzo da parte della comunità scientifica e sociale per unire tutte le tecniche e le conoscenze disponibili per progettare interventi attuabili nel breve e lungo periodo. Le biotecnologie possono contribuire in modo significativo con una vasta gamma di metodologie utili nei vari comparti: a) supporto ai programmi di miglioramento genetico convenzionale, b) miglioramento genetico non convenzionale, c) risanamento dai patogeni interni alle cellule, d) caratterizzazione varietale e) applicazione nell'industria estrattiva per aumentare le rese di olio, f) smaltimento e impiego delle acque di vegetazione dei frantoi, g) coltura di cellule in bioreattori per la produzione di metaboliti secondari. Alcune di queste biotecnologie si identificano o usano le colture in vitro, tecniche queste che si praticano in laboratorio in condizioni di sterilità, con lo scopo di produrre piante o parti di esse (germogli, radici, ecc.) da usare per varie finalità che vanno da studi in numerosi settori delle scienze alla produzione di piante da destinare ad impianti produttivi, al miglioramento genetico. Quest'ultimo si può realizzare attraverso modifiche delle cellule e successiva rigenerazione di piante. Le modificazioni o variazioni si possono indurre con mezzi fisici e chimici, cioè

con stress di varia natura, o con l'inserimento di sequenze note di DNA nudo o con l'aiuto di agrobatteri, sino alla fusione di cellule tra loro o di queste con organelli citoplasmatici.

La ricerca sulla coltura in vitro dell'olivo è iniziata oltre un quarto di secolo fa con l'obiettivo iniziale di moltiplicare su vasta scala quelle cultivar di difficile propagazione per talea, per le quali la moltiplicazione doveva avvenire obbligatoriamente attraverso l'innesto su semenzali, unici portinnesti per l'olivo allora disponibili. Oggi questo metodo viene proposto come tecnica commerciale di propagazione dell'olivo, in quanto permette di ottenere un elevato numero di piante, in spazi limitati e in tempi rapidi, svincolati dai cicli stagionali, in grado di soddisfare la richiesta di grandi quantitativi. Questa tecnica, tra l'altro, permette la produzione di piante esenti da patogeni di superficie e vascolari (funghi, batteri) e di quelli interni alle cellule (virus), facilitando altresì la commercializzazione di piante anche in paesi ove vigono severe leggi fitosanitarie. Inoltre, secondo le leggi vigenti, la presenza di qualsiasi virus in piante di olivo da vivaio ne impedisce la loro certificazione e, poiché la maggior parte delle piante di olivo adulte, incluse le piante madri che forniscono le talee o le marze, ne è affetta e considerato la impossibilità di risanarle attraverso la termoterapia, la certificazione risulta pressoché impossibile. La fortuita individuazione di piante o branche esenti dal patogeno e la coltura in vitro pertanto rimangono le uniche alternative. Tre sono le tecniche per produrre piante di olivo in vitro: a) moltiplicazione per stimolazione delle gemme preformate; b) organogenesi di germogli, c) embriogenesi somatica.

La prima tecnica usa, per iniziare la coltura in vitro, gemme preformate o parti di esse (*meristemi*), mentre le altre due impiegano teoricamente qualsiasi tipo di tessuto (foglie, radici, internodi, fiori, ecc.), in quanto sfrutta la *totipotenza* delle cellule vegetali, cioè la loro capacità di rigenerare nuove piante con la

formazione di embrioni somatici (*embriogenesi somatica*), i quali germinando originano nuove piante, oppure rigenerano gemme (*organogenesi*), le quali sviluppandosi originano i germogli che sottoposti a radicazione, danno vita a nuove piante.

E' possibile ottenere la rigenerazione di embrioni somatici o di gemme teoricamente da tutti i tessuti, ma quelli giovanili, cioè quelli di derivazione embrionale (embrioni zigotici immaturi o maturi e i semenzali nel loro stadio iniziale di vita) hanno una spiccata potenzialità rigenerativa. Tuttavia questi non vengono presi in alcuna considerazione per la produzione di piante per costituire oliveti, e solo eccezionalmente per i programmi di miglioramento genetico, perché le piante provenienti da embrioni zigotici (cioè da seme) sono diverse tra loro e diverse dalla pianta madre a causa della elevata eterozigosi dell'olivo. E' preferibile, pertanto utilizzare cellule di tessuti di cultivar conosciute, già di per sé di buon valore agronomico e commerciale, con la finalità di correggere eventuali difetti con l'aggiunta di geni che codificano per caratteri migliorativi oppure per bloccare o attenuare l'attività di quei geni che esprimono caratteri non desiderati. La scelta quasi obbligata dell'uso di cellule somatiche di tessuti maturi di varietà note di olivo, comporta spesso degli insuccessi legati appunto alla difficoltà di rigenerare piante, limitando così l'applicazione di queste tecnologie avanzate, oltre alla ingiustificata diffidenza da parte di molti cittadini per alcune di esse, una in particolare, cioè la tecnologia del DNA ricombinante.

2. Biotecnologie per la produzione di piante di qualità

2.1. Micropropagazione per *stimolazione di gemme preformate*

Questa tecnica rappresenta la classica metodologia per produrre germogli in vitro da destinare alla produzione di piante per impieghi vivaistici, previa radicazione degli stessi. Tuttavia può anche essere usata per produrre germogli da destinare a vari usi: studi di biochimica, di

fisiologia, per la produzione di prodotti secondari o da destinare ad impieghi per il miglioramento genetico.

La produzione dei germogli si attua in contenitori sterili con substrati di coltura, anch'essi sterili, composti, oltre che da acqua, da sali minerali, vitamine, idrati di carbonio, ormoni e un gelificante (generalmente agar-agar), necessario a sorreggere i germogli durante la loro crescita e moltiplicazione (fase di *proliferazione* dei germogli).

Per l'olivo, singolare risulta la tecnica con cui è stato formulato il substrato minerale. Si è dovuto infatti ricorrere, dopo molti insuccessi con l'uso di formulati minerali già noti, all'impiego della composizione minerale del seme, nel quale la concentrazione ed il rapporto tra i singoli elementi è ovviamente ideale, in quanto capace di sostenere la crescita iniziale della plantula. La composizione minerale dei semi di olivo si differenzia enormemente da quella delle specie che si sviluppavano bene sul substrato classico di Murashige e Skoog (MS). Il substrato formulato similmente ai semi di olivo ha un contenuto elevato in Ca, Mg S, Cu and Zn. Inoltre, nella formulazione sono stati aggiunti come sorgente di azoto, oltre ai noti formulati di NO_3^- e NH_4^+ , la glutammina, e come citochinina, quella naturale, la zeatina, (Rugini, 1984). Oggi il substrato è commercializzato dalla ditta olandese DUCHEFA sotto il nome *Rugini medium (-OM-Olive medium)*, che si è rivelato efficace non solo per specie appartenenti alla famiglia delle Oleaceae, ma anche per alcune specie ornamentali ed ortive. In questo substrato gli espianti mantengono integra la loro qualità nel lungo periodo, contrariamente a quanto osservato in altri substrati simili. L'olivo in vitro presenta una forte dominanza apicale per cui l'auspicato accestimento, cioè lo sviluppo di germogli da gemme basali dei germogli neoformati è piuttosto ridotto, ma si può migliorare con l'impiego, oltre che della *zeatina*, di un miscuglio di fitoregolatori costituito in

particolare da *metatopolin*, *thidiazuron*, *dikegulac* e *BAP*. Anche l'uso di sostanze complesse come 5% di acqua di cocco deproteinizzata in combinazione con BAP può in alcune cultivar sostituire la costosa zeatina (Pixe *et al.*, 2007). Come fonte di carbonio è preferibile il mannitolo al saccarosio, caratteristico composto delle Oleaceae (Leva *et al.*, 1994). Inoltre i contenitori, chiusi con coperchi che permettono scambi di aria, vanno posti in camere di crescita a temperatura di 23-24 °C, con fotoperiodo di 16 ore di luce, per circa 30-35 giorni, dopodiché i germogli, previo spezzettamento in segmenti uninodali, vanno trasferiti in substrato nuovo al fine di produrne degli altri.

L'uso di substrati solidi comporta tuttavia un alto impiego di manodopera in confronto a quelli liquidi, ma purtroppo quest'ultimi, se costantemente a contatto con i germogli, inducono il fenomeno della “*vitrificazione*”, che consiste in un eccessivo accumulo di acqua nei tessuti che li rende friabili come il vetro, quindi inutilizzabili. Tuttavia se i germogli vengono a contatto con il liquido in modo discontinuo (*immersione temporanea*), cioè immersi in substrato liquido per alcuni minuti ogni qualche ora, in apparati idonei, questi si sviluppano normalmente, consentendo così di ridurre i costi di produzione.

Particolare attenzione va fatta nella scelta del materiale vegetale di partenza. E'consigliabile usare gemme di rami in fruttificazione, che garantiscono l'entrata precoce in fioritura in campo delle piante da esse derivate. In pratica si usano espunti nodali con gemme vegetative prelevate a fine inverno o durante la fase vegetativa. L'impiego di gemme intere o parte di esse, solitamente utilizzate in altre specie, che avrebbero il vantaggio di permettere una facile eliminazione dei microrganismi (funghi e batteri) è poco praticabile in olivo, perché queste imbruniscono rapidamente. La eliminazione di microrganismi di superficie si effettua con l'impiego di una combinazione di HgCl₂ e

ipoclorito di sodio e un pre-lavaggio in una miscela di acqua e PPM (*Plant Preservative Mixture* - DUCHEFA). Nel caso in cui non si riesca ad eliminarli completamente, si può aggiungere il PPM nel substrato per diverse subcolture, fin quando questi non scompaiono. Tuttavia se durante la fase di proliferazione la coltura risulta contaminata e i germogli non sono in grado di controllare i microrganismi efficacemente, si può procedere ad una seconda decontaminazione dei germogli sotto vuoto (con pompa ad acqua) e al prelievo con lo stereoscopio dell'apice o, meglio, del meristema. I meristemi di queste gemme, contrariamente a quelli delle gemme provenienti dall'esterno, non imbruniscono, in quanto sono già ambientati in vitro ed evolveranno facilmente in germoglio, se adagiati in blocchetti di substrato agarizzato posti in piastre Petri o in *multiwells*.

Per alcune cultivar, al termine della fase di proliferazione, se non sono ben sviluppati in altezza è consigliabile aggiungere al termine della subcoltura uno strato di substrato di proliferazione liquido con l'aggiunta di GA₃ e putrescina, per predisporli meglio alla successiva fase di radicazione. La fase di radicazione può essere condotta sia *in vitro* che *in vivo*. In entrambi i casi le microtalee sono costituite preferibilmente da germogli apicali. Nel primo caso vengono trasferite in substrato di radicazione agarizzato con un basso contenuto di sali minerali (Bourgin e Nitsch, 1967) o metà concentrazione di sali di OM, addizionato di auxina, preferibilmente NAA (0,5-1 mg/l), oppure in substrato privo di auxina, ma le micro talee vengono immerse per alcuni secondi in una soluzione di auxina ad alta concentrazione (100 mg/l). In ogni caso se possibile è preferibile effettuare la radicazione *ex-vitro*, già sperimentato con successo per alcune cultivar, tra le quali la cv Chemlal (Yakoub-Bougdal *et al.*, 2007), e le cv italiane quali Frantoio, Maurino o Coratina, per le quali la luce continua durante tale fase risulta essenziale (Leva, 2011). In questo

caso la coltura in vitro serve a produrre ingenti quantitativi di germogli in breve tempo, ad eliminare i microrganismi di superficie e vascolari, ed eventualmente quelli interni alle cellule (virus). L'impiego della Putrescina in molti casi migliora ed anticipa il processo di rizogenesi, sia in vitro che ex-vitro (Rugini, 1992), la quale avrebbe un effetto nella fase di induzione per la produzione di perossido di idrogeno in seguito alla sua degradazione o passaggio ad altra poliammide (Rugini *et al.*, 1997). La migliore risposta alla rizogenesi sembra coincidere con la stagione primaverile, sebbene i germogli crescono in vitro continuamente nell'arco dell'anno (Mencuccini, 2003). In alternativa ad un iniziale periodo di una settimana al buio degli espianti nel substrato di radicazione, che riduce la vitalità degli stessi, si può colorare di nero il substrato in modo che la

sola parte basale sia protetta dai raggi luminosi (Rugini *et al.*, 1987; Rugini *et al.*, 1993).

Per accelerare la successiva fase di *acclimatamento* e la ripresa vegetativa delle piantine (Figura 1) può essere utile dopo la comparsa delle prime radici nei contenitori, aggiungere uno strato liquido di 1 cm circa dello stesso substrato minerale con mannitolo o saccarosio (4-5%), putrescina (160 mg/l), GA3 (40-50mg/l), scoperchiando di tanto in tanto i contenitori.

Le piantine vengono allevate in vasetti con terriccio costituito prevalentemente a base di torba. Queste generalmente crescono più velocemente di quelle derivate da talea, entrano in produzione alla stessa età di quelle propagate con i sistemi tradizionali, purché derivino da gemme di rami in fruttificazione e a condizione che le piante siano lasciate inizialmente crescere liberamente, sia in serra che a dimora.

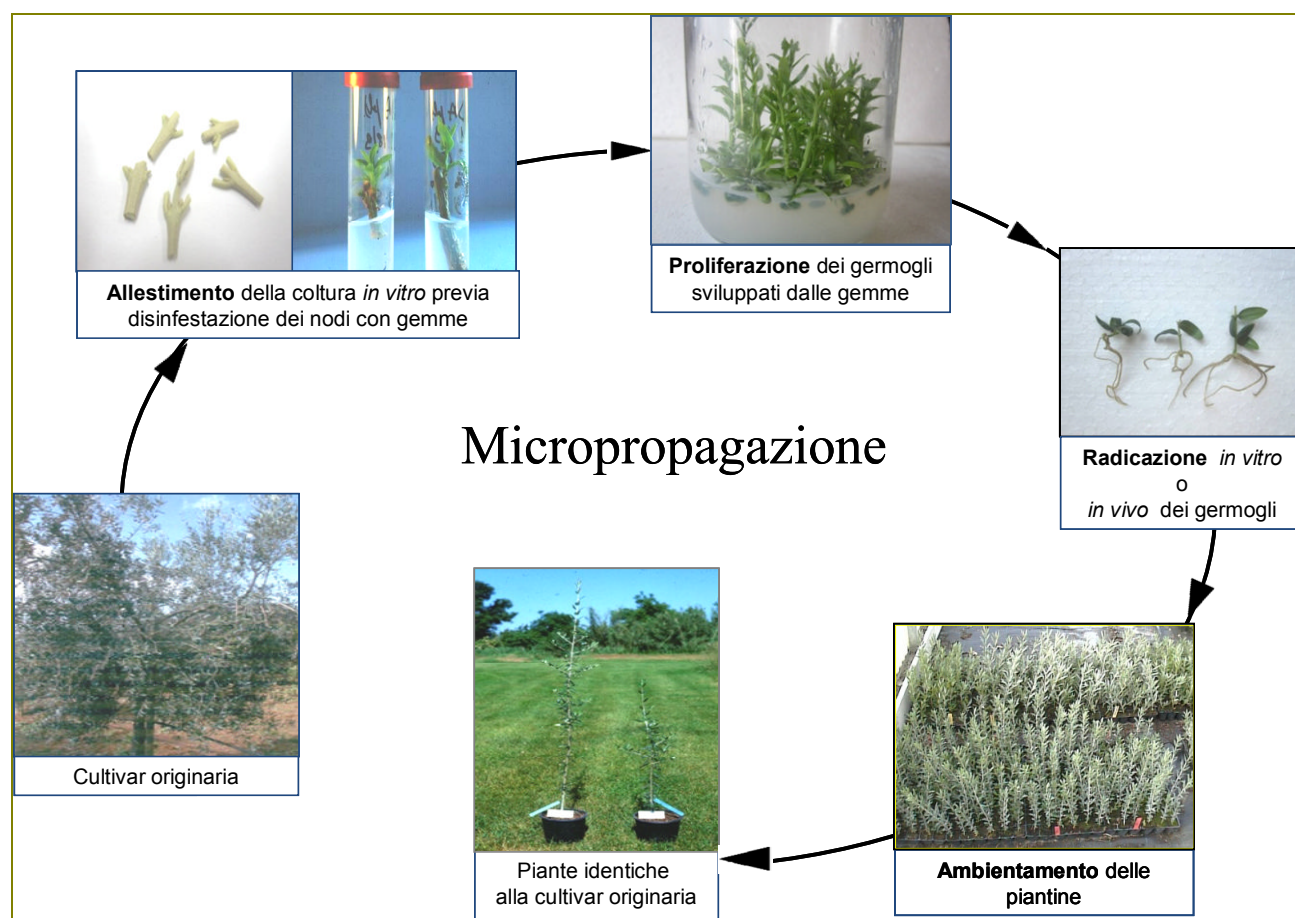


Figura 1.

Qualsiasi potatura energica infatti potrebbe stimolare la schiusura di gemme avventizie dalla parte basale dell'albero, che essendo notoriamente più giovanili, possono dare origine a branche principali altrettanto giovanili, col risultato di un ritardo nella entrata in fruttificazione. E' stato dimostrato che le piante micropropagate della cv. Arbequina mostrano una struttura della chioma migliore di quelle propagate per talea, con rami più numerosi e più uniformi e quindi meglio adatti alla raccolta dei frutti in continuo in impianti superintensivi. Presentano inoltre radici meglio distribuite attorno al tronco e con calibro più uniforme. Anche se la produzione iniziale di olive potrebbe risultare inferiore rispetto a quelle derivate da talea, essa viene largamente compensata negli anni a seguire (Bastianelli, 2011).

Sebbene sia stato dimostrato che moltissime decine di cultivar siano state propagate con successo con questa tecnica su scala industriale (Zuccherelli e Zuccherelli, 2000) e con notevoli vantaggi rispetto alla talea, inclusa la possibilità di moltiplicare cultivar di difficile rizogenesi e a costi inferiori, l'olivo viene ancora propagato prevalentemente per talea e per innesto su semenzale. Ciò è dovuto al fatto che questi metodi richiedono una minore specializzazione degli operatori e perché ancora persiste la richiesta di piante innestate su semenzale da parte degli agricoltori, in quanto ritenute più adatte per zone ventose e per suoli molto sciolti. Pertanto le piante prodotte in vitro da laboratori commerciali italiani sono destinate quasi esclusivamente al mercato estero.

A parte un leggero ringiovanimento osservato in alcune cultivar, senza tuttavia compromettere la produzione in campo, non sono emersi casi di difformità genetica delle piante micropropagate, sia in seguito a test molecolari che ad osservazioni agronomiche e morfologiche. Si può parlare pertanto di *variazione epigenetica* ma non di *mutazione genetica*.

Per la produzione di piante ad uso vivaistico le altre due tecniche di micropropagazione, l'*organogenesi* e l'*embriogenesi somatica*, non vengono usate in quanto basate sulla rigenerazione *ex-novo* di gemme da tessuti indifferenziati. La rigenerazione dai tessuti maturi di cultivar di olivo infatti è in primo luogo molto difficile, e in aggiunta, poiché alcune cellule potrebbero mutare, le piante da esse derivate risulterebbero diverse dalla pianta donatrice. Questo fenomeno va sotto il nome di *variabilità somaclonale*, tanto utile per aumentare la variabilità genetica quanto sfavorevole per la produzione vivaistica, per la quale si richiede la *clonazione*, cioè piante tutte uguali tra loro e uguali alla pianta madre.

2.2. Micropropagazione per *organogenesi*

L'*organogenesi* è un processo attraverso il quale le cellule di un qualsiasi tessuto sono in grado di differenziare qualsiasi organo (radici, fiori, gemme, ecc.). Ovviamente dal punto di vista pratico interessa la rigenerazione di gemme direttamente dalle cellule del tessuto (*organogenesi diretta*), oppure dalle cellule di un callo (*organogenesi indiretta*). In seguito i germogli originati da queste gemme avventizie vengono sottoposti a radicazione (*organogenesi radicale*), allo stesso modo di quelli derivati dalle gemme ascellari. Generalmente una sola cellula è coinvolta nel processo rigenerativo, perciò attraverso questa tecnica si facilita l'isolamento di genotipi stabili da tessuti chimerici (tessuti formati da cellule geneticamente diverse).

L'*organogenesi*, diretta o mediata da callo, è stata ottenuta in olivo sia da tessuti d'origine zigotica che da tessuti maturi di cultivar (Mencuccini e Rugini, 1993). La frequenza d'*organogenesi* da frammenti di cotiledoni prossimali all'asse embrionale di semi maturi e sezioni d'ipocotili è in genere molto elevata, anche se genotipo dipendente. E' stato possibile anche rigenerare gemme avventizie da tessuti di piccioli di foglie derivate da germogli proliferati *in vitro* di cultivar, sebbene in frequenze basse, non superiori al 20-

30%, in funzione della cultivar, della posizione della foglia sul germoglio, del substrato utilizzato, nonché della qualità dei germogli durante la fase di proliferazione. Correntemente l'organogenesi non può essere considerata un metodo applicabile per la moltiplicazione dell'olivo, perché laddove la frequenza è molto alta come in tessuti zigotici, le piante derivate non riproducono le caratteristiche della pianta madre a causa della nota eterozigosi dell'olivo, mentre dai tessuti maturi delle cultivar l'efficienza di rigenerazione è troppo bassa, e in ogni caso si corre il rischio di incappare nella *variazione somaclonale*. Questa tecnica invece è essenziale come primo step per ottenere l'embriogenesi somatica in olivo (Figura 2).

2.3. Micropropagazione per *embriogenesi somatica*

Similmente alla organogenesi, l'embriogenesi somatica è un processo di rigenerazione che conduce però alla formazione di un embrione, cioè di una pianta intera. Nell'olivo l'embriogenesi somatica è stata ottenuta con successo da diversi tessuti, sia di origine zigotica che da tessuti materni maturi (Rugini e Caricato, 1995). L'embriogenesi somatica da tessuti maturi di cultivar è ancora difficile da conseguire, tuttavia per due cultivar, "Canino" e "Moraiole" è stata ottenuta mediante una originale strategia chiamata "sistema della doppia rigenerazione" (Figura 2).

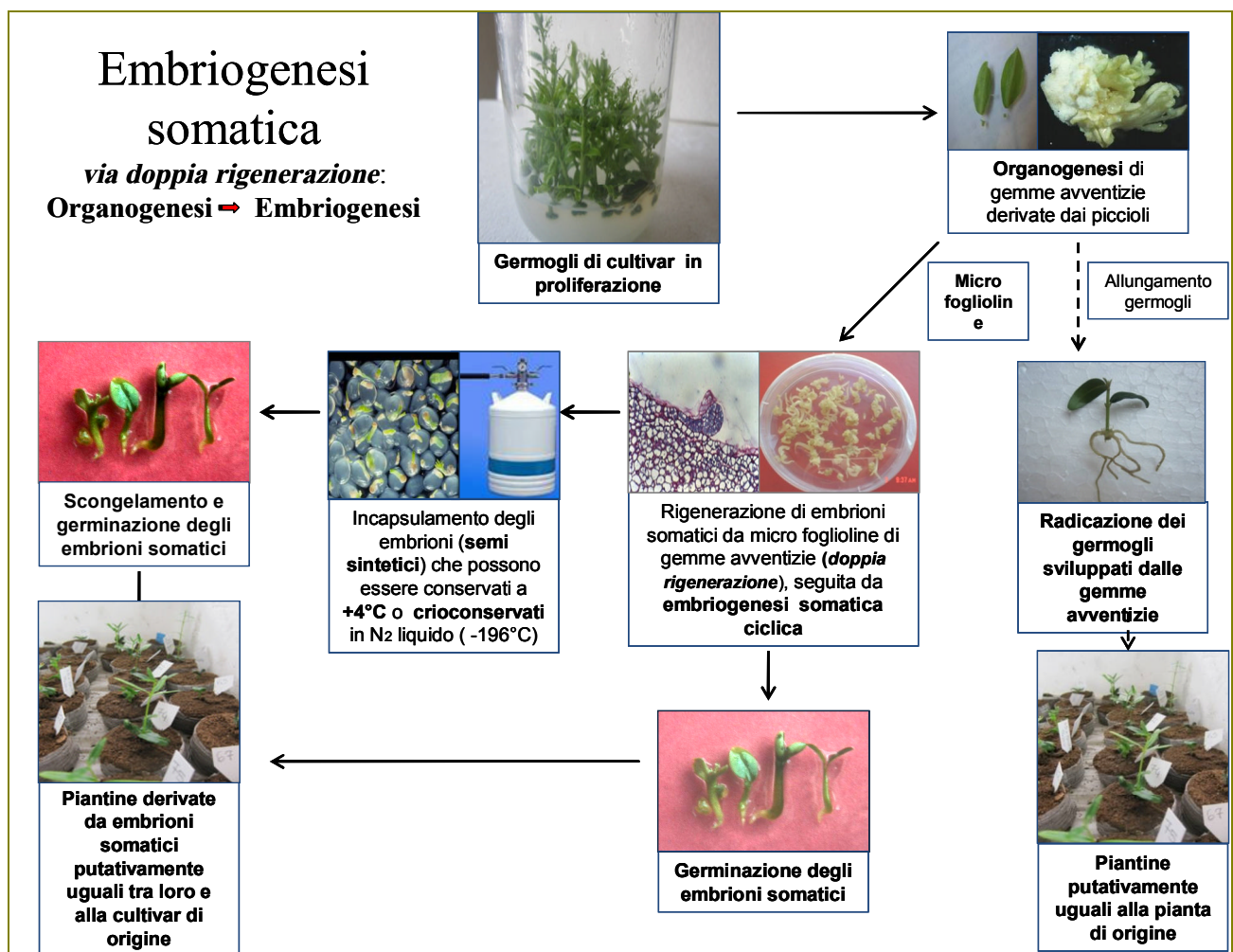


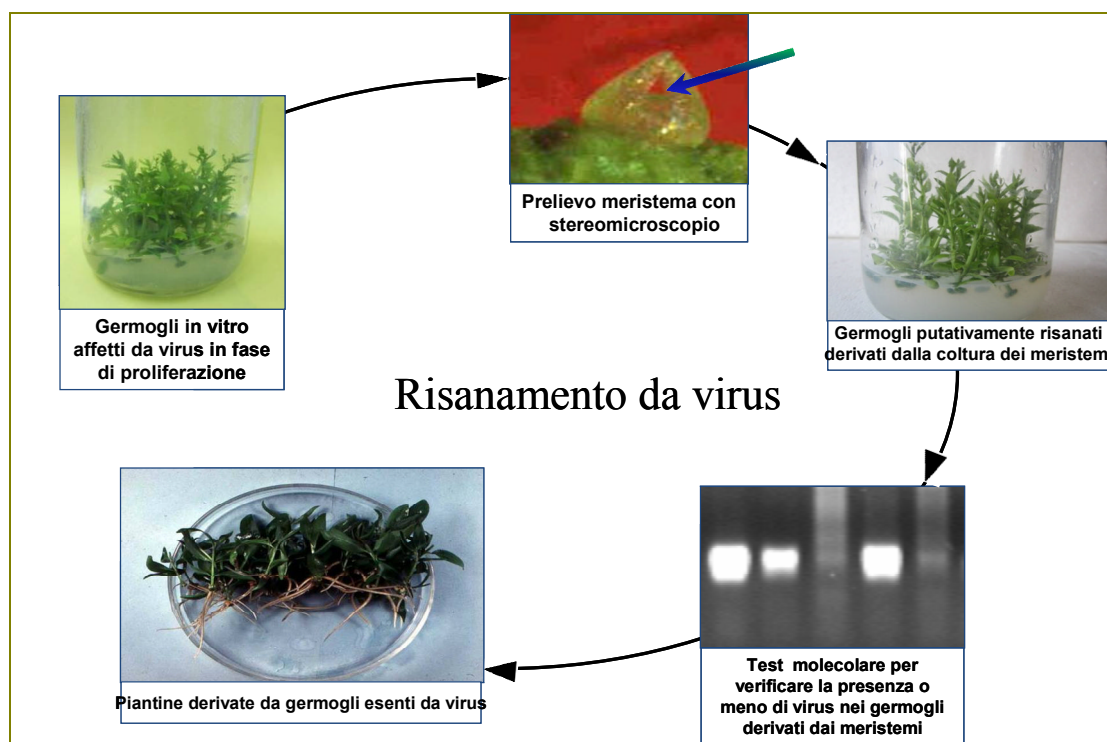
Figura 2.

Essa consiste nel rigenerare prima gemme avventizie dai piccioli fogliari di germogli cresciuti *in vitro* e poi subcolturare le foglioline di queste gemme appena visibili in un mezzo appropriato fino alla comparsa di una massa proembrionale, riconoscibile per la superficie liscia e porosa e per il colore giallognolo, dalla quale si differenziano gli embrioni. Una volta prodotto il primo embrione, dalla sua epidermide se ne differenzieranno degli altri, instaurandosi così un embriogenesi ciclica di durata indefinita, anche in un substrato con bassissime dosi di citochinine o addirittura privo di ormoni. La percentuale di embrioni che converte in piante è generalmente bassa, gli embrioncini allungano facilmente la radichetta ma con più difficoltà sviluppano l'epicotile.

2.4. Risanamento dai patogeni interni alle cellule

La micropropagazione, come già detto, oltre ad impieghi vivaistici e per la fornitura di materiale da impiegare nel miglioramento genetico, consente l'eliminazione di patogeni endogeni attraverso la coltura dei meristemi. Tra l'altro, è

opportuno ricordare che, attualmente, secondo la vigente legislazione, non è possibile certificare le piante di olivo se queste non sono esenti da qualsiasi virus. E' molto difficile trovare piante esenti da tale patologia, sebbene in pochi casi la malattia si può manifestare in modo virulento (Marte *et al.*, 1985), perché la maggior parte delle piante ne sono affette (Martelli *et al.*, 1995; Faggioli *et al.*, 2005). E' noto che in tutte le piante il meristema (apice di gemma) di 0,1-0,2 mm, è normalmente esente da patogeni interni (virus in genere), per cui il distacco, con l'ausilio di un stereomicroscopio e un bisturi, e la coltura in un mezzo adatto, sia esso artificiale (substrato minerale) che naturale (portainnesto sano: - *microinnesto*) origina un germoglio sano. La coltura dei meristemi in olivo non è realizzabile, almeno per ora, se essi vengono prelevati da piante in campo, mentre se prelevati da germogli già ben ambientati *in vitro*, non imbruniscono e sviluppano un germoglio se adagiati in piccoli blocchetti di substrato di proliferazione solido (agarizzato).



Recenti studi in collaborazione con il Dipartimento di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Bari (*in litteris*), hanno dimostrato che è possibile risanare l'olivo con questa tecnica. Le piante risanate con questo metodo sono in campo da oltre 7 anni, presso l'Università degli Studi della Tuscia, per osservazioni sul comportamento bio-agronomico.

2.5. Produzione di *semi sintetici*

Con questa denominazione si intendono embrioni somatici avvolti (incapsulati) da un substrato solido come l'alginato di calcio o altri tipi di polisaccaridi, al fine di conferire loro una protezione, utile per migliorare la loro conservazione in azoto liquido (-196°C) o in frigo (+4 °C) o per migliorare la conversione in pianta. Lambardi et al. (2000) e Lambardi e Rugini (2003) hanno riportato il protocollo di congelamento in azoto liquido per gli embrioni somatici della cv. Canino, incapsulati in alginato, sebbene con un basso tasso di conversione in piante. Tuttavia considerata la difficoltà in olivo di ottenere embriogenesi somatica da tessuti maturi, si è tentato con successo di surrogare questa tecnica con l'incapsulamento di espianti uninodali con gemme delle cultivar, prodotte in vitro, con un soddisfacente ricrescita delle gemme dopo la conservazione a +4°C (Micheli *et al.*, 2007).

2.6. Microinnesti

Sono innesti con espianti di piccole dimensioni da 2-5 µm ad alcuni centimetri a seconda dello scopo prefissato. Se l'obiettivo è produrre piantine sane da piante virostate, si usa il meristema, il quale dopo essere stato espiantato dalla cultivar infetta, si posiziona a contatto delle cellule cambiali di un portinnesto sano propagato in vitro. In olivo anche in questo caso i meristemi debbono essere necessariamente

prelevati da germogli micropropagati *in vitro* per evitare l'imbrunimento con la conseguente morte. In specie diverse dall'olivo questa tecnica è usata quando i meristemi non riescono a sviluppare in germoglio nei substrati sintetici, perché imbruniscono o formano callo. Qualora invece lo scopo fosse quello di ringiovanire un germoglio di una varietà di olivo per predisporlo meglio alla coltura in vitro, si usano germogli uni-nodali innestati a spacco su un portainnesto molto giovanile, normalmente un semenzale germinato *in vitro* in condizioni asettiche (Troncoso *et al.*, 1999). Questa tecnica si può usare anche per accelerare l'entrata in fioritura di un nuovo genotipo giovanile, ma in questo caso si userà un portainnesto maturo al posto di uno giovanile.

3. Biotecnologie a supporto di programmi di miglioramento genetico convenzionale

Anche il miglioramento genetico tradizionale si serve di colture in vitro, cioè delle tecniche di base della micropropagazione. Queste, oltre alla propagazione rapida dei nuovi genotipi, si usano per la conservazione del germoplasma, per il salvataggio degli embrioni, derivati da incroci tra parentali non perfettamente compatibili, nonché per la costituzione di genotipi con diverso numero di cromosomi.

3.1. Conservazione del germoplasma

La conservazione di genotipi portatori di *pool* di caratteri di pregio, rappresenta una indiscutibile necessità per evitare la loro scomparsa a causa dell'attuale tendenza a coltivare poche varietà, in genere quelle più produttive o quelle che si adattano meglio all'ambiente in senso lato e anche a causa dell'abbandono di aree coltivate che vengono assorbite dal bosco. In olivo la conservazione dei semi ha poco senso essendo una specie con elevato grado di eterozigosi, normalmente propagata vegetativamente. Per

contro, la conservazione delle piante in campo (*in situ*, *ex farm*) comporta elevati costi e soprattutto il rischio di perderle per eventuali condizioni ambientali avverse. Pertanto la conservazione *in vitro* (*ex situ*) di parti vegetative potrebbe essere una valida alternativa che offre anche altri vantaggi: *i*) elevata velocità di moltiplicazione di piante al momento della necessità, *ii*) necessità di spazio molto limitata, e *iii*) possibilità di mantenere libere le piante da patogeni interni e di superficie. Questa tecnica è molto promettente e si basa sulla conservazione dei germogli *in vitro* a basse temperatura (+4 °C) in substrati che rallentano la loro crescita e sulla conservazione in N₂ liquido a -196°C (*crioconservazione*). Nel primo caso è stato possibile conservare per 8 mesi sullo stesso substrato i germogli di alcune cultivar di olivo, al buio, nel secondo sono state applicate con successo sia la procedura tradizionale di crioconservazione che quella di più recente introduzione che consiste in un pre-trattamento degli espianti con la soluzione vetrificante per favorire la solidificazione amorfa dell'acqua all'interno delle cellule per evitare la formazione di cristalli acuminati, deleteri per le cellule.

3.2. Salvataggio degli embrioni

In certi incroci, in particolare quando non c'è una completa compatibilità sessuale tra i parentali, l'embrione che ne risulta rischia di non raggiungere la maturazione. La coltura in vitro dell'embrione immaturo in un substrato adeguato, sin dalle prime divisioni dello zigote, può favorire lo sviluppo. Questa tecnica è stata applicata con successo in olivo utilizzando embrioni immaturi originati da incroci tra varietà iraniane. E' da considerare molto utile in previsione di un miglioramento genetico mirato basato sul metodo dei "*gene pools*" (Rugini *et al.*, 2011), cioè l'applicazione di una procedura che prevede di prendere in esame tutti i genotipi (compatibili, parzialmente o non compatibili tra loro), incluse le varie specie di *Olea*, nonché tutte

le tecniche, convenzionali e non convenzionali disponibili. Ciò comporta una accurata raccolta e conservazione dei genotipi, la loro caratterizzazione molecolare e morfo-fisiologica e la catalogazione.

3.3. Cambiamenti del livello di ploidia

Ogni specie in natura possiede un determinato numero di cromosomi. L'olivo coltivato è diploide e ne possiede 46 ($2n=46$), pertanto il suo polline e l'ovocellula ne presentano la metà ($n=23$). In qualche specie le piante possono produrre piante aploidi dallo sviluppo dell'ovocellula, che normalmente sono sterili. In laboratorio è possibile costituire sia piante *aploidi* che piante *polipoidi*, cioè con un numero superiore di cromosomi rispetto a quello di base.

3.3.1. Produzione ed uso degli aploidi

La disponibilità di genotipi *omozigoti*, per i programmi di miglioramento genetico e per gli studi di genomica, rappresenterebbe uno strumento di grande importanza. Questi si ottengono in genere con ripetute autofecondazioni dei discendenti, in genere 5-8 volte. In olivo, purtroppo, a causa della frequente auto-sterilità e la lunga fase giovanile, l'ottenimento di linee omozigoti per questa via risulta molto difficile. Dalla coltura in vitro del polline immaturo, preferibilmente allo stadio mononucleato, isolato dalle antere oppure insieme a queste o, in alternativa, dalla coltura di ovuli allo stadio in cui contengono l'ovocellula aploide, è possibile ottenere tessuti aploidi dai quali possono essere rigenerate piante aploidi. Queste piante di per sé non hanno alcun impiego pratico perché sterili, tuttavia assumono una grande utilità negli studi di carattere genetico, in quanto in seguito al raddoppiamento del numero cromosomico con particolari sostanze chimiche si possono ottenere piante *di-aploidi*, cioè piante omozigoti, molto ricercate per attuare incroci programmati e per impieghi nel sequenziamento

del genoma. Questi prodotti chimici, quali la colchicina o l'orizalina, hanno effetto antimitotico sulla cellule, bloccando la mitosi allo stadio di metafase per la mancata genesi del fuso mitotico, per cui le cellule raddoppiano il numero dei cromosomi. Per ottenere i triploidi ($3n$) si potrebbe ricorrere alla rigenerazione di piante dall'endosperma, che nelle angiosperme è triploide. Finora in olivo non sono stati riportati lavori che attestano la produzione di questo genere di piante, sebbene siano stati osservati pro-embrioni somatici da microspore della cv. Arbequina. Le piante aploidi si riconoscono perché più deboli, non fioriscono o, se fioriscono, non hanno microspore vitali, e presentano un numero dimezzato di organelli, ben visibili con il microscopio nelle cellule stomatiche. Il test più sicuro per verificare lo stato di ploidia è quello relativo al conteggio dei cromosomi, in genere in cellule di apici radicali, sebbene l'uso di un citoflorimetro a flusso, che in pochi minuti è in grado di misurare la quantità di DNA nei nuclei di migliaia di cellule, è da ritenersi più pratico. La verifica dello stato di ploidia e dell'omozigosi può essere fatta anche attraverso l'impiego di marcatori molecolari co-dominanti, nei quali siano visibili le diverse forme alleliche, come gli SSR e gli SNP. In caso di omozigosi o aploidia si vedrebbe esclusivamente uno solo dei due alleli normalmente visibili in individui diploidi.

3.3.2. Produzione poliploidi

In specie arboree i casi di poliploidia (piante con cellule aventi un numero di cromosomi superiore a quelli di base) sono abbastanza frequenti. Anche nel genere *Olea* se ne conoscono, come è il caso dell'*Olea europaea* subsp. *cerasiformis* ($4n$) e dell'*Olea europaea* subsp. *maroccana* ($6n$), (Besnard et al., 2008) mentre nell'olivo coltivato (*Olea europaea* subsp. *europaea*) non se ne conoscono.

Tuttavia Rugini ed al. (1996) sono riusciti ad ottenere piante triploidi ($3n$) e tetraploidi ($4n$) da piante delle cultivar Leccino e Frantoio *mixoploidi* (piante aventi cellule con diversi numero di cromosomi) ottenute attraverso l'irraggiamento con radiazioni gamma. Le piante triploidi sono state ottenute dalla germinazione dei semi contenuti in frutti di maggiori dimensioni prodotti dalle piante mixoploidi (sicuramente originati da ovocellule con numero di cromosomi raddoppiato). Le piante tetraploidi hanno avuto origine da una selezione operata in laboratorio dai germogli mixoploidi durante la fase di moltiplicazione in vitro, distinguibili da foglie più larghe e più spesse. Le piante tri- e tetraploidi sono in generale più precoci nella entrata in fioritura, sono di taglia più ridotta, producono meno fiori ma frutti molto più grandi rispetto alle piante diploidi. Attualmente le piante $4n$ sono in fase di sperimentazione sia come cultivar che come portinnesto, in virtù di possedere un ridotto accrescimento, se auto-radicate, ma anche in virtù della loro capacità di ridurre la vigoria del nesto (Figura 4). Le piante $3n$, perché derivate da seme, sono ancora in fase giovanile.



Figura 4. Piante innestate a 5 anni dall'impianto. Fila di sinistra: cv Canino innestato su se stesso, Fila di destra: cv Canino innestato su "Leccino" tetraploide ($4n$). Da notare la differenza di vigoria, desumibile anche dalla quantità di legno asportato con la potatura (Campo sperimentale dell'Università degli Studi della Tuscia).

4. Biotecnologie nel miglioramento genetico non convenzionale

4.1. Variazione somaclonale spontanea o indotta *in vitro*

Sono tecniche recenti che sono entrate a far parte del miglioramento genetico e che, se sviluppate adeguatamente, potrebbero nel breve futuro contribuire ad accelerare e/o potenziare i programmi di miglioramento genetico.

La variabilità somaclonale è quella variabilità che si può osservare in piante rigenerate *in vitro*, in genere da cellule del callo. Le variazioni si generano durante la divisione cellulare, dovute forse alle condizioni non propriamente naturali del *vitro*, oppure le cellule possono aver già subito variazioni prima che i tessuti vengano posti *in vitro*. Le variazioni possono essere di natura *epigenetica* che *genetica*. La prima è dovuta alla espressione del/i gene/i e può essere reversibile, mentre la seconda è conseguente ad una alterazione del gene stesso, è permanente e viene ereditata nei discendenti. Finora in olivo non sono stati segnalati casi di variazione somaclonale *in vitro*, perché pochissimi lavori sono stati fatti sulla rigenerazione da callo. Disporre di un metodo efficiente di rigenerazione, per esempio una rigenerazione attraverso embriogenesi somatica ciclica, consentirebbe di sfruttare artificiosamente questo fenomeno sottoponendo le cellule a stress di natura biotica o abiotica. Gli stress infatti indurrebbero le cellule a mutare per poter sopravvivere all'agente stressante, oppure quest'ultimo opera la selezione di quelle cellule in tessuti che già erano capaci di sopravvivere all'agente stressante prima di essere poste *in vitro*. Per esempio se si volessero rigenerare piante mutate per la resistenza a patogeni (*stress biotico*), i calli o tessuti morfogenetici, cioè capaci di rigenerare gemme o embrioni somatici, potrebbero essere sottoposti a pressioni selettive con filtrati culturali (cioè il substrato filtrato di coltura in cui sono cresciuti i microrganismi

funghi) di patogeni, oppure tossine allo stato puro dei patogeni stessi. Mentre, se si volessero produrre piante resistenti alla salinità (*stress abiotico*), la rigenerazione dovrebbe avvenire in presenza di alte concentrazioni di cloruro di sodio. In alcuni casi, tuttavia, le piante rigenerate da cellule resistenti *in vitro* ad un determinato stress, non sempre manifestano la stessa resistenza *in vivo*. Buone prospettive si profilano per migliorare alcune cultivar di olivo, almeno per quelle in grado di produrre embrioni somatici ciclicamente.

4.2. Ibridazione somatica

Questa tecnica è usata per produrre ibridi a partire da cellule della stessa specie o appartenenti a specie diverse, che in condizioni normali non avrebbero possibilità di unirsi sessualmente. La tecnica consiste nella rimozione della parete cellulare con enzimi per formare *protoplasti*, cioè cellule con la sola membrana cellulare, in una soluzione isotonica, per evitare shock osmotici. Questi possono essere preparati da cellule somatiche, ma anche da pollini. Successivamente si procede alla fusione dei protoplasti provocando un intimo contatto tra loro con prodotti chimici (poli-etilen-glicole e ioni calcio) o con un campo elettrico (*elettrofusione*), che favoriscono la rottura delle membrane nel punto di contatto e quindi la fusione del contenuto citoplasmatico. I nuclei delle cellule ibride così ottenute possono a loro volta fondersi oppure no. Dopo la fusione le cellule ibride riformano la parete cellulare ed iniziano a dividersi formando un callo. Dalle cellule del callo è possibile rigenerare germogli o embrioni e quindi piante, che vengono chiamate *ibridi somatici*. Non potendo guidare la fusione solo tra protoplasti dei genotipi diversi, è necessario usare genotipi particolari, per permettere successivamente la selezione dei soli ibridi somatici. Vi sono varie tecniche tra le quali l'impiego di genotipi ognuno dei quali resistente ad un diverso antibiotico. Dopo l'avvenuta

fusione si opera la selezione dell'ibrido in un terreno di coltura contenente entrambi gli antibiotici, ove sopravvivranno solo gli ibridi perché contenenti i geni di resistenza ad entrambi. Ogni ibrido potrebbe risultare diverso dagli altri, perché ognuno può integrare o escludere casualmente i cromosomi, per cui l'auspicato ibrido con le caratteristiche intermedie dei due genotipi usati rimane molto spesso solo un desiderio. Tuttavia la fusione di protoplasti con organelli cellulari (cloroplasti e mitocondri) che possiedono interessanti geni (sterilità, resistenze a malattie, ecc.) ha già avuto in altre specie un buon successo. Questi ibridi, chiamati ibridi citoplasmatici (*ci-ibridi*), si realizzano con la fusione tra protoplasti di due genotipi diversi, ai quali ad uno è stato inattivato il nucleo e all'altro gli organelli. Pertanto l'ibrido sarà composto dal nucleo di un genotipo e dagli organelli dell'altro. L'ibridazione somatica nell'olivo non è stata ancora tentata, sono stati prodotti solo risultati preliminari sull'isolamento dei protoplasti e da questi la formazione di qualche micro-callo.

4.3. Trasformazioni genetiche

La trasformazione genetica consiste nell'inserire nel DNA delle cellule di un genotipo uno o pochi geni, i quali andranno a far parte permanentemente del loro genoma. Lo scopo è di far produrre loro nuove proteine o quantità maggiori di quelle già esistenti, oppure di inibire o ridurre la produzione di quelle indesiderate, bloccando l'espressione dei geni. I geni utilizzati possono appartenere alla stessa specie vegetale (in questo caso si parlerà di piante *cisgeniche*) o a genotipi molto lontani botanicamente o addirittura animali o sintetici (in questo caso si parlerà di piante *transgeniche*). Generalmente, a parte casi particolari, è conveniente potenziare l'espressione di geni presenti nella pianta, perché solitamente sono presenti, utilizzando *promotori* più efficienti di quelli connessi al gene di cui si vuole migliorare l'espressione. Comunemente

per piante transgeniche viene usato impropriamente l'acronimo OGM che significa Organismi Geneticamente Modificati, ma tutti gli organismi coltivati oggi sono il frutto di modifiche più o meno drastiche operate dall'uomo (incroci tra varietà o tra specie o tra piante coltivate e quelle selvatiche, modifiche con radiazioni, ecc.).

La trasformazione genetica presenta enormi potenzialità per la realizzazione di specifici programmi di miglioramento genetico, consentendo di superare molti dei limiti delle tecniche tradizionali, oltre al fatto che può permettere la correzione di uno o più difetti (esempio suscettibilità ad un patogeno) di una cultivar valida dal punto di vista economico ed agronomico, senza sconvolgere il suo genoma, contrariamente a quanto accade con la tecnica dell'incrocio. Recentemente, coloro che avversano gli OGM contrappongono a questa la tecnologia MAS (Selezione Assistita con Marcatori molecolari), la quale è senza dubbio molto utile, perché consente di selezionare in modo molto efficiente piante che contengono specifici caratteri nell'ambito di ciascuna specie, ma è semplicemente uno strumento di selezione nell'ambito di una variabilità naturale o generata dall'uomo, mentre l'uso di OGM, contrariamente a quanto alcuni credono, consente di generare nuova variabilità, proprio perché permette di inserire nuovi caratteri o di modificarli nell'ambito delle specie coltivate.

Ci si può chiedere perché si ricorre alla ingegneria genetica in olivo, peraltro osteggiata da una parte dell'opinione pubblica per ragioni che spesso nulla hanno a che fare con la scienza o la sicurezza alimentare e ambientale né tantomeno con una doverosa analisi dei costi/benefici, quando, attraverso la tecnica dell'incrocio sia con varietà che con specie compatibili, si potrebbero ottenere buoni risultati. La risposta è piuttosto semplice per coloro che hanno familiarità con l'olivo. Infatti sia la selezione clonale, cioè la selezione di piante

plus, derivate da mutazioni naturali rilevabili tra gli olivi coltivati, sia la selezione dei discendenti derivati da incroci spontanei o programmati, finora ha fornito risultati insoddisfacenti. Nel primo caso sono state riscontrate variazioni di piccola entità, oppure non ripetibili su vasta scala, nel secondo, è necessario un periodo molto lungo prima di poter iniziare una selezione accurata a causa della lunga fase giovanile delle discendenze; inoltre la ricombinazione genica durante l'incrocio determina un rimescolamento enorme dei caratteri col risultato che si finisce per migliorare i discendenti per un carattere e di peggiorarlo per molti altri. Raggruppare sullo stesso genotipo tutte le caratteristiche migliori con l'incrocio rimane pertanto una impresa molto ardua o addirittura impossibile,

contrariamente alla trasformazione genetica, che può migliorare uno o pochi caratteri in una cultivar già di buon livello, senza modificarne pesantemente gli altri (Figura 5). Tuttavia anche con questa tecnica è necessario procedere con una accurata selezione dei rigeneranti, perché sia la posizione occupata del/i gene/i inserito/i lungo la catena del DNA, sia la variazione somaclonale spontanea che potrebbe aggiungersi, possono modificare i risultati attesi. Le piante prodotte con questo metodo sono soggette ad una severa legislazione, sono sottoposte a numerosi *test*, analogamente a quanto avviene per i farmaci, per cui sono da ritenersi sicure dopo il rilascio per essere commercializzate.

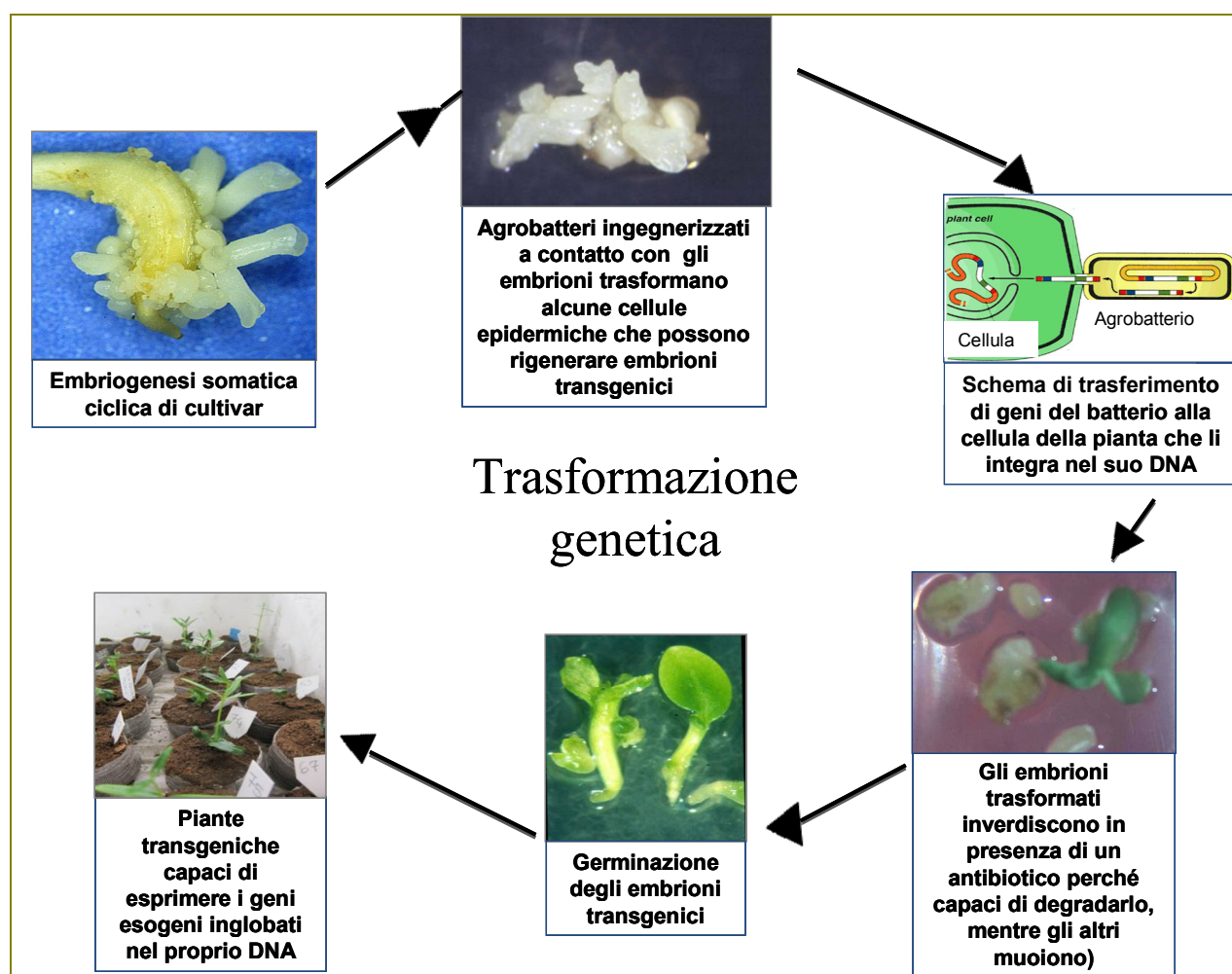


Figura 5.

Tuttavia permane una certa diffidenza nell'uso di queste piante a causa di una pubblicità spesso ingannevole da parte dei media che influenza le scelte del cittadino, ma la cosa più grave è che viene limitato fortemente lo svolgimento della ricerca scientifica.

Diverse sono le tecniche di trasformazioni genetiche, tuttavia due sono le più comuni per le piante: *trasformazione diretta* (inserimento dei geni con mezzi fisici) e *trasformazione indiretta* (mediata in genere da agro-batteri come *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*, raramente da virus). Per la riuscita è indispensabile disporre di un metodo efficiente di rigenerazione di piante da tessuti o da cellule indifferenziate e ovviamente appartenenti a cultivar di elevata qualità, che presentano pochi caratteri da migliorare. Entrambe le tecniche sono state impiegate con successo in olivo, ma solo con quella mediata da batteri sono state ottenute piante.

La messa a punto dell'embrionogenesi somatica da tessuti maturi di varietà (es. nella cv. Canino) è stata fondamentale per la riuscita della trasformazione genetica in olivo. Sono stati inseriti con successo geni che hanno consentito di modificare l'architettura della pianta o di migliorare la difesa dai patogeni fungini. Nel primo caso sono stati inseriti geni coinvolti nel metabolismo ormonale (geni *rolABC* di *A. rhizogenes*) (Rugini *et al.*, 1999) e nell'altro un gene (*osmotina*) che codifica per una proteina tossica per i funghi patogeni. Le piante transgeniche, o meglio *cisgeniche* nella accezione moderna, in quanto i geni inseriti si trovano anche nelle specie oggetto di trasformazione, con questa modifica ne è stata potenziata solo la loro espressione. Queste, attualmente sono coltivate in campo, autorizzato dal Ministero della Sanità sin dal 1999 per le necessarie valutazioni (Rugini *et al.*, 2008). Queste piante mostrano una accentuata giovanilità, sebbene derivino da embrioni somatici da tessuti maturi della cv.

Canino, che ne limita al momento le valutazioni sui frutti.

Il "Canino *rolABC*" presenta internodi molto corti, una straordinaria capacità di radicazione sia degli espianti in vitro che delle talee, una taglia ridotta ed un prolungato periodo di vegetazione in autunno che espone le piante al freddo invernale (Figura 6).

Tra le piante di "Canino *osmotina*" alcune producono una maggior quantità di proteina che riduce la sensibilità all'occhio di pavone (D'Angeli *et al.*, 2001) e conferisce una maggiore protezione dal freddo (D'Angeli e Altamura, 2007).

Con questa tecnologia potrebbero essere migliorati altri caratteri di rilevante importanza agronomica quali: *a)* la produzione di piante completamente auto-fertili, *b)* l'aumento del contenuto e della qualità dell'olio, *c)* la produzione di piante con frutti partenocarpici, *d)* l'aumento della tolleranza al freddo e al sale, *e)* la regolazione della maturazione dei frutti, e *f)* l'aumento della resistenza ai patogeni e ai parassiti. Attualmente sono disponibili molti geni di diversa origine mentre è ancora limitato il numero dei geni endogeni isolati e caratterizzati di olivo.



Figura 6. Olivi transgenici per *rolABC* della cv Canino di 11 anni (in primo piano) a confronto con una pianta coetanea di controllo sullo sfondo. Da notare la notevole differenza di dimensioni. (Campo di piante transgeniche della Università degli studi della Tuscia).

5. Caratterizzazione molecolare delle varietà

5.1. Le ragioni dell'analisi molecolare delle varietà

Nell'ultimo decennio è stato condotto un vasto lavoro di prospezione dell'intero germoplasma olivicolo mediante l'impiego di una vasta gamma di marcatori molecolari.

Le difficoltà per la caratterizzazione varietale derivano da molti fattori, legati soprattutto alla ricchezza del germoplasma ancora in coltivazione (Bartolini *et al.*, 1998), alla diversa distribuzione delle varietà (varietà locali e varietà a larga diffusione), alla sopravvivenza di ecotipi locali, genotipi rari, impollinatori ed olivi selvatici. Altri fattori che contribuiscono alla confusione sull'identità varietale sono la presenza di sinonimi (es. Frantoio-Raggiola-Correggiolo), omonimi (es. Ogliarola, Rosciola), toponimi (es. Nocellara del Belice, Bella di Cerignola) e morfonimi (es. Pendolino, Biancolilla), mentre ancora fortemente dibattuti sono i problemi relativi alla presenza di presunti varianti all'interno di ciascun clone e la presenza di virus o altri microrganismi asintomatici non patogeni.

La caratterizzazione molecolare ha risolto molti problemi di identificazione delle varietà di olivo, ma i dati ottenuti da laboratori diversi non sono ancora confrontabili tra loro in mancanza di protocolli di analisi comune e l'assenza di un'autorità nazionale di riferimento che certifichi l'identità del materiale analizzato ed usato come genotipo di riferimento.

5.2. I marcatori molecolari

Gli studi molecolari svolti sulla diversità genetica in olivo riflettono l'evoluzione delle tecniche molecolari.

Una prima classificazione delle varietà è stata ottenuta attraverso la comparazione dei profili elettroforetici degli isoenzimi isolati dal polline (Trujillo e Rallo, 1995) o da estratti fogliari (Ouazzani *et al.*, 1993; Lumaret *et al.*, 2004).

I marcatori basati sull'analisi del DNA rappresentano la metodologia più affidabile e

discriminante per l'identificazione varietale perché è indipendente dai fattori ambientali e dal tessuto di prelievo del campione e si basa sui polimorfismi nella sequenza del genoma di ciascuna cultivar.

Per l'identificazione e la caratterizzazione delle varietà di olivo sono ormai disponibili diversi sistemi di analisi molecolare. Tra questi i più utilizzati nell'ultimo decennio sono stati i RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), gli I-SSR (Inter Simple Sequence Repeats), gli SSR (Simple Sequence Repeats) e gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism), oltre all'uso sporadico di altri metodi, quali i marker plastidiali.

RAPD. Sono stati tra i primi marcatori basati sulla reazione di PCR (Polymerase Chain Reaction) usati per evidenziare polimorfismi tra le cultivar (Belaj *et al.*, 2001), studiare le loro relazioni genetiche (Belaj *et al.*, 2004; Besnard *et al.*, 2001; Hagidimitriou *et al.*, 2005; Muzzalupo and Perri., 2009) e costruire mappe genetiche (de la Rosa *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Tutte le cultivar esaminate sono state discriminate con la combinazione di pochi primer. Tuttavia, poiché i RAPD, rispetto ad altri marcatori, sono meno riproducibili, sono stati pressoché abbandonati in favore di metodi più efficienti.

AFLP. Si basano sulla digestione del DNA con due enzimi di restrizione e successiva amplificazione selettiva dei frammenti recanti adattatori a sequenza nota. Dopo l'amplificazione PCR gli AFLP vengono visualizzati tramite sequenziatore capillare, mediante l'uso di nucleotidi fluorescinati. Sono stati impiegati per l'analisi delle cultivar più rappresentative dei diversi paesi olivicoli (Angiolillo *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2005; Montemurro *et al.*, 2005) al fine di risolvere i casi di sinonimia ed omonimia e comprendere le relazioni genetiche tra di loro (Rotondi *et al.*, 2003) e con le forme selvatiche (Baldoni *et al.*, 2006), e per lo studio della variabilità presente all'

interno di una cultivar o in alberi secolari (Rao *et al.*, 2009).

ISSR. Rilevano i polimorfismi tra sequenze ripetute. Sono stati impiegati occasionalmente per la caratterizzazione varietale (Hess *et al.*, 2000; Terzopoulos *et al.*, 2005; Essadki *et al.*, 2006).

SSR o microsatelliti. Gli SSR sono oggi tra i marcatori più utilizzati. Sono basati sui polimorfismi di lunghezza a livello di brevi motivi di DNA (2-5 nucleotidi) ripetuti diverse volte. I microsatelliti richiedono una fase preliminare di identificazione delle sequenze fiancheggianti su cui costruire i primer specifici. Attraverso l'utilizzo dei primer specifici è possibile amplificare queste zone del genoma e renderle quindi rilevabili mediante tecniche elettroforetiche. I primer consentono di amplificare singoli microsatelliti che possono differire per il numero di volte in cui il motivo è ripetuto. Al momento attuale gli SSR rappresentano gli strumenti di caratterizzazione molecolare più efficaci e sicuri perché altamente polimorfici e riproducibili, essi consentono di ottenere profili semplici, con una o due forme alleliche per ciascuna cultivar. Diversi gruppi hanno selezionato SSR specifici di olivo con elevato grado di polimorfismo (Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; Carriero *et al.*, 2002; De La Rosa *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2006; Sabino Gil *et al.*, 2007). Sono state eseguite prove di comparazione tra i diversi sistemi molecolari (Belaj *et al.*, 2003) e, al momento, è stato selezionato un set di loci SSR particolarmente polimorfico ed efficace per la discriminazione varietale (Baldoni *et al.*, 2009). Gli SSR più discriminanti sono stati impiegati sia per la caratterizzazione varietale (Bandelj *et al.*, 2002; Belaj *et al.*, 2004; La Mantia *et al.*, 2005; Montemurro *et al.*, 2005; Muzzalupo *et al.*, 2009; Sarri *et al.*, 2006; Stambuk *et al.*, 2007) che per quella dei varianti clonali (Cipriani *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2004; Muzzalupo *et al.*, 2010).

SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Si tratta di micro-polimorfismi della sequenza a livello

nucleotidico. Sono co-dominanti e bi-allelici e vengono considerati i marcatori di nuova generazione, potenzialmente molto utili perché largamente presenti nei genomi vegetali e perché possono assumere valore funzionale se associati a particolari regioni codificanti o regolatrici. Al momento sono ancora pochi i lavori pubblicati sull'identificazione di SNP in olivo e sul loro impiego per la caratterizzazione varietale (Reale *et al.*, 2006; Consolandi *et al.*, 2007; Muleo *et al.*, 2009).

L'analisi molecolare si svolge in diverse fasi che includono l'estrazione del DNA, l'amplificazione PCR, la visualizzazione dei prodotti di amplificazione, l'analisi dei dati.

5.3. Estrazione del DNA

Esistono in commercio diversi kit che contengono i reagenti necessari per l'isolamento del DNA. Il tipo di kit da utilizzare dipende dal tessuto da cui estrarre il DNA (foglia, frutto, legno, ecc.). In alternativa, sono stati sviluppati solidi protocolli preparati direttamente in laboratorio che consentono l'estrazione e la purificazione del DNA.

5.4. Analisi con marcatori SSR

Per semplicità si farà riferimento all'amplificazione di loci SSR. L'analisi SSR consiste nell'amplificazione dei frammenti contenenti le ripetizioni poli-nucleotidiche mediante primer costruiti sulle regioni fiancheggianti. Sulla base del numero di ripetizioni si amplificano frammenti più o meno lunghi che possono essere separati e visualizzati tramite corsa elettroforetica su sequenziatore automatico capillare.

Il profilo così ottenuto (fingerprint) è caratteristico e unico per ciascuna varietà e costituisce quello che può considerarsi un vero e proprio 'codice a barre molecolare'.

Per la caratterizzazione molecolare è consigliato l'impiego di un pool comune di 18 marcatori SSR (Sefc *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et*

al., 2002; de la Rosa *et al.*, 2002) preventivamente selezionati sulla base della loro capacità di discriminazione, chiarezza del segnale, numero di alleli, eterozigosi e segregazione indipendente (Sarri *et al.*, 2006; Baldoni *et al.*, 2009), di seguito indicati: DCA3; DCA4; DCA5; DCA7; DCA9; DCA13; DCA14; DCA15; DCA16; DCA17; DCA18; EMO-90; EMO-L; GAPU45; GAPU71B; GAPU101; GAPU103; UDO-043.

L'amplificazione viene condotta su un termociclatore (es. GeneAmp PCR System 9600 Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) utilizzando diversi cicli di amplificazione.

5.5. Analisi dei dati

Una volta completata la corsa dei frammenti su analizzatore ad elettroforesi capillare va eseguito il *binning* dei dati grezzi forniti dagli strumenti sulle lunghezze reali degli alleli microsatellitari, per risolvere le potenziali fonti di errore nell'attribuzione della lunghezza finale degli alleli.

Il *binning* consiste nella trasformazione dei dati grezzi forniti dagli strumenti nelle lunghezze reali degli alleli microsatellitari. Questa operazione viene compiuta automaticamente da software dedicati, ma richiede anche una revisione manuale, sia per escludere eventuali amplificazioni aspecifiche, sia per discriminare quegli alleli che differiscono tra loro soltanto di 1-2 basi e che possono indurre ad errori nell'attribuzione della lunghezza finale. Questi dati, infatti, essendo basati su loci microsatellitari di-nucleotidici, che possono variare quindi solo per 2 o multipli di 2 nucleotidi, richiedono una interpretazione accurata per non correre il rischio di confusione, facendo risultare uguali varietà diverse o viceversa. Se, per esempio, una varietà ha due alleli della lunghezza di 118-120 bp e un'altra ha alleli 120-122 bp, si deve tenere conto di due fattori: i) la sensibilità degli strumenti ed un errore che implica una tolleranza di ± 1 base e ii) lo strumento da un output di numeri con 2 decimali. Nel caso citato potremmo ottenere per esempio: 118,23-119,91 per la prima e 119,32-

121,15 per la seconda, e questi dati richiedono una interpretazione e un arrotondamento accurati e univoco.

Una volta concordati i diversi profili molecolari, si deve procedere all'assemblaggio dei dati di tutte le varietà, per valutare il grado di similarità genetica fra tutte le cultivar in esame.

I dati ottenuti vanno analizzati utilizzando software di analisi bioinformatica, quali ad esempio, GenAlEx 6

(<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>),

Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011), NTSYSpc, ecc., per calcolare le matrici di distanza e raggruppare i genotipi in base alla similarità.

E' poi opportuno calcolare i parametri di diversità genetica per locus e per popolazione, numero totale di alleli, frequenza allelica, percentuale di alleli nulli e di alleli privati, ricchezza allelica (Nar), contenuto in polimorfismo (PIC), eterozigosi attesa (He) e osservata (Ho), diversità genica, coefficiente di inbreeding (Fis), analisi di parentage, test di significatività (software CERVUS V. 3.0.3, F-STAT, MICROSAT, GENEPOP, Arlequin 3.11, ecc.).

Si può anche valutare la struttura genetica e definire il numero di pool genici nel dataset utilizzando altri software (STRUCTURE 2.3.X, BAPS, ecc.).

Queste analisi consentono una comparazione complessiva dei dati derivati da diverse varietà fornendo informazioni univoche sull'identità delle varietà e sugli eventuali casi di sinonimia ed omonimia.

6. Tracciabilità molecolare degli oli

L'olio di oliva extra vergine, in virtù del suo elevato valore commerciale, è diventato il prodotto alimentare maggiormente sottoposto a sofisticazioni a livello europeo. Esso rappresenta un bersaglio d'elezione per adulterazioni e frodi che consistono nella miscelazione/sostituzione con oli di oliva di minor pregio od oli rettificati o deodorati, o nell'aggiunta/sostituzione

fraudolenta con oli di specie oleaginose diverse da olivo, quali nocciolo, soia, colza, girasole o mais, per le quali sono ormai disponibili varietà cosiddette alto-oleico, in grado di mimare la composizione acidica dell'olio di oliva.

Per il controllo sulle miscele di oli di oliva sono stati sviluppati diversi metodi di analisi chimica e/o chimico-fisica in grado di evidenziare la presenza di oli estranei o di bassa qualità. Ma le metodologie in uso presentano limitazioni come, ad esempio, la difficoltà di risalire alla composizione varietale o rilevare la presenza di specie estranee a concentrazioni inferiori al 10%.

Recentemente, sulla base dell'enorme evoluzione delle tecnologie di analisi del DNA, sono state sviluppate metodiche in grado di verificare la composizione delle materie prime utilizzate nelle preparazioni alimentari (rintracciabilità o DNA Tracking) e rilevare la presenza di componenti derivanti da specie o varietà diverse da quelle previste. Il DNA infatti è l'unica molecola in grado di caratterizzare in maniera inequivocabile specie e varietà diverse attraverso il confronto dei polimorfismi lungo il loro genoma, che possono essere messi in evidenza con l'analisi di piccoli frammenti caratteristici (marcatori molecolari). Queste metodologie di analisi, unite alla possibilità di moltiplicare in vitro frammenti di DNA tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR), sono alla base della genetica forense (DNA fingerprinting) per l'identificazione degli individui sulla base del loro profilo di DNA.

Lo stesso approccio viene applicato alla rintracciabilità degli alimenti, sia freschi che sottoposti a trasformazione, utilizzando marcatori microsatellitari (SSR, Simple Sequence Repeats) o di altro tipo. Il DNA, infatti, può conservarsi inalterato anche durante le fasi di preparazione e conservazione degli alimenti e, pur rimanendo solo in tracce nei cibi e nei materiali organici, può essere comunque riamplicato in vitro e analizzato. L'applicazione di metodi analitici basati sul DNA Tracking può quindi consentire di risalire alla composizione genotipica di

qualsiasi alimento o preparato alimentare per verificare l'aderenza ai disciplinari di produzione, stabilire la veridicità di quanto dichiarato in etichetta e rilevare la presenza di eventuali adulterazioni.

L'applicazione di queste metodologie agli oli d'oliva di tutte le tipologie - extra vergini, vergini, DOP, IGP, monovarietali, blend, miscele tra oli vergini e rettificati - rappresenta uno strumento di analisi sicuro, che può fornire risultati incontrovertibili sulla natura dei componenti che hanno contribuito alla preparazione dell'olio. In considerazione della forte strutturazione geografica delle varietà, ancora fortemente legata ai diversi territori/regioni di produzione, l'identificazione delle varietà che hanno contribuito alla preparazione dell'olio potrà contribuire anche a risalire all'origine geografica degli oli stessi.

La rintracciabilità molecolare può consentire di: i) determinare la composizione varietale degli oli di oliva extra vergine italiani, ii) valutare la presenza di oli da varietà estranee, e iii) verificare la presenza di oli di specie diverse da olivo (nocciolo, mais, girasole, soia, ecc.).

L'analisi molecolare delle tracce di DNA nell'olio rappresenta un complemento alle analisi chimiche e alla tracciabilità documentale di filiera e l'unico modo per l'identificazione certa della composizione varietale degli oli.

Presupposto necessario per applicare la tracciabilità molecolare agli oli di oliva è la conservazione del DNA nell'olio per tempi ragionevolmente lunghi (1-2 anni). E' stato osservato che, pur degradandosi progressivamente, frammenti di DNA rimangono in sospensione nel mezzo (Spaniolas *et al.*, 2008) ed i processi di rettificazione non distruggono completamente il DNA.

La procedura di rintracciabilità molecolare prevede: i) la disponibilità di metodi di estrazione di DNA da matrice oleosa; ii) l'identificazione di marcatori nucleari o plastidiali delle varietà di olivo e delle specie oleaginose diverse da olivo,

iii) la verifica della funzionalità del metodo su oli costruiti sperimentalmente, ed infine iv) l'applicazione dell'analisi molecolare agli oli commerciali.

I marcatori molecolari usati per la caratterizzazione delle cultivar sono poco adatti per la rintracciabilità a causa della bassa amplificazione del segnale e la presenza di segnali aspecifici (Breton *et al.*, 2004; Consolandi *et al.*, 2008). Poiché il DNA contenuto in tracce nell'olio è fortemente degradato (frammenti molto corti) occorrono marcatori con profili semplici e varietà-specifici. Per la rintracciabilità degli oli i marcatori plastidiali presentano alcuni vantaggi rispetto ai marcatori nucleari, quali: i) aumento della probabilità di rinvenire tracce di DNA nell'olio in conseguenza dell'elevato numero di cloroplasti e quindi di molecole di DNA plastidiale per cellula, ii) eliminazione del rischio di contaminazione da parte degli impollinatori in conseguenza dell'origine materna dei cloroplasti, iii) semplificazione dei profili molecolari in virtù del fatto che i cloroplasti hanno un genoma aploide (una sola versione del marcatore e non due come nel caso del DNA nucleare).

Allo scopo di identificare nuovi marcatori plastidiali di olivo è stato sequenziato il genoma del cloroplasto di olivo, varietà Frantoio, che ha consentito di identificare 30 nuovi marcatori plastidiali (Mariotti *et al.*, 2010), ma il livello di polimorfismo del DNA plastidiale rimane comunque basso ed è quindi incapace di discriminare tutte le varietà di interesse. Per identificarle tutte si è reso necessario lo sviluppo di altri marcatori basati su mutazioni del singolo nucleotide (SNP) del DNA genomico (Reale *et al.*, 2006). Per questa ragione è in corso la prospezione di geni candidati, nel tentativo di identificare marcatori in grado di distinguere le più importanti varietà italiane, mentre attenzione particolare è rivolta alla possibilità di discriminare le varietà spagnole più diffuse e maggiormente impiegate nelle miscele con oli italiani.

Bigliografia

- Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L., 1999. *Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms*. Theor. Appl. Genet., 98:411-421.
- Baldoni L., Cultrera N.G.M., Mariotti R., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin G.G., *et al.*, 2009. *A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping*. Mol. Breed., 24(3):213-231.
- Baldoni L., Tosti N., Ricciolini C., Belaj A., Arcioni S., Pannelli G., Germana' M.A., Mulas M., Porceddu A., 2006. *Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin*. Ann. Bot., 98:935-942.
- Bandelj D., Jakse J., Javornik B., 2002. *DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers*. Food Technol. Biotechnol., 40(3):185-190.
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G., Menini U., 1998. *Olive germplasm: Cultivars and world-wide collections*. FAO, Rome.
- Bastianelli M., (2011). Tesi di laurea, Facoltà di Agraria, Politecnico delle Marche
- Belaj A., Cipriani G., Testolin R., Rallo L., Trujillo I., 2004a. *Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers*. HortSci., 39(7):1557-1561.
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., 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*. Theor. Appl. Genet., 107(4):736-744.
- Belaj A., Satovic Z., Trujillo I., Rallo L., 2004b. *Genetic relationships and partition of variability of Spanish olive cultivars by means of RAPD markers*. HortSci., 39:948-951.
- Belaj A., Trujillo I., de la Rosa R., Rallo L., Giménez 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.

- Besnard G., Baradat P. e Bervillé A., 2001. *Genetic relationships in the olive (Olea europaea L.) reflect multilocal selection of cultivars*. Theor. Appl. Genet., 102:251-258.
- Besnard G., Garcia-Verdugo C., Rubio De Casas R., Treier U.A., Galland N., Vargas P., 2008. *Polyploidy in the olive complex (Olea europaea): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses*. Ann. Bot., 101: 25-30.
- Breton C., Claux D., Metton I., Skorski G., Bervillé A., 2004. *Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications*. J. Agr. Food Chem., 52(3):531-537.
- 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.
- 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.
- Consolandi C., Palmieri L., Doveri S., Maestri E., Marmioli N., Reale S., Lee D., Baldoni L., Tosti N., De Bellis G., Castiglioni B., 2007. *Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format*. J. Biotechnol., 129:565-574.
- Consolandi C., Palmieri L., Severgnini M., Maestri E., Marmioli N., Agrimonti C., Baldoni L., Donini P., De Bellis G., Castiglioni B., 2008. *A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, Multiplex PCR and LDR-Universal Array analysis*. Eur. Food Res. & Technol., 227:1429-1438.
- D'Angeli S., Gutiérrez-Pesce P., Altamura M.M., Biasi R., Ruggiero B., Muganu M., Bressan R., Rugini E., 2001. *Genetic transformation of olive tree (Olea europaea L.) with osmotin gene and in situ protein localisation in the transgenic tissues*. Proc. Soc. It. Genetica Agraria, Salsomaggiore Terme.
- D'Angeli S. and Altamura M.M., 2007. *Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization*. Planta, 225(5):1147-1163.
- De La Rosa R., Angiolillo A., Rallo L., Guerrero C., Pellegrini M., Besnard G., Bervillé A., Martin A., Baldoni L., 2003. *A first genetic linkage map of olive (Olea europaea L.) cultivars using RAPD and AFLP markers*. Theor. Appl. Genet. 106:1273-1282.
- 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.
- Diaz A., de la Rosa R., Martin A., Rallo P. (2006) *Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (Olea europaea L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies*. Tree Genet. Genomes, 2:165-175.
- Essadki M., Ouazzani N., Lumaret R., Moumni M., 2006. *ISSR variation in olive-tree cultivars from Morocco and other western countries of the Mediterranean Basin*. Gen. Res. Crop Evol., 53:475-482.
- 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*. J. Plant Pathol. 87(1): 49-55.
- Hagidimitriou M., Katsiotis A., Menexes G., Pontikis C., Loukas M., 2005. *Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFLPs and RAPDs) markers and morphological traits*. J. Am. Soc. Hort. Sci., 130:211-217.
- 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.

- La Mantia M., Lain O., Caruso T., Testolin R., 2005. *SSR-based fingerprints reveal the great genetic diversity of Sicilian olive (Olea europaea L.) germplasm*. J. Hort. Sci. & Biotech., 80(5):628-632.
- Lambardi M. and Rugini E., 2003. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In: Micropropagation of woody trees and fruits. SM Jain and K. Ishii (eds). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 621-646.
- Lambardi M., Benelli C., De Carlo A., Fabbri A., Grassi S., Lynch P.T., 2000. *Medium and long-term in vitro conservation of olive germplasm (Olea europaea L.)*. Acta Hortic. 586.
- Leva A.R., Petrucci R., Bartolini G., 1994. *Mannitol "in vitro" culture of Olea europaea L. (cv. Maurino)*. Acta Hortic. 356: 43-46.
- Leva A.R., 2011. *Innovative protocol for ex-vitro rooting on olive micropropagation*. Cent. Eur. J. Biol., 6:352-358.
- Lopes M.S., Mendonça D., Sefc M.K., Gil F.S., Da Camara Machado A., 2004. *Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars*. HortSci., 39:1562-1565.
- Lumaret R., Ouazzani N., Michaud H., Vivier G., Deguilloux M.F., Di Giusto F., 2004. *Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (Olea europaea L.) in the Mediterranean Basin*. Heredity, 92:343-351.
- Mariotti R., Cultrera N.G.M., Muñoz Díez C., Baldoni L., Rubini A., 2010. *Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives (Olea europaea L.) through plastome sequence comparison*. BMC Plant Biol., 10:211.
- Marte, M., Gadani, V., Savino, V. Rugini, E., 1985. *Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in Central Italy*. Plant Disease, 70:171-172.
- Martelli G.P., V. Savino, B. Di Terlizzi, L. Catalano Sabanadzovic S., 1995. *Viruses and certification of olive in Apulia*. Acta Hortic. 386:569-573.
- Mencuccini M (2003) *Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (Olea europaea L.) cultivars*. Sci. Hortic., 97:129-137.
- Mencuccini M. and Rugini E., 1993. *In vitro shoot regeneration from olive (Olea europaea L.) cultivar tissues*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 32:283-288.
- Mendoza-de Gyves E., Mira F.R, Ruiu F., Rugini E., 2008. *Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (Olea europaea L.) by using dikegulac*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 92:233-238.
- Micheli M., Hafiz I.A., Standardi A. 2007. *Encapsulation of in vitro-derived explants of olive (Olea europaea L. cv Moraiolo). II: Effects of storage on capsule and coated shoots performance*. Sci. Hort., 113:286-292.
- Montemurro C., Simeone R., Pasqualone A., Ferrara E., Blanco A., 2005. *Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers*. J. Hort. Sci. & Biotech. 80(1):105-110.
- Muleo R., Colao M.C., Miano D., Cirilli M., Intrieri M.C., Baldoni L., Rugini E., 2009. *Mutation scanning and genotyping by High-Resolution DNA Melting Analysis in olive germplasm*. Genome, 52(3):252-260.
- Muzzalupo I., Chiappetta A., Benincasa C., Perri E., 2010. *Intra-cultivar variability of three major olive cultivars grown in different areas of central-southern Italy and studied using microsatellite markers*. Sci. Hort., 126:324.
- 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 markers*. Adv. Hort. Sci., 23(4): 263-275.
- Muzzalupo I., Stefanizzi F., Perri E., 2009. *Evaluation of olives cultivated in Southern Italy by SSR Markers*. HortSci., 44(2):582-588.
- Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P., Di Giusto F., 1993. *Leaf allozyme variation in*

- cultivated and wild olive trees* (*Olea europaea* L.). J. Hered., 84:34-42.
- Owen C.A., Bitá E.C., Banilas G., Hajjar S.E., Sellianakis V., Aksoy U., Hepaksoy S., Chamoun R., Talhook S.N., Metzidakis I., Hatzopoulos P., and Kalaitzis P., 2005. *AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean*. Theor. Appl. Genet., 110:1169-1176.
- Peixe A., Raposo A., Lourenc R., Cardoso H., Macedo E. (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. Sci. Hortic. 113:1-7.
- Rao R., La Mura M., Corrado G., Ambrosino O., Foroni I., Perri E., Pugliano G., 2009. *Genetic diversity of olive cultivars using AFLP and morphological traits*. J. Hort. Sci. & Biotechnol., 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*. Genome 49:1193-1205.
- Rotondi A., Magli M., Ricciolini C., Baldoni L., 2003. *Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars*. Euphytica, 132(2): 129-137.
- Rugini E., 1984. *In vitro propagation of some olive cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos*. Sci. Hort. 24:123-134.
- Rugini E., 1992. *Involvement of polyamines in auxin and Agrobacterium rhizogenes-induced rooting of fruit trees in vitro*. J. Amer. Hort. Sci. 117:532-536.
- Rugini E., Caricato G., 1995. *Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (Olea europaea L.) "Canino" and "Moraiolo"*. Plant Cell Rep., 14:257-260.
- Rugini E., De Pace C., Gutierrez-Pesce P., Muleo R., 2011. *Olea*. In: Chittaranjan Kole (Ed). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits, Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 79-117.
- Rugini E., Di Francesco G., Muganu M., Astolfi S., Caricato G., 1997. *The effect of polyamines and hydrogen peroxide in root formation in olive cuttings and in the role of polyamines as an early marker for rooting ability*. In: Biology of Root Formation and Development, by A. Altman and A.E. Waisel eds, pp 65-74, chap. 8 Plenum Publishing Corporation, New York.
- Rugini E., Gutierrez-Pesce P., Muleo R., 2008. *Olive*. In: Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Temperate Fruits and Nuts. Kole C. and Hall T.C. (eds.), Blackwell Publishing, Oxford, UK, , pp 233-258.
- Rugini E., Gutiérrez-Pesce P., Spampianato P.L., Ciarmiello A., D'Ambrosio C., 1999. *New perspective for Biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, in vitro selection and gene transformation*. Acta Hortic. 474:107-110.
- Rugini E., Jacoboni A., Bazzoffia A., 1987. *A simple in vitro method to avoid the initial dark period and to increase rooting in woody species*. Acta Hortic. 227:438-440.
- Rugini E., Jacoboni A., Luppino M., 1993. *Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on in vitro rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species*. Sci. Hortic. 53:63-72.
- Sabino Gil F., Busconi M., Da Camara Machado A., Fogher C., 2006. *Development and characterization of microsatellite loci from Olea europaea*. Mol. Ecol. Notes, 6:1275-1277.
- Sarri V., Baldoni L., Porceddu A., Cultrera N.G.M., Contento A., Frediani M., Belaj A., Trujillo I., 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.
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues dos Santos M., Laimer da Camara Machado M., Da Camara Machado A., 2000. *Identification of microsatellite loci in olive (Olea*

-
- europaea L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.*, 9:1171-1173.
- Spaniolas S., Bazakos C., Ntourou T., Bihmidine S., Georgousakis A., Kalaitzis P., 2008. *Use of lambda DNA as a marker to assess DNA stability in olive oil during storage.* *Eur. Food Res. & Technol.*, 227:175-179.
- Stambuk S., Sutlovic D., Bakaric P., Petricevic S., Andelinovic S., 2007. *Forensic botany: potential usefulness of microsatellite-based genotyping of Croatian olive (Olea europaea L.) in forensic casework.* *Croat. Med. J.*, 48:1-7.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.* *Mol. Biol. Evol.*, 28:2731-2739.
- Terzopoulos P.J., Kolano B., Bebeli P.J., Kaltsikes P.J., Metzidakis I., 2005. *Identification of Olea europaea L. cultivars using Inter-Simple Sequence Repeat markers.* *Sci. Hort.*, 105:45-51.
- Troncoso A., Linan J., Canto, M., Acebedo M.M., Rapoport H.F., 1999. *Feasibility and anatomical development of an in vitro olive cleft-graft.* *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74:584-587.
- Trujillo I., Rallo L., 1995. *Identifying olive cultivars by isozyme analysis.* *J. Am. Hortic. Sci.* 120:318-324.
- Wu S.B., Collins G., Sedgley M., 2004. *A molecular linkage map of olive (Olea europaea L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers.* *Genome*, 47:26-35.
- Yakoub-Bougdal S., Chérifi D., Bonaly J., 2007. *Production de vitroplants d'Olea europaea var. Chemlal.* *Cahiers Agric.*, 16(2):125-127.
- Zuccherelli G., Zuccherelli S., 2000. *In vitro propagation of fifty olive cultivars.* *Acta Hortic.* 586:931-934.