

# **RELAZIONE TECNICA FINALE DEL PROGETTO**

## **INSIDE-OLIVE-OIL**

### **INNOVAZIONE NELLA TRACCIABILITA' MOLECOLARE E NELLA VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ PER L'INDIVIDUAZIONE DELL'ORIGINE DEGLI OLI EXTRAVERGINI DI OLIVA DELL'UMBRIA**

**Partner 2 – CNR - ISTITUTO DI BIOSCIENZE E BIORISORSE (CNR-IBBR) Azioni 1 – 2- 3**

**Partner 3 - UNIPG – DIP. CHIMICA, BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE (UNIPG-DCBB) Azioni 1 – 2**

I Partner UNIPG-DCBB (ex UNIPG-DBCA) e CNR-IBBR (ex CNR-IGV), come previsto, hanno lavorato in sinergia con le Aziende per l'attuazione delle Azioni 1 e 2 del Progetto. Il partner CNR-IBBR è stato anche coinvolto, insieme alle Aziende, nell'Azione 3.

### **Premesse del progetto**

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 (Mueller, 2011). 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 subita dalle 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 (detti anche 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 ri-amplificato 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.

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 problema 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 sia per la mancanza di un protocollo di analisi comune che per l'assenza di un'autorità nazionale di riferimento che certifichi l'identità del materiale analizzato ed usato come genotipo di riferimento.

Il Progetto Interregionale OLVIVA ha rappresentato il primo tentativo di definizione di un metodo di fingerprinting applicabile a livello nazionale per la certificazione genetica del materiale di propagazione attraverso tecnologie biomolecolari (Baldoni et al., 2011). Esso ha consentito la costituzione di una rete di laboratori, l'individuazione di 200 varietà di maggiore interesse vivaistico per le regioni coinvolte nel Progetto e l'analisi molecolare attraverso un metodo comune validato attraverso Ring Test. I marcatori SSR impiegati in questo progetto sono stati sottoposti ad una selezione preliminare basata su criteri stringenti quali il potere di discriminazione (qualità dei segnali, assenza di bande multiple o alleli nulli, basso stuttering), la segregazione indipendente, e l'informazioni sulla sequenza (Baldoni et al., 2009).

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) (Budker et al., 2002). È 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) lo sviluppo 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, la presenza di picchi aspecifici ed il rischio di contaminazione da DNA degli impollinatori (Breton et al., 2004; Consolandi et al., 2008; Baldoni et al., 2012; Rossi et al., 2012). Poiché il DNA contenuto in tracce nell'olio è fortemente degradato (frammenti molto corti) occorrono marcatori con profili semplici e varietà-specifici.

## Attività svolte e risultati ottenuti

### Azione 1 - Verifica del patrimonio varietale delle aziende coinvolte

L'**Azione 1** prevedeva la **verifica del patrimonio varietale delle aziende coinvolte nel Progetto**.

#### *Prospezioni aziendali*

Sono state effettuate delle prospezioni negli oliveti delle Aziende, non solo per confermare la composizione del patrimonio varietale dichiarato dalle aziende stesse, ma anche e soprattutto per rilevare l'eventuale presenza di olivi appartenenti a varietà locali minori ma interessanti in quanto potenziale risorsa da valorizzare per migliorare la produzione olearia umbra.

Sono stati presi in considerazione gli appezzamenti di oliveti tradizionali, con alberi di dimensioni tali da far ritenere un'età superiore agli 80-100 anni, in modo da esser certi di raccogliere campioni da piante realmente locali e non da olivi comprati sul mercato vivaistico, come sarebbero le piante più giovani o reimpiantate dopo le gelate del 1956 e del 1985.

Le prospezioni sono state effettuate nel mese di Ottobre 2013 e poi ripetute in Ottobre 2014, quando la presenza dei frutti poteva facilitare l'identificazione su base morfologica delle piante. Purtroppo per l'annata 2014-2015 non è stato possibile disporre di oli dalle aziende umbre, a causa del fortissimo attacco di mosca che ha ridotto fortemente le caratteristiche qualitative degli oli.

Le varietà presenti nelle aziende sono riportate nella Tab. 1.

#### *Analisi morfologica dei campioni*

Durante le prospezioni le piante sono state in via preliminare esaminate sulla base di **caratteri morfologici** solitamente impiegati per riconoscere le varietà di appartenenza di ciascun albero di olivo, quali forma, dimensione e curvatura delle foglie, forma e dimensione dei frutti e dei noccioli (Vedi Schede Varietali di riferimento in appendice).

Tabella 1. Elenco delle varietà coltivate dalle aziende partner.

Azienda	Varietà dichiarate	Percentuali	Varietà individuate
Az. Agricola Lottanti Francesca – DOP Colli Martani	Moraiolo Leccino Frantoio	55 25 20	Moraiolo Leccino Frantoio
Oleificio Pozzuolese – DOP Colli Trasimeno	Frantoio Moraiolo Leccino Dolce Agogia	60 20 10 10	Frantoio Moraiolo Leccino Dolce Agogia
Soc. semplice Agricola San Romualdo – DOP Colli Orvietani	Leccino Moraiolo Frantoio	56,4 22,6 21	Leccino Moraiolo Frantoio
Coop. Oleificio Coltivatori Diretti di Amelia – DOP Colli Amerini	Frantoio Leccino Moraiolo Raio Maurino Pendolino	N.B. l'azienda dichiara Maurino e Pendolino ma noi non le abbiamo analizzate. <i>In verde le piante sparse o in numero insignificante</i>	Frantoio Leccino Moraiolo Raio
Az. Agr. Decimi – DOP Colli Martani	Moraiolo Frantoio San Felice Leccino	75 13 7 5	Moraiolo Frantoio San Felice Leccino
Azienda agricola Appolloni Paolo	Moraiolo Leccino Altre	70 25 5	Moraiolo Leccino
Az. Agricola Petesse – DOP Assisi Spoleto (volontaria)	Moraiolo Frantoio Leccino	90 5 5	Moraiolo Frantoio Leccino
Az. Agricola Benedetti Agostino	Moraiolo Frantoio Leccino	75 15 10	Moraiolo Frantoio Leccino

### *Analisi molecolare dei campioni*

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

Da alcune piante rappresentative delle differenti varietà coltivate negli oliveti sono state raccolte foglie per procedere, in laboratorio, all'accertamento della loro identità genetica mediante l'**analisi del DNA**.

Da ogni campione fogliare corrispondente a ogni singola varietà presente in ciascuna azienda è stato estratto il DNA totale. I campioni di DNA sono stati analizzati mediante marcatori molecolari microsatelliti (SSR, Simple Sequence Repeats). Dei numerosissimi microsatelliti sviluppati in olivo (Sefc *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002; De La Rosa *et al.*, 2002; Rallo *et al.*, 2002) ne sono stati utilizzati 18, scelti tra quelli che presentano le migliori caratteristiche per la

discriminazione varietale e di cui viene raccomandato l'impiego negli studi di genotipizzazione allo scopo, soprattutto, di uniformare i risultati ottenuti in laboratori diversi.

L'analisi è consistita nell'amplificazione delle regioni microsatellite del DNA genomico tramite PCR (polymerase chain reaction). Gli amplificati sono stati analizzati tramite elettroforesi capillare al sequenziatore. Il numero e la lunghezza degli alleli ottenuti per ciascuna delle varietà presenti in ciascuna azienda sono stati confrontati con i profili delle varietà di riferimento per l'Umbria, raccolti in un database presso il partner CNR-IBBR (Tab. 2). Le analisi condotte sulle varietà coltivate nelle aziende hanno dimostrato che ciascuna varietà comune alle diverse aziende presenta un profilo molecolare identico a quella della cultivar di riferimento. La genotipizzazione molecolare ha anche confermato i risultati della prospezione, vale a dire che in ciascuna azienda sono presenti le varietà dichiarate dalle aziende stesse, e che in nessuna azienda sono presenti varietà minori o sconosciute.

Tabella 2. Profili allelici delle cultivar usate come riferimento per l'Umbria. In verde le varietà messe a disposizione dalle aziende coinvolte nel progetto.

	DCA3		DCA4		DCA5	
BIANCHELLA	237	239	130	132	206	212
BORGIONA	230	253	132	163	204	206
DOLCEAGOGIA	230	245	163	163	194	206
FRANTOIO	237	243	130	132	198	206
LECCINO	243	253	130	132	198	206
MORAIOLO	232	243	130	130	206	206
NOSTRALE di RIGALI	245	253	132	132	194	206
RAIO	239	245	130	140	198	206
ROSCIOLA di PANICALE	239	245	132	132	194	206
SAN FELICE	239	239	152	188	194	208
TENDELLONE	243	243	132	132	198	206

## **Azione 2 - Applicazione di marcatori varietà-specifici agli oli prodotti dalle Aziende coinvolte nel Progetto**

L'Azione 2 prevedeva la realizzazione di un profilo molecolare di ciascuna delle varietà di interesse per il progetto utilizzando marcatori nucleari (SNP e EST-SSR poli-nucleotidici), plastidiali e mitocondriali disponibili, in grado di discriminarle tutte in maniera inequivocabile.

**Analisi delle varietà con nuovi marcatori SSR poli-nucleotidici, SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) e plastidiali per identificare i marcatori più utili ai fini diagnostici.**

### ***Marcatori SSR poli-nucleotidici***

Gli SSR rappresentano ancor oggi gli strumenti di caratterizzazione molecolare più efficaci e sicuri perché altamente polimorfici e riproducibili.

I marcatori SSR hanno dimostrato una buona capacità di discriminazione delle cultivar di olivo ma molti problemi rimangono ancora irrisolti, principalmente a causa del fatto che, nella maggior parte dei casi, essi sono di tipo di-nucleotidico e gli alleli che differiscono solo per due basi si distinguono con difficoltà (Baldoni *et al.*, 2009). Quindi, nonostante l'utilizzo di protocolli di fingerprinting molto sviluppati, errori nella genotipizzazione continuano a verificarsi, portando a profili microsatellitari discordanti per lo stesso genotipo, legato alla difficoltà di discriminazione tra alleli molto simili. Tali errori, anche a tassi modesti, possono falsare i risultati di identificazione.

Per questo motivo nel fingerprinting umano gli SSR di-nucleotidici sono stati scartati in favore di microsatelliti con ripetizioni nucleotidiche più lunghe (Butler 2006). Marcatori tri-, tetra- e penta-nucleotidici sono stati sviluppati anche in specie coltivate, dalle sequenze del genoma di vite, mirtillo e mela (Cipriani *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012) e da dati EST (Expressed Sequence Tags) in vite, pisello, tè e girasole (Heesacker *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2013). Microsatelliti con ripetizioni più lunghe sono meno frequenti nel genoma e difficili da isolare, ma la disponibilità di enormi quantità di dati da EST accelera notevolmente la loro identificazione (Acuña *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Shiferaw *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). SSR derivati da librerie EST sono stati ben documentati in alcune specie di piante tra cui cacao (Lima *et al.*, 2008) e albero della gomma (Feng *et al.*, 2009).

La disponibilità di collezioni di sequenze espresse (EST) ricavate da tessuti differenti di olivo (Progetto OLEA – Genomica dell'Olivo, MIPAAF) ha consentito l'identificazione di migliaia di motivi ripetuti poli-nucleotidici che sono molto utili per l'identificazione di un panel di questo tipo di nuovi marcatori SSR poli-nucleotidici da impiegare per la caratterizzazione molecolare del

germoplasma olivicolo, a differenza degli SSR di tipo normale, che sono difficilmente impiegabili per la tracciabilità molecolare degli oli, sia perché i picchi ottenuti dal DNA estratto dall'olio spesso non corrispondono con quelli del DNA estratto da tessuti freschi (Baldoni et al., 2013), che per la difficoltà di discriminazione di alleli simili.

Per queste ragioni abbiamo intrapreso la selezione e valutazione di un set di nuovi SSR con ripetizioni da 3 a 4 nucleotidi. Questi nuovi marcatori vengono proposti per il loro impiego nel fingerprinting delle risorse genetiche di olivo e per il DNA testing dell'olio.

### *Materiali e metodi*

I motivi ripetuti (mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ed esa-nucleotidi) sono stati ricercati in collezioni di EST ottenute con piro-sequenziamento 454 (Roche).

I frammenti sequenziati sono stati ottenuti da diverse librerie cDNA costruite a partire da mRNA estratti da tessuti di frutti e di fiori di olivo.

In particolare sono state utilizzate:

Coratina e Tendellone, caratterizzate rispettivamente da alto e basso contenuto di polifenoli nei frutti (Alagna et al, 2009);

Ortice e Ruveia, diversa suscettibilità all'attacco di *Bactrocera oleae*;

Frantoio, Leccino e Dolce Agogia, impiegate per l'identificazione di geni coinvolti nell'auto-incompatibilità, sviluppo del fiore, e aborto dell'ovario.

Per campionare la più ampia gamma di variabilità del germoplasma olivicolo coltivato, 26 nuovi marcatori sono stati testati su un set di 80 cultivar provenienti da tutto il bacino del Mediterraneo, di cui 7 sono le varietà ombre usate nel progetto Inside Olive Oil: Dolce Agogia, Frantoio, Leccino, Moraiolo, Tendellone, Borgiona, Raio.

Il risultato delle amplificazioni PCR effettuate per i 26 nuovi marcatori SSR ha evidenziato diversi motivi ripetuti, dei quali solo TGG, CAG e GAA sono risultati presenti in almeno 3 loci ciascuno. I motivi ripetuti variano da una sola ripetizione per il locus OLEST7 ad un massimo di 17 ripetizioni per il locus OLEST12 riscontrato in 7 cultivar analizzate. Il range degli alleli analizzati dimostra una considerevole variabilità nella lunghezza allelica all'interno dei diversi loci. In particolare la massima differenza tra l'allele più lungo e il più corto (42 basi) è risultata essere presente nel locus OLEST14.

### *Risultati*



I nuovi marcatori EST-SSR tri- e tetra-nucleotidici identificati rappresentano uno strumento di particolare utilità per il genotyping delle varietà di olivo, in grado di risolvere i problemi connessi all'uso dei tradizionali SSR di-nucleotidici. Gli alleli di questi marcatori, infatti, sono più facilmente distinguibili, il loro grado di polimorfismo, pur minore rispetto agli altri, è comunque sufficiente per una completa discriminazione delle varietà. 4 marcatori EST-SSR selezionati dal nuovo set sono risultati sufficienti a discriminare il 100% dei genotipi inclusi nell'analisi.

**I marcatori EST-SSR risultati varietà-specifici rappresentano un potente strumento per l'analisi molecolare degli oli di oliva, laddove è necessario discriminare una varietà in un pool di varietà sconosciute a priori. Tra questi, di particolare interesse risultano quelli in grado di discriminare in maniera specifica varietà potenzialmente contaminanti degli oli italiani, quali Chemlali (Tunisia) e Picual (Spagna).**

I risultati sono riportati nella Tab. 3. Alcuni loci hanno messo in evidenza alleli varietà-specifici o alleli rari (presenti solo in una bassa percentuale di varietà). Questi loci risultano particolarmente utili per l'impiego nell'analisi molecolare degli oli perché la presenza in un olio di alleli specifici consente l'identificazione certa della varietà di origine.

E' il caso, per esempio, dell'allele 258 di *OLEST3* (caratteristico delle cv. Leccino, Moraiolo, Caiazzana e Picholine Marocaine), di 239, 242 e 251 di *OLEST4* (caratteristici rispettivamente di Moraiolo-Tendellone-Zaity-Koroneiki, Arbequina-Kaissy-Toffahi e Mari), i 346, 349 e 352 dell'*OLEST9* (presenti solo in Leccino- Chemlali, Moraiolo-Galega-Zaity-Oliviere e Bosana-Tendellone-Chemlali-Koroneiki-Mari, rispettivamente), il 308 e 311 di *OLEST14*, il primo specifico di Nocellara del Belice e il secondo che discrimina AscolanaTenera-Kalamata-Oliviere-Oblica; il 185 di *OLEST16* specifico di Picual e il 206, presente in DolceAgogia-Farga-Ayvalik-Kaissy; ed infine il 222 di *OLEST19*, presente solo in Leccino-Caiazzana-Ortice-Arbequina-Sigoise. Quindi questi marcatori, usati uno per volta o meglio in combinazione, sono sufficienti per distinguere in maniera inequivocabile alcune importanti cultivar. Se, per esempio dall'analisi del DNA estratto da un olio trovassimo sia l'allele 346 di *OLEST9* che il 308 di *OLEST14*, potremmo ragionevolmente ritenere che l'olio deriva dalla cv. Coratina perché il 346/*OLEST9* può derivare da 4 cultivar (Coratina-Leccino-Caiazzana-Chemlali) ma, tra queste, solo Coratina ha il 308/*OLEST14*. Analogamente si può procedere con gli altri marcatori.

I risultati dell'analisi molecolare del DNA delle cultivar sono stati analizzati con i software GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) e MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011), per calcolare la matrice di similarità e costruire un albero di relazioni genetiche tra le varietà da cui gli oli sono stati estratti.

Dall'analisi di similarità eseguita con questi marcatori è stato ottenuto un albero di relazioni genetiche. Esso dimostra che tutte le varietà analizzate sono chiaramente discriminate, con livelli di discriminazione piuttosto elevati.

Con gli stessi marcatori è stato inoltre analizzato un altro set di varietà che include altre 17 varietà italiane (Tab.4).

### Caratterizzazione molecolare mediante EST-SSR polinucleotidici

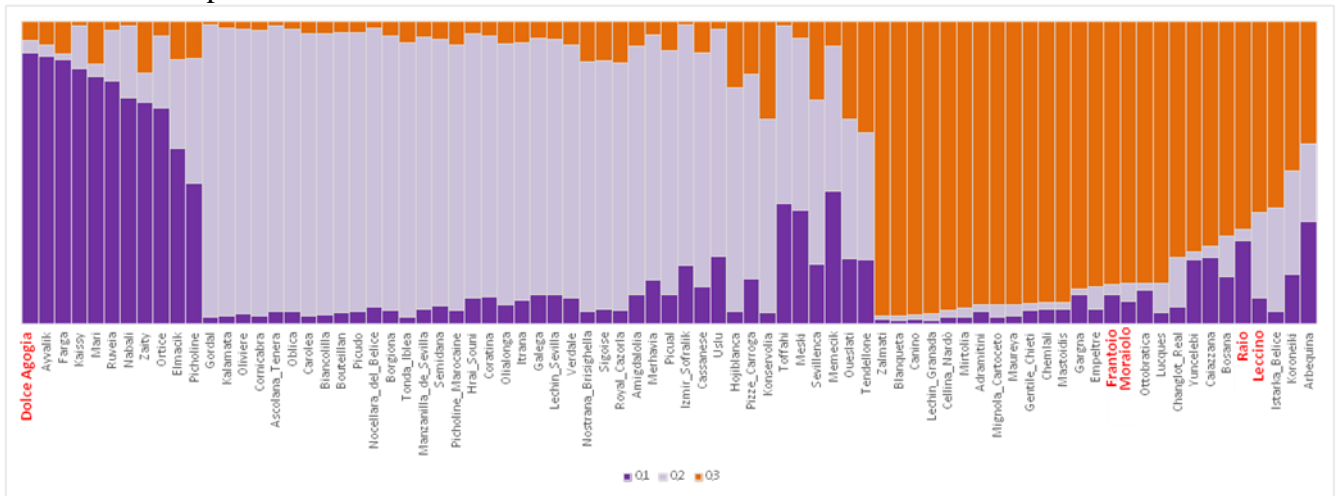
Le cultivar umbre sono state sottoposte a genotyping con un nuovo set di 26 marcatori SSR tri-nucleotidici ottenuti da sequenze di EST (Expressed Sequence Tags), insieme a un gruppo di altre 70 cultivar. L'amplificazione è stata condotta su un volume finale di 25 µl contenente 25 ng di DNA, Buffer PCR 10X, 200 µM di ciascun nucleotide, 10 pM di primer forward (con 18 bp di tail in 5') e reverse e 1.5 U di PerfectTaq DNA Polymerase (5-Prime). Il primo step consiste in 35 cicli di amplificazioni con una denaturazione iniziale a 95°C per 5 min, seguita da 35 cicli a 95°C per 30 s, 60°C per 30 s e 72°C per 90 s, e uno step finale a 72°C per 30 min, il secondo (per l'annealing del primer con tail) consta di 17 cicli, con le stesse condizioni del precedente, fatta eccezione per la temperatura di annealing ( $T_m = 52^\circ\text{C}$ ). Tutte le amplificazioni sono state condotte mediante PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ad ogni reazione sono stati aggiunti un controllo negativo (senza templat) ed uno positivo (cv. di identità nota), per escludere la possibilità di contaminazioni e verificare il successo delle condizioni di PCR. Gli amplificati sono stati controllati su gel di agarosio al 2% e successivamente corse su sequenziatore (ABI 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems-Hitachi) utilizzando come riferimento GeneScan™-500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). L'analisi dei frammenti micro satellitari è stata condotta tramite GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems-Hitachi).

Tab. 4. Marcatori EST-SSR tri-nucleotidici di varietà umbre

VARIETA'	OLEST1	OLEST1	OLEST7	OLEST7	OLEST9	OLEST9	OLEST12	OLEST12	OLEST14	OLEST14	OLEST15	OLEST15	OLEST16	OLEST16	OLEST20	OLEST20	OLEST22	OLEST22	OLEST23	OLEST23
MORAILOLO	239	245	260	266	349	352	165	165	287	296	173	173	161	176	235	238	249	255	216	216
FRANTOIO	245	248	269	269	346	352	168	168	272	299	173	176	167	176	232	232	249	252	210	216
LECCINO	245	245	263	269	346	358	168	189	296	299	170	176	176	176	232	232	249	249	210	210
DOLCEAGOGIA	236	239	260	266	355	355	165	177	272	287	173	176	176	206	235	238	249	252	204	207
BORGIONA	228	234	260	263	353	353	165	189	289	295	169	169	169	169	232	238	246	249	211	217
TENDELLONE	230	239	263	269	352	355	162	165	284	290	170	173	167	176	232	232	252	255	210	219

Fig. 1. Analisi bayesiana condotta con Structure, considerando 79 cultivar analizzate con 10 EST-SSR. In rosso sono indicate le 5 principali varietà umbre. Si osserva chiaramente che mentre 4 di queste varietà (Moraiolo, Frantoio, Leccino e Raio) si raggruppano insieme nella stessa

popolazione, pur con un certo livello di admixture con altre popolazioni, per la cv. Dolce Agogia, la separazione in un'altra popolazione è evidente, facendone supporre un'origine diversa rispetto alle altre varietà.



## Marcatori SNP

Gli SNP sono 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 fenotipi. 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; MacKay et al., 2008; Muleo et al., 2009; Rossi et al., 2012).

Dai 172 marcatori SNP-indel impiegati per la caratterizzazione varietale è stato selezionato il numero minimo sufficiente per la discriminazione certa di ciascuno di loro, corrispondente a 39 marcatori.

I dati ottenuti sono stati elaborati con i software GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2013) e MEGA version 5 (Tamura et al., 2011) per costruire il dendrogramma UPGMA di relazioni genetiche.

## SNP Genotyping

Nove varietà di olivo umbre (Moraiolo, Frantoio, Leccino, Dolce Agogia, San Felice, Nostrale di Rigali, Borgiona, Raio, Tendellone), tra le quali le sei coltivate nelle aziende del Progetto, sono state sottoposte a genotipizzazione con un set di 2.400 marcatori SNP e confrontate con un ampio set di varietà italiane e con le principali varietà di altri paesi olivicoli di riferimento, per un totale di 642 genotipi.

Il set di marcatori SNP è stato ottenuto da sequenze di trascritti derivati da precedenti attività di RNA-seq, su diversi organi della pianta (fiore, frutto, foglia) e appartenenti a diverse cultivar

(Alagna et al. 2009, Alagna et al. 2012, Galla et al. 2009, Muñoz-Mérida et al. 2013). Presso il laboratorio del CNR-IBBR sono stati estratti e quantificati i campioni di DNA da sottoporre a genotyping. Il servizio è stato affidato ad una company privata (Cegen - Human Genotyping Unit - Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spagna).

### Caratterizzazione molecolare mediante SNP

In parallelo sono state analizzate le sequenze di 4 geni candidati su un set di 90 cultivar che include le principali 8 varietà umbre. I geni selezionati sono: *OeACP1* and *OeACP2* (*acyl carrier protein 1* e *2*, Cultrera et al. 2014), *OeLUP* (*lupeol synthase*, Gelsier et al. 2011) e *OeSUT1* (*sucrose transporter 1*, Afoufa-Bastien et al. 2010). Le amplificazioni sono state svolte su un volume di 25 µl, contenente 25 ng di DNA, Buffer PCR 10X, 0,5 mM di ciascun nucleotide, 1 µM di ciascun primer e 1.5 U di PerfectTaq DNA Polymerase (5-Prime). Le amplificazioni sono state svolte utilizzando il termociclatore PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min, seguita da 50 cicli a 95°C per 30 s, 59°C per 30 s e 72°C per 90 s, e uno step finale a 72°C per 30 min. Per identificare i due distinti alleli di ciascun genotipo, gli ampliconi di ciascun locus sono stati isolati tramite clonaggio con pGEM-T Easy Vector (Promega) e sequenziati mediante ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems-Hitachi, Foster City, CA). Le sequenze sono state allineate mediante il software BioEdit.

### Caratterizzazione molecolare mediante marcatori plastidiali

Le varietà umbre sono state inoltre analizzate con un set di 40 marcatori plastidiali. Le condizioni di amplificazione adottate sono le medesime di quelle utilizzate per gli SNP nucleari, fatta eccezione per il clonaggio. Le sequenze sono state allineate mediante BioEdit.

## Risultati

Dallo SNP genotyping high-throughput sono stati ottenuti, dopo ripulitura dei dati con criteri molto stringenti, circa 725 marcatori SNP polimorfici sul set di campioni complessivo, consentendo di ottenere dati ripetibili e certi, scartando i genotipi con risultati non attendibili e gli SNP con cattiva segregazione e scarsamente rappresentati nelle varietà. I marcatori ottenuti sono stati utilizzati per la caratterizzazione delle varietà umbre.

Lo screening delle cultivar tramite l'utilizzo dei quattro geni candidati (*OeACP1*, *OeACP2*, *OeLUS*, *OeSUT1*) ha consentito l'identificazione di 172 marcatori SNP ed indel, anch'essi utilizzati per la caratterizzazione degli oli delle cultivar oggetto di studio. Per quanto riguarda le 6 varietà umbre, è stato selezionato il numero minimo e sufficiente di polimorfismi utili per la loro discriminazione, corrispondente a 39 marcatori (Tab. 5, Tab. 6).

Tabella 5. Alleli discriminati per ciascuna delle cultivar umbre analizzate per i geni *Acyl Carrier Protein (ACP1, ACP2)*, *Lupeol Sintasi (LUP)* e *Sucrose Transporter 1 (SUT1)*.

CULTIVAR	ACP1	ACP2	LUP	SUT1
MORAIOLO	1A-1A	4D-4F	A-C	S4-M2
FRANTOIO	1A-1A	2D-4C	C-D	S4-M2
LECCINO	1A-3C	2D-4A	C-C	S4-M2
DOLCE AGOGIA	1A-1A	2A-4C	E-F	S4-M2
BORGIONA	1A-3D	2D-4A	C-C	M2-M2
NOSTRALE DI RIGALI	1A-1A	2D-4A	C-C	M2-M13
RAIO	1A-1A	2A-2A	C-D	M3-M2
RAIA	1A-1A	2C-2D	C-D	S4-M2

Tabella 6. Elenco dei marcatori SNP specifici di ciascuna varietà umbra. Nella 4° colonna sono indicate altre varietà che condividono gli stessi SNP ma che poi si differenziano per altri polimorfismi indicati nella 5° colonna.

MORAIOLO	A1-245	A2-103	ORBETANA	A2-239B		
FRANTOIO	A2-688A	L-259				
LECCINO	A2-28	A1-503	OUSLATI, ROSCIOLA CE	L-122		
DOLCE AGOGIA	A2-257	L-174				
NOSTRALE RIGALI	A2-148	S-643	GORDAL, PICUAL	A1-306-312		
BORGIONA	A1-407	S-643	BOUTELLAIN, CARIASINA, SEMIDANA, MERHAVIA, ZAITUNA	A2-1167	SEMIDANA	L277
RAIO	A2-851	S-643				
RAIA	A2-851	S-643	HOJIBLANCA	A1-306-312		

### Risultati ottenuti

Come si desume dalla Tab. 1, che riporta l'elenco delle varietà dichiarate dalle aziende e di quelle individuate su base morfologica, **in nessuna azienda sono state individuate piante appartenenti a cultivar diverse da quelle dichiarate**. Le varietà complessivamente individuate sono 6:

- Moraiolo,
- Frantoio,
- Leccino,
- Dolce Agogia,

- San Felice
- Raio

Moraiolo è la varietà maggiormente rappresentata, seguita da Frantoio e Leccino.

Per i dati morfologici, vedasi in appendice le **schede morfologiche** relative a ciascuna varietà.

## Risultati ottenuti

Dei 39 marcatori SNP utilizzati per analizzare le 37 varietà italiane più importanti per la produzione di olio, individuate nell'ambito del 1° anno di attività (Tab. 3, Relazione 1), 7 non hanno manifestato alcun polimorfismo (A2-372, A2-591, L-450, S-207, S-238, S-273, S-304; mentre 6 sono risultati varietà specifici, quali il 4 del locus A1-503 (cv. Dritta), il 3 di A2-148 e il 2 di A2-851 (cv. Gentile di Chieti), il 6 di A2-1296 (cv. Ravece), l'8 di L-174 (cv. Dolce Agogia), il 5 di S-271 (cv. Biancolilla); e 4 specifici a 2 cultivar, come l'11 di A1-217 (cvs. Dritta e Pisciotana), il 4 di L-259 (cvs. Biancolilla e Nocellara del Belice), il 4 di L-277 (ancora per cvs. Biancolilla e Nocellara del Belice) ed infine il 4 di S-176 (cvs. Cellina di Nardò e Pisciotana). Abbiamo rilevato altri alleli piuttosto rari e quindi potenzialmente utili, mentre solo pochi sono troppo comuni per rappresentare strumenti utili ai fini diagnostici (Tab. 3).

L'analisi di similarità tra le 37 cultivar analizzate con 39 marcatori SNP ha consentito di ottenere un albero di relazioni genetiche tra di esse (Figura 2). In esso si osserva che tutte le varietà già risultate uguali tra loro con marcatori SSR 'classici' (Baldoni et al., 2009; Baldoni et al., 2011), si sono confermate uguali anche con questo nuovo tipo di marcatori, attestando la loro affidabilità. In particolare sono risultate uguali le varietà del gruppo che fa capo alla cv. Frantoio (Raia Sabina, Taggiasca, Raggiola, Correggiolo, Cima di Bitonto e Casaliva), così come il raggruppamento che include le cvs. Bosana, Peranzana e Coroncina e i due campioni di 'Moraiolo' dell'Umbria e della Toscana. Tutte le altre varietà sono risultate chiaramente distinguibili con uno (Ortice da Moraiolo) o più marcatori.

## Discussione

I 725 SNPs ottenuti dal genotyping di 642 varietà a livello internazionale e che includeva le 9 varietà umbre più importanti e le 6 del progetto, rappresentano un prezioso strumento per la genotipizzazione, consentendo sia di verificare il grado di variabilità presente all'interno del germoplasma umbro che un confronto con quello delle altre regioni italiane e degli altri paesi olivicoli. E' stato selezionato un set minimo di marcatori, in grado di riconoscere in maniera univoca le varietà di interesse.

Lo screening delle 8 cultivar umbre mediante l'utilizzo dei quattro geni candidati (*OeACP1*, *OeACP2*, *OeLUS*, *OeSUT1*) ha mostrato un elevato livello di polimorfismi, sia considerando l'intero set di campioni che focalizzando l'attenzione sulle varietà campane. Questi polimorfismi risultano maggiori rispetto a quelli individuati in altre specie (Emanuelli et al. 2010, Xia et al. 2012, Zhang et al. 2011). Nello specifico 39 polimorfismi sono in grado di discriminare in maniera univoca le cultivar umbre.

Il nuovo set di 26 marcatori EST-SSR è in grado di discriminare le varietà umbre analizzate, sia tra loro che con tutte le altre presenti nel database. L'analisi in silico dei trascritti ha permesso di ottenere la predizione della proteina codificata. Ulteriori studi permetteranno di associare i polimorfismi allelici con le conseguenti modifiche a livello proteico. I marcatori associati a geni responsabili di importanti tratti agronomici saranno utilizzati nella Marker-Assisted Selection (Bocacci et al. 2015, Dutta et al. 2011).

Delle varietà umbre, analizzate per un set dei più polimorfici marcatori plastidiali, hanno evidenziato che solo la cv. Fecciaro (sin. Tendellone) manifesta un clorotipo diverso, mentre tutte le altre appartengono al clorotipo più comune (Frantoio, Mariotti et al. 2010), pertanto queste varietà non possono essere discriminate con questo tipo di marcatori.

L'analisi molecolare degli oli, condotta con i 15 marcatori più polimorfici (SNPs e SSRs), ha evidenziato che il pattern del DNA estratto dai campioni di olio mono-varietale corrisponde totalmente a quello del DNA genomico delle varietà corrispondenti.

### Marcatori plastidiali

L'analisi dei polimorfismi plastidiali è stata eseguita su 78 varietà italiane utilizzando 7 loci polimorfici (Hosseini-Mazinani et al., 2014).

### Risultati ottenuti

Essi sono stati in grado di discriminare solo 6 forme dette 'clorotipi', ma purtroppo la gran parte delle cultivar risultano indistinguibili tra loro perché tutte hanno lo stesso profilo plastidiale, corrispondente al clorotipo E1-1 e, tra le varietà umbre, solo il Tendellone (sin. Fecciaro, varietà minore usata come impollinatore e per la produzione di olive nere da tavola), contraddistinta da un clorotipo distinto (Mariotti et al., 2010).

## Azione 3. Accertamento della composizione varietale degli oli

Le attività svolte includono:

- Estrazione del DNA da olio di ciascuna cultivar selezionata ed in blend.
- Applicazione dei marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) varietà-specifici o quelli più efficaci a discriminare ciascuna varietà sul DNA estratto dagli oli derivati da ciascuna cultivar e da miscele tra due o più cultivar, in grado di comprovare quali siano le cultivar utilizzate per la preparazione dell'olio analizzato.
- Applicazione di una piattaforma ad elevata processività in grado di analizzare in multiplex decine di marcatori.
- Quantificazione delle percentuali di ciascuna cultivar nei blend di olio.

Marcatori specifici per comprovare l'assenza di eventuali varietà contaminanti (provenienti da altre regioni o di importazione estera comunitaria e non) verranno applicati sugli stessi oli. Applicazione in azienda o in frantoio del metodo rapido di analisi per l'accertamento dell'identità varietale degli oli (in collaborazione con RAPID Biotech).

### Analisi degli oli di oliva

Al fine di individuare le 6 cultivar umbre utilizzate per la produzione di olio extravergine di oliva dalle aziende coinvolte nel progetto, sono stati raccolti campioni di olio monovarietali prodotti dalle aziende stesse nella campagna 2013-2014, rappresentativi dell'intero territorio regionale e sono stati selezionati quattro oli monovarietali provenienti dalle province di Avellino, Caserta, Napoli e Salerno. La Tabella 7 mostra l'elenco degli oli monovarietali e l'area di produzione o di raccolta dei campioni.

Tabella t. Campioni di olio monovarietale di varietà umbre forniti dalle aziende coinvolte nel progetto (escluso l'olio di Borgiona, fornito dall'Az. Brunelli di Corciano). Sono riportati il nome della varietà, il nome dell'azienda e il comune.

Olio monovarietale	Azienda di produzione	Comune
Moraiolo	Az. Apolloni	Foligno
Moraiolo	Az. Decimi	Bettona
Moraiolo	Az. Petesse	Foligno
Dolce Agogia	Oleificio Pozzuolese (Enzo Fabrizi)	Pozzuolo
Frantoio	Az. Lottanti	Collazzone
Frantoio	Az. San Romualdo	Monte Castello di Vibio
Frantoio	Az. Benedetti	Foligno
Frantoio	Az. Petesse	Foligno
Leccino	Az. Petesse	Foligno
Leccino	Az. San Romualdo	Monte Castello di Vibio



Leccino	Az. Lottanti	Collazzone
Leccino	Az. Benedetti	Foligno
San Felice	Az. Decimi	Bettona
Raio	Oleificio Cooperativo di Amelia	Terni
Borgiona	Az. Brunelli	Corciano

Un set finale di 14 marcatori, composto da 5 SNP e 9 SSR tri-nucleotidici è stato scelto per condurre le analisi molecolari sugli oli di oliva, applicandoli al DNA estratto dall'olio delle stesse cultivar. Per l'analisi del DNA estratto dagli oli monovarietali, in conseguenza dell'esigua quantità ottenuta, è stato necessario procedere con una pre-amplificazione con primer esterni al frammento seguita da un'amplificazione nested con primer più interni. L'utilizzo della nested PCR ha permesso di ottenere amplificati perfettamente leggibili e quantificabili.

- Da ciascun campione di olio è stato estratto il DNA totale utilizzando un protocollo sviluppato presso l'Istituto di Bioscienze e Biorisorse (CNR-IBBR), U.O.S. di Perugia, basato su solventi chimici ed organici adatti per l'estrazione di DNA da matrici oleose.
- Il DNA estratto è stato sottoposto ad analisi molecolare impiegando:
  - marcatori plastidiali (Mariotti et al., 2010);
  - marcatori nucleari sviluppati su geni candidati in grado di discriminare la maggior parte delle cultivar commercialmente utilizzate a livello mondiale [SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) ed indels (insertion/deletion)];
  - marcatori SSR tri-nucleotidici.
- I prodotti delle amplificazioni PCR sono stati inizialmente corsi per elettroforesi capillare per verificare la reazione e sono stati poi corsi su sequenziatore capillare ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).
- Ciascun campione di DNA estratto da olio è stato sottoposto ad una doppia amplificazione: una pre-amplificazione con primer esterni al frammento da amplificare e una successiva amplificazione nested, con primer interni.
- Tutti i marcatori impiegati sono stati sviluppati nel nostro laboratorio e possono essere impiegati solo da noi (almeno fino a quando non verranno resi pubblici). Essi rappresentano gli strumenti di analisi più affidabili e discriminanti disponibili in questo momento per le cultivar di olivo, così come evidenziato dalle ultime ricerche internazionali sull'argomento e dalla letteratura scientifica.
- I profili molecolari, espressi in lunghezza ed in sequenza dei campioni analizzati, sono stati confrontati con quelli del DNA genomico delle varietà di olivo presenti nella banca dati del CNR-IBBR di Perugia (almeno 400 varietà da tutti i paesi olivicoli).

- In tutte le reazioni è stato aggiunto: 1 controllo positivo di DNA estratto da foglia della varietà Leccino, come riferimento; 1 controllo negativo, per escludere eventuali inquinamenti tecnici o ambientali.

Tutte le analisi sono state replicate su 2 estrazioni differenti per dimostrare la corrispondenza dei risultati.

Per ciascun campione di olio monovarietale, il DNA è stato analizzato sia per accertare la presenza della cultivar prevista che un set di varietà estranee a quelle umbre ed impiegate fraudolentemente, s varietà di altre regioni e di altri paesi (Spagna e Grecia).

### Risultati dell'analisi degli oli di oliva

Per tutti gli oli monovarietali analizzati è stata confermata la presenza della varietà dichiarata. L'unico problema è stato rilevato nel caso degli oli di Frantoio e di Leccino, ciascuno dei quali è risultato leggermente contaminato con olio dell'altra varietà.

E' stato sviluppato un metodo di analisi rapida della composizione varietale dell'olio che consente di ridurre drasticamente i tempi necessari per l'analisi, anche se risulta efficace solo per la conferma di oli monovarietali.

Il metodo consentirà di garantire l'origine esclusivamente umbra delle varietà presenti in bottiglia. La condivisione di alcune varietà umbre con altre regioni olivicole limitrofe non compromette in alcun modo l'efficacia del metodo perché le eventuali miscele derivano quasi esclusivamente con oli di importazione o con oli da taglio meridionali con composizioni varietali totalmente diverse e facilmente riconoscibili.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Acuna CV, Fernandez P, Villalba PV, García MN, Esteban Hopp H, Marcucci Poltri SN. Discovery, validation, and in silico functional characterization of EST-SSR markers in *Eucalyptus globulus*. TGG. 2012; 8: 289-301.
- Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeauffre J, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, et al. (2010) The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. BMC Plant Biol 10: 245.
- Alagna F., D'Agostino N., Torchia L., Servili M., Rao R., Pietrella M., et al. (2009) Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. BMC Genomics 10:399.
- Alagna F., Mariotti R., Panara F., Caporali S., Urbani S., Veneziani G., et al. (2012) Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. BMC Plant Biol., 12:162.
- Baldoni L., Cultrera N., Mariotti R., Pandolfi S., Blanco A., Montemurro C., et al. 2011. Caratterizzazione molecolare delle varietà di olivo. In: Progetto Interregionale OLVIVA. Pp. 10-21. Ed. Rete Interregionale per la Ricerca Agraria, Forestale, Acquacoltura e Pesca.
- Baldoni L., Cultrera N.G.M., Mariotti R., 2013. DNA tracking for the authentication of edible plant oils. In: Food Authentication Using Bio-organic Molecules. Ed. Stefano Sforza, DEStech Publications Inc. pp. 221-258.
- 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.
- Belaj A., del Carmen Dominguez-García M., Atienza S.G., Urdíroz N.M., De la Rosa R., Satovic Z., et al. 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DARts, SSRs, SNPs) and agronomic traits. Tree Genetics & Genomes 8(2):365-378.
- Besnard G., Hernandez P., Khadari B., Dorado G., Savolainen V., 2011 – Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. BMC Plant Biol., 11: 80.
- 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. Agric. Food Chem., 52(3):531-537.
- Budker V.G., Slattum P.M., Monahan S.D., Wolf J.A., 2002. Entrapment and condensation of DNA in neutral reverse micelles. Biophys. J., 82(3):1570-1579.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G., 2002. Identificazione di simple sequence repeats (SSR) 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 are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). Theor. Appl. Genet., 104: 223-228.
- Consolandi C., Palmieri L., Severgnini M., Maestri E., Marmiroli N., Agrimonti C., Baldoni L., Donini P., De Bellis G., Castiglioni B., 2008. A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, Multiplex PCR and LDR-Universal Array analysis. Eur. Food Res. Technol., 227:1429-1438.
- Cultrera NGM, Alagna F, Mariotti R, De Marchis F, Pompa A, et al.: Isolation and molecular characterization of three acyl carrier 5 protein genes in olive (*Olea europaea* L.). Tree Genet Genomes 2014, 10:895–909.
- De La Rosa C., James 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.
- Díez C.M., Imperato A., Rallo L., Barranco D., Trujillo I. Worldwide core collection of olive cultivars based on simple sequence repeat and morphological markers. Crop Science 2012; 52(1):211-221.

- Feng SP, Li WG, Huang HS, Wang JY, Wu YT. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mol Breed.* 2009; 23: 85-97.
- Galla G., Barcaccia G., Ramina A., Collani S., Alagna F., Baldoni L., et al. (2009) Computational annotation of genes differentially expressed along olive fruit development. *BMC Plant Biology*, 9:128.
- Geisler M, Venema K, Kühn C (2011) Sucrose transporters and plant development. In *Transporters and Pumps in Plant Signaling*. Eds. F. Baluska and J. Vivanco, pp. 225-251. Springer Berlin Heidelberg.
- Haouane H, El Bakkali A, Moukhli A, Tollon C, Santoni S, Oukabli A, et al. Genetic structure and core collection of the World Olive Germplasm Bank of Marrakech: towards the optimised management and use of Mediterranean olive genetic resources. *Genetica*. 2011; 139: 1083-1094.
- Heesacker A, Kishore VK, Gao W, Tang S, Kolkman JM, Gingle A, et al. SSRs and INDELs mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility. *Theor. Appl. Genet.* 2008; 117: 1021-1029.
- Huang H, Lu J, Ren Z, Hunter W, Dowd SE, Dang P. Mining and validating grape (*Vitis L.*) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping. *Mol Breed.* 2011; 28: 241-254.
- Li D, Deng Z, Qin B, Liu X, Men Z. De novo assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *BMC Genomics*. 2012; 13:192.
- Lima LS, Gramacho KP, Gesteira AS, Lopes UV, Gaiotto FA, Zaidan HA, et al. Characterization of microsatellites from cacao - *Moniliophthora perniciosa* interaction expressed sequence tags. *Mol Breed.* 2008; 22: 315-318.
- Mariotti R., Cultrera N.G.M., Diez C.M., 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.
- Mueller T., 2011. *Extra Virginity - The Sublime and Scandalous World of Olive Oil*. W. W. Norton & Company.
- Muleo R., Morgante M., Velasco R., Cavallini A., Perrotta G., Baldoni L. (2012). Olive Tree Genomic. In: *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. Innocenzo Muzzalupo (Ed.). pp. 133-148. ISBN: 978-953-51-0883-2, InTech
- Muñoz-Mérida A., González-Plaza J.J., Blanco A.M., del Carmen García-López M., Rodríguez J. M., Pedrola L., et al. (2013). De novo assembly and functional annotation of the olive (*Olea europaea*) transcriptome. *DNA research*, dss036.
- Rallo P., Dorado G. Martin A., 2002 – Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea L.*). *Theor. Appl. Genet.*, 101: 984-989.
- Sarri, V, Baldoni L, Porceddu A, Cultrera NGM, Contento A, Frediani M, et al. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome*, 2006; 49: 1606-1615.
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues dos Santos M., Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., 2000. identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea L.*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.*, 9: 1171-1193.
- Shiferaw E, Pè ME, Porceddu E, Ponnaiah M. Exploring the genetic diversity of Ethiopian grass pea (*Lathyrus sativus L.*) using EST-SSR markers. *Mol Breed.* 2012; 30: 789-797.
- Spaniolas S., Bazakos C., Ntourou T., Bihmidine S., Georgousakis A., Kalaitzis P., 2008b. Use of lambda DNA as a marker to assess DNA stability in olive oil during storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 227:175-179.
- Yang AH, Zhang JJ, Tian H, Yao XH. Characterization of 39 novel EST-SSR markers for *Liriodendron tulipifera* and cross-species amplification in *L. chinense* (*Magnoliaceae*). *Am J Bot.* 2012; e460–e464.

- Yao MZ, Ma CL, Qiao TT, Jin JQ, Chen L. Diversity distribution and population structure of tea germplasms in China revealed by EST-SSR markers. *Tree Genet Genomes*. 2012; 8: 205-220.
- Zhang M, Mao W, Zhang G, Wu F. Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley. *PloS One* 2014; 9: e94881.
- Zhu H, Senalik D, McCown BH, Zeldin EL, Speers J, Hyman J, et al. Mining and validation of pyrosequenced simple sequence repeats (SSRs) from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). *Theor Appl Genet*. 2012; 124: 87-96.
- Zhuang X, McPhee KE, Coram TE, Peever TL, Chilvers MI. Development and Characterization of 37 Novel EST-SSR Markers in *Pisum sativum* (Fabaceae). *Appl Plant Sci*. 2013; 1:1200249.