

## Attività 4 - Caratterizzazione genetica del materiale coltivato

### **4.1 Introduzione**

Lo zafferano è una specie triploide, sterile che non può essere migliorata mediante programmi di miglioramento genetico e pertanto viene riprodotta vegetativamente anno dopo anno dai corni (Schmidt et al 2019). La moltiplicazione del corno, tuttavia, non genera variazioni del genoma, ad eccezione di alcune mutazioni puntiformi che non sono facilmente rilevabili fenotipicamente. Nell'ultimo decennio, dato anche il ritrovato interesse per questa specie, sono stati usati diversi marcatori molecolari (RAPD, ISSR, AFLP e SSR) al fine di rilevare l'esistenza di un certo grado di diversità genetica (Rubio-Moraga et al, 2009; Nemati et al. 2012). Purtroppo le tecniche adottate, anche per la tipologia di riproduzione e di variabilità insita nei materiali, hanno prodotto risultati scadenti evidenziando l'esistenza di una limitata diversità genetica spesso non rilevabile nemmeno mediante marcatori molecolari. Nonostante questi risultati l'esistenza di una consistente variabilità fenotipica (fenologia, morfologia florale e caratteri produttivi) tra ecotipi di *Crocus sativus* coltivati in diverse aree geografiche ed in diverse condizioni climatiche è ampiamente riportata in letteratura (Baghalian et al., 2010; De-Los-Mozos-Pascual et al., 2010; Fernandez et al., 2011). Caratteri come lunghezza, peso secco e resa degli stimmi, numero di fiori, numero e peso fresco dei bulbi figli, peso secco delle foglie, potrebbero quindi essere influenzati dall'origine geografica dei bulbi e dall'ambiente di coltivazione. A questo proposito è stato riportato che ricercatori e coltivatori di zafferano hanno spesso osservato nei campi la presenza di variazioni fenotipiche instabili e reversibili come piante con un diverso numero di stimmi o con un diverso aspetto dei tepali (Fernández, 2004). E' noto che eventi stressanti e di adattamento possono indurre cambiamenti dell'espressione genica, talvolta ereditabili, spesso reversibili e collegati a meccanismi epigenetici di modificazioni istoniche e di cambiamenti di metilazione delle citosine.

Tutto ciò lascia ipotizzare che l'impiego di tecniche di analisi del DNA, come il sequenziamento, più sofisticate dei marcatori molecolari e in grado di rilevare differenze di singole basi e quindi anche piccole mutazioni puntiformi, possano fornire molte informazioni a livello genetico e risolvere le problematiche e le criticità nella rilevazione della variabilità genetica di questa specie.

Pertanto, la caratterizzazione genetica è stata condotta mediante analisi SNPs (polimorfismo del singolo nucleotide) usando la metodica MCSeEd (Methylation Context Sensitive Enzyme ddRAD), una tecnica di analisi dell'intero genoma basata su NGS (next generation sequencing) che permette di individuare differenze sia dello stato di metilazione dei vari individui e dei vari tessuti sia differenze di singole basi nel genoma.

### **4.2 - Collezione dei materiali vegetali**

L'indagine molecolare è stata condotta su materiale vegetale proveniente dalle aziende agrarie dei diversi partners del progetto PSR "Zafferano Puro e Certo", dalla World Saffron and Crocus Collection

(WSCC) sita nella Banca del Germoplasma di Cuenca (Spagna), dal campo sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali di Perugia (DSA3), dal WSCC, da cormi gentilmente concessi dal Dr. M. Busconi della Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza e dal Dr. I. Yousefi Javan del Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran.

Le foglie delle accessioni di zafferano (*Crocus sativus*) sono state raccolte al raggiungimento dei 10 cm di lunghezza, poste in buste separate, contrassegnate con il codice del campione e conservate a -80°C presso il Laboratorio di Genetica e Biotecnologie Genetiche Agrarie del DSA3 (Tabella 1). Unica eccezione ha riguardato l'azienda Le Fontanelle che non avendo cormi aziendali, causa problematiche imputabili sia ad attacchi fungini sia di roditori, ed avendo utilizzato i cormi acquistati presso l'azienda Mazzuoli anch'essa partner del progetto si è ritenuto di non caratterizzarne i cormi.

Tabella 1- Elenco dei materiali vegetali campionati ed analizzati					
Campione N°	Codice Laboratorio	Accessioni	Sito origine	Paese	Collezione
Z_1	MOR_3	Società Agricola RO.LO.	Foligno (PG)	ITALIA	
Z_2	MOR_4	Società Agricola RO.LO.	Foligno (PG)	ITALIA	
Z_3	MOR_5	Società Agricola RO.LO.	Foligno (PG)	ITALIA	
Z_4	VEN_2	Azienda Agricola Brunozzi Alfonsa	Gualdo Tadino (PG)	ITALIA	
Z_5	VEN_4	Azienda Agricola Brunozzi Alfonsa	Gualdo Tadino (PG)	ITALIA	
Z_6	VEN_5	Azienda Agricola Brunozzi Alfonsa	Gualdo Tadino (PG)	ITALIA	
Z_7	FIN_1	Azienda Agraria Porta Sole	Perugia	ITALIA	
Z_8	FIN_2	Azienda Agraria Porta Sole	Perugia	ITALIA	
Z_9	FIN_5	Azienda Agraria Porta Sole	Perugia	ITALIA	
Z_10	MAZ_1	Azienda Agraria Mazzuoli	Città della Pieve (PG)	ITALIA	
Z_11	MAZ_2	Azienda Agraria Mazzuoli	Città della Pieve (PG)	ITALIA	
Z_12	MAZ_4	Azienda Agraria Mazzuoli	Città della Pieve (PG)	ITALIA	
Z_13	GNP_2	Società Agricola Zafferano e Dintorni	Sant'Anatolia di Narco (PG)	ITALIA	
Z_14	GNP_3	Società Agricola Zafferano e Dintorni	Sant'Anatolia di Narco (PG)	ITALIA	
Z_15	GNP_4	Società Agricola Zafferano e Dintorni	Sant'Anatolia di Narco (PG)	ITALIA	
Z_16	VNB_2	Azienda Agricola Vinerbi	Città della Pieve (PG)	ITALIA	
Z_17	VNB_3	Azienda Agricola Vinerbi	Città della Pieve (PG)	ITALIA	
Z_18	VNB_4	Azienda Agricola Vinerbi	Città della Pieve (PG)	ITALIA	
Z_19	LIP_1	Alfonsi Annamaria	Nocera Umbra (PG)	ITALIA	
Z_20	LIP_2	Alfonsi Annamaria	Nocera Umbra (PG)	ITALIA	

Z_21	LIP_4	Alfonsi Annamaria	Nocera Umbra (PG)	ITALIA	
Z_22	BRS_1	Bariscano	Barisciano (AQ)	ITALIA	DSA3
Z_23	BRS_3	Barisciano	Barisciano (AQ)	ITALIA	DSA3
Z_24	BRS_4	Barisciano	Barisciano (AQ)	ITALIA	DSA3
Z_25	BSC_1	Busconi		ITALIA	
Z_26	BSC_2	Busconi		ITALIA	
Z_27	BSC_3	Busconi		ITALIA	
Z_28	TURC_1	BCU002472	Davutobasi (Safranbolu)	TURCHIA	WSCC
Z_29	TURC_3	BCU002472	Davutobasi (Safranbolu)	TURCHIA	WSCC
Z_30	TURC_4	BCU002472	Davutobasi (Safranbolu)	TURCHIA	WSCC
Z_31	IRANa_1	BCU001695	Ferdos (Khorasan)	IRAN	WSCC
Z_32	IRANa_2	BCU001695	Ferdos (Khorasan)	IRAN	WSCC
Z_33	IRANa_4	BCU001695	Ferdos (Khorasan)	IRAN	WSCC
Z_34	IND_2	WSCC	AMELIA	INDIA	WSCC
Z_35	IND_3	WSCC	AMELIA	INDIA	WSCC
Z_36	IND_4	WSCC	AMELIA	INDIA	WSCC
Z_37	FRNa_2	BCU002479	Carsaj (Pirenei)	FRANCIA	WSCC
Z_38	FRNa_3	BCU002479	Carsaj (Pirenei)	FRANCIA	WSCC
Z_39	FRNa_4	BCU002479	Carsaj (Pirenei)	FRANCIA	WSCC
Z_40	FRNb_1	BCU002864		FRANCIA	WSCC
Z_41	FRNb_2	BCU002864		FRANCIA	WSCC
Z_42	FRNb_4	BCU002864		FRANCIA	WSCC
Z_43	SPGa_1	BCU001672	Monreal del Campo (Aragon)	SPAGNA	WSCC
Z_44	SPGa_4	BCU001672	Monreal del Campo (Aragon)	SPAGNA	WSCC
Z_45	SPGa_3	BCU001672	Monreal del Campo (Aragon)	SPAGNA	WSCC
Z_46	SPGb_1	BCU001584	Minaya (Castillia la Mancha)	SPAGNA	WSCC
Z_47	SPGb_3	BCU001584	Minaya (Castillia la Mancha)	SPAGNA	WSCC
Z_48	SPGb_14	BCU001584	Minaya (Castillia la Mancha)	SPAGNA	WSCC
Z_49	ARG_1	BCU001751	Valle dell'Uco (Cuyo)	ARGENTINA	WSCC
Z_50	ARG_2	BCU001751	Valle dell'Uco (Cuyo)	ARGENTINA	WSCC
Z_51	ARG_3	BCU001751	Valle dell'Uco (Cuyo)	ARGENTINA	WSCC
Z_52	GRCa_1	BCU002911	Ano komi (Macedonia)	GRECIA	WSCC
Z_53	GRCa_3	BCU002911	Ano komi (Macedonia)	GRECIA	WSCC
Z_54	GRCa_4	BCU002911	Ano komi (Macedonia)	GRECIA	WSCC
Z_55	GRCb_1	BCU002930	Maguola (Macedonia)	GRECIA	WSCC

Z_56	GRCb_1	BCU002930	Maguola (Macedonia)	GRECIA	WSSC
Z_57	GRCb_1	BCU002930	Maguola (Macedonia)	GRECIA	WSSC
Z_58	GG_1	GG	Gorgain	IRAN	
Z_59	GG_3	GG	Gorgain	IRAN	
Z_60	GG_5	GG	Gorgain	IRAN	
Z_61	4_10_3	4_10	Ghasabeh (Khorasan)	IRAN	
Z_62	4_10_4	4_10	Ghasabeh (Khorasan)	IRAN	
Z_63	8_15_1	8_15	Gonabad (Khorasan)	IRAN	
Z_64	8_15_3	8_15	Gonabad (Khorasan)	IRAN	
Z_66	4_3_1	4_3	Ghasabeh	IRAN	

L'estrazione del DNA è stata realizzata mediante l'utilizzo del kit commerciale GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (Sigma Aldrich). La procedura di estrazione è stata sviluppata seguendo il protocollo standard indicato dalla casa produttrice. Il ricorso a kit commerciali per l'estrazione di DNA garantisce un livello elevato di purezza dello stesso ed elevata omogeneità dei quantitativi estratti. La presenza, la concentrazione e la qualità del DNA estratto, è stata verificata mediante un'elettroforesi su gel di agarosio all'1.0 % e successiva lettura spettrofotometrica mediante Nanodrop (ThermoScientific).

In un secondo tempo si è proceduto ad un'ulteriore quantificazione dei campioni mediante fluorimetro Qubit (Invitrogen). Lo strumento permette di misurare gli acidi nucleici e le proteine mediante la fluorescenza emessa da specifici fluorocromi che si legano quantitativamente alle diverse molecole. La sensibilità di questo strumento è molto più elevata e precisa rispetto a quella dello spettrofotometro e quindi più idoneo per misurare la concentrazione degli acidi nucleici di campioni da analizzare con tecniche costose come gli SNPs.

Sulla base dei dati ottenuti i singoli campioni di DNA sono stati diluiti ad una concentrazione di 300 ng/30µl e conservati in congelatore a -20° C.

Per l'analisi SNPs è stata usata la metodica MCS<sub>Se</sub>Ed che combina una doppia digestione con un enzima di restrizione sensibile alla metilazione, che nel nostro caso è stato PstI, e un enzima di restrizione insensibile alla metilazione (MseI). Poiché gli enzimi sensibili alla metilazione non possono digerire i siti metilati, ci si aspetta di saggiare regioni del genoma non ripetute incrementando di molto la possibilità di indentificare polimorfismi tra gli individui oggetto di analisi. MCS<sub>Se</sub>Ed consente di rilevare sia i cambiamenti di metilazione del DNA che di isolare SNP senza l'utilizzo del genoma di riferimento ed è grazie a questa strategia che si è potuta effettuare l'analisi genetica visto che il genoma di zafferano non è stato ancora reso disponibile alla comunità scientifica.

### 4.3 - Risultati

I frammenti di DNA (read) ottenuti dal sequenziamento Illumina delle librerie sono stati demultiplexati per mezzo del process\_radtags tool (STACKS v.1.19 package, Catchen et al., 2013) grazie alla sequenza barcode di 7bp che identifica in modo univoco il singolo individuo. Le sequenze di ogni libreria sequenziata sono state quindi analizzate con un approccio “genome-independent” cioè senza mappatura su un genoma di riferimento. Il genoma di *C. sativus* è stato sequenziato da pochi mesi ma purtroppo non è ancora disponibile e quindi non è ancora possibile assegnare gli SNP ottenuti nel presente lavoro ai rispettivi cromosomi.

Dall’analisi dei dati delle sequenze del DNA è stato possibile individuare circa 360.000 loci SNP che dopo successivi filtraggi per qualità, dati mancanti e coverage di sequenziamento del polimorfismo si sono ridotti fino a circa 55 mila. I dati così ottenuti sono stati analizzati mediante pacchetto adegenet implementato in R con procedure che hanno messo in evidenza la distribuzione sul piano dei principali marcatori genetici precedentemente isolati (test PCA, Figura 1) e la struttura genetica (test DAPC, Figura 2). I test genetici sopraindicati hanno evidenziato una variabilità genetica molto ridotta tale assunzione è dimostrata dal test PCA (Figura 1) dove oltre 50 dei 65 campioni analizzati sono stati raggruppati nella parte sinistra del grafico non mostrando differenze significative tra di loro. I restanti presentano minime differenze significative che li colloca sulla parte destra del grafico. In particolare, in questa parte sono stati raggruppati prevalentemente alcuni genotipi provenienti da Iran, India, Grecia, Spagna, Argentina e Francia. Inoltre, nello stesso raggruppamento sono presenti anche 2 dei 27 individui appartenenti alle accessioni italiane denominati BSC\_3 e BRS\_1 (Figura 1). La figura 2 mette in luce la struttura genetica di ogni singolo individuo appartenente alle popolazioni prese in esame dal progetto. Quello che emerge, considerando inizialmente le popolazioni italiane, è che la loro struttura genetica è piuttosto uniforme e anche se ci sono almeno 6 su 27 che presentano polimorfismi genetici che li rendono più simili a quelle spagnole e argentine (riferirsi ai colori della figura 2). Le accessioni più uniformi sono state quelle francesi mentre un certo grado di variabilità è evidenziabile in tutte le altre accessioni di non italiane in particolare tra quelle turche, greche e indiane. Ad esempio se si considerano le accessioni indiane è stato possibile evidenziare come le tre accessioni hanno differenze genetiche condivise con genotipi provenienti da Grecia (marrone) ed Iran (verde).

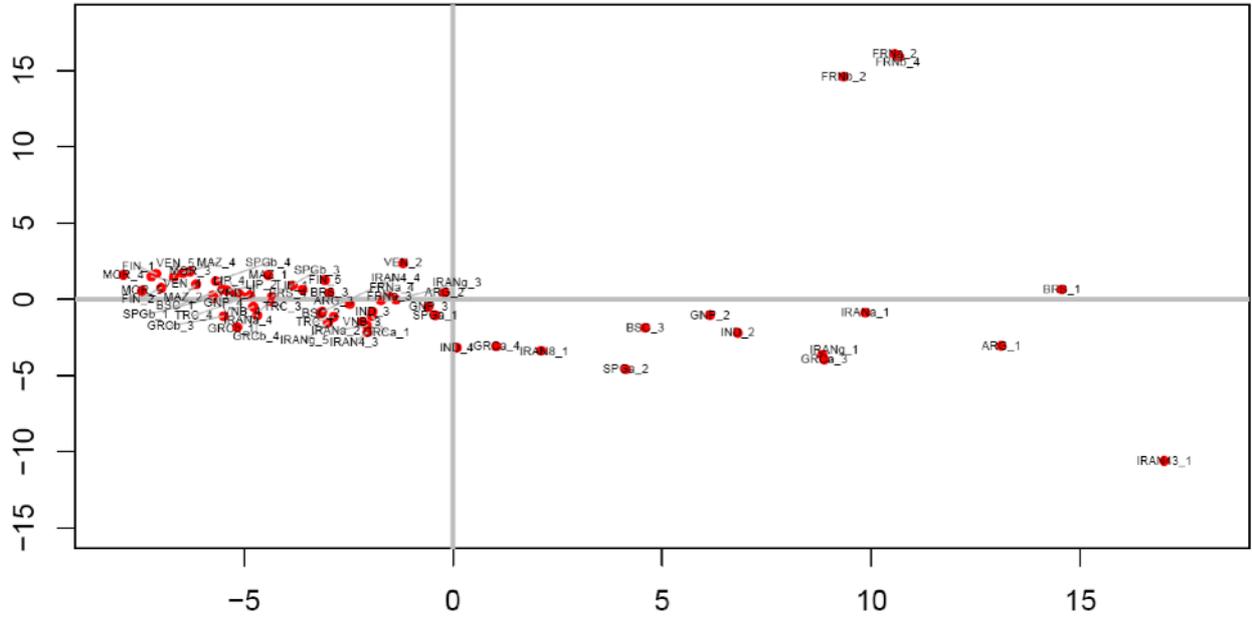


Figura 1 Analisi delle componenti principali sfruttando i circa 55.000 polimorfismi genetici identificati. Ogni pallino rosso rappresenta un singolo individuo dei 65 analizzati.

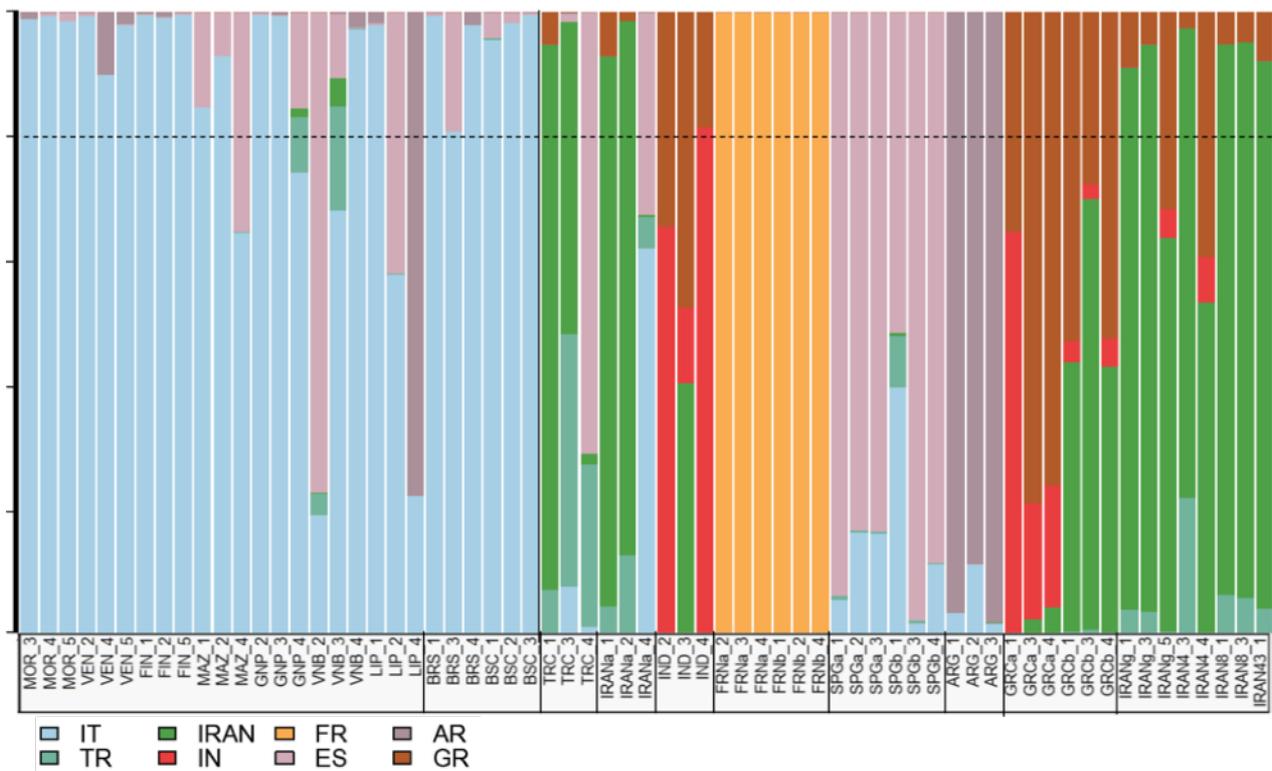


Figura 2. Analisi della struttura genetica delle 8 popolazioni oggetto di analisi.

Dei totali 55 mila SNP, 53 sono risultati specifici delle accessioni italiane provenienti sia dalle aziende partecipanti al Progetto che dalle due accessioni di controllo, Barisciano e Busconi (Tab. 1). Purtroppo nessuno SNP tra quelli specifici è presente in tutte le accessioni italiane e assente in tutti gli altri campioni provenienti dagli altri Paesi.

Ai fini di un loro utilizzo applicativo i marcatori specifici SNP di cui sopra potranno essere trasformati in marcatori facilmente utilizzabili per la tracciabilità dei prodotti umbri e italiani in generale. Tuttavia, allo scopo di completare il lavoro del presente progetto e trovare un metodo che sfruttasse i polimorfismi specifici presenti solo nelle accessioni italiane è stata condotta un'analisi discriminante, codificando i marcatori SNP, diallelici, in 0-1-2 per indicare per ognuno dei 53 marcatori i polimorfismi a ciascun locus in questo modo: 0=omozigote per l'allele di riferimento; 1=eterozigote con l'allele alternativo; 2=omozigote per l'allele alternativo.

La matrice dei dati molecolari così semplificata è stata analizzata mediante analisi discriminante utilizzando il software SAS. La procedura stepwise ha scartato 41 "marcatori" mantenendone 12, utilizzati in diverse procedure discriminanti non-parametriche poiché per la loro tipologia i dati non possono essere considerati normalmente distribuiti. Per le analisi sono stati utilizzati diversi metodi basati su altrettanti algoritmi: Nearest Neighbour con  $k=1$  e  $K=2$  (), Metodo Kernel () e Metodo Epanechnikov-Kernel (). I risultati ottenuti da tutti i metodi impiegati sono risultati tra loro coerenti. La Tabella 2 riporta la riclassificazione dei singoli individui sulla base delle funzioni discriminanti. Dalla tabella è possibile notare che i tre individui per accessione sono stati tutti correttamente riclassificati nelle rispettive accessioni di appartenenza, tranne per LIP (accessione Alfonsi) e BSC (Buscone). Confrontando questi risultati con quelli rappresentati graficamente in Figura 2, ottenuti con procedure diverse su tutti i campioni analizzati, è possibile notare che il profilo dei tre cormi dell'accessione LIP siano notevolmente diversi tra loro, e alcuni di essi simili ad accessioni provenienti da altri Paesi.

Al fine di rendere più comprensibile il risultato dell'analisi, nella Tabella 3 è riportata la matrice dei dati analizzati. Dalla matrice è possibile individuare facilmente la specificità dei tre genotipi appartenenti alla accessione MOR: sono tutti 1, eterozigoti GA al marcatore m008, e tutti 0, omozigoti per la base di riferimento in tutti gli altri marcatori; MAZ differisce da MOR al marcatore m031, tutti 1, eterozigoti GT, e tutti 0 per gli altri. VNB ha lo stesso profilo di MAZ al marcatore m031, ma differisce da questa accessione al marcatore m033. L'analisi utilizza anche combinazioni da diversi marcatori (vedi i profili di VEN e FIN). Infine, LIP e BSC hanno lo stesso profilo ed è per questo motivo che l'analisi discriminante non è riuscita a riclassificarli correttamente (vedi Tab. 2).

Tabella 2: Numero di individui (e percentuale) riclassificati in base alle funzioni discriminanti

da / in	BRS	BSC	FIN	GNP	LIP	MAZ	MOR	VEN	VNB	Altre	Totale
<b>BRS</b>	<b>3</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
<b>BSC</b>	0 (0)	<b>0</b> (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3 (100)
<b>FIN</b>	0 (0)	0 (0)	<b>3</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
<b>GNP</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>3</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
<b>LIP</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>0</b> (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3 (100)
<b>MAZ</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>3</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
<b>MOR</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>3</b> (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
<b>VEN</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>3</b> (100)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
<b>VNB</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>3</b> (100)	0 (0)	3 (100)

Tabella 3: Matrice dei marcatori utilizzati nell'analisi discriminante. In alto la base azotata di riferimento e quella alternativa presente in ciascuno polimorfismo SNP (marcatore indicato con m e un numero di riferimento). A sinistra i codici delle accessioni.

			Riferimento												
			G	G	T	G	C	G	T	G	T	T	G	G	
			Alternativo												
			T	A	G	T	T	A	G	T	G	G	A	T	
N	Pop	Bib	m006	m008	m013	m027	m028	m030	m031	m032	m033	m036	m041	m051	
1	MOR	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	MOR	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	MOR	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	MAZ	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
5	MAZ	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
6	MAZ	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
7	GNP	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	
8	GNP	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	
9	GNP	4	0	1	0	0	0	2	1	0	1	2	0	0	
10	VNB	2	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	
11	VNB	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
12	VNB	4	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	
13	VEN	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	VEN	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	VEN	5	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	FIN	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	FIN	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
18	FIN	5	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	
19	LIP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	LIP	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	LIP	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	BRS	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
23	BRS	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
24	BRS	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
25	BSC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26	BSC	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27	BSC	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

#### ***4.4 Considerazioni conclusive e rilevanza applicativa dei risultati***

Lo zafferano che viene oggi coltivato nel mondo è sempre stato propagato per via vegetativa. La sua natura triploide rende impossibile una propagazione per via sessuale e quindi per seme (la condizione triploide provoca sterilità gametica).

Ne consegue che le differenze di natura genetica tra le popolazioni di bulbi sono dovute principalmente all'accumularsi di mutazioni.

La caratterizzazione genetica dei materiali di origine umbra è stata difficile per via della poca variabilità evidenziata utilizzando marcatori molecolari di più largo impiego (SSR). Il ricorso a tecniche basate sul sequenziamento (SNP) ha dato dei risultati interessanti, ma che potranno essere convertiti in applicazioni pratiche ampliando i sequenziamenti: di fatto lo studio non ha evidenziato la presenza di un marcatore unico per tutte le popolazioni umbre e l'assenza dello stesso in tutte le altre utilizzate come un campione di controllo.

Come evidenziato in precedenza, i diversi marcatori specifici SNP dovrebbero prima essere trasformati in marcatori facilmente utilizzabili per la tracciabilità del prodotto. In altre parole, la tracciabilità del prodotto deve essere una combinazione di tracciabilità genetica e di processo produttivo, sintetizzato in un marchio, come anche i risultati del consumer choice indicano prediligere.

## Bibliografia

Baghalian, K.; Sheshtamand, M.S.; Jamshidi, A.H. Genetic variation and heritability of agromorphological and phytochemical traits in Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) populations. *Ind. Crops Prod.* 2010, 31, 401–406.

Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular ecology*, 22(11), 3124-3140

De-Los-Mozos-Pascual M, Santana-Méridas O, Rodríguez-Conde M.F, Sánchez-Vioque R, PastorFérriz T, Fernández JA et al. (2010) A preliminary characterization of saffron germplasm from the CROCUSBANK collection. *Acta Horticulturae* 850: 35–40.

Fernández JA (2004) Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science* 2: 127–15

Fernández JA, Santana O, Guardiola JL, Molina RV, Heslop-Harrison P, Borbely G et al. (2011) The World Saffron and *Crocus* collection: strategies for establishing, management, characterisation and utilisation. *Genet Resources and Crop Evolution* 58: 125–13

Nemati Z, Zeinalabedini M, Mardi M, Pirseyediand SM, Marashi SH, Khayam Nekoui SM (2012). Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus* (Iridaceae). *Am J Bot.* 2012 Sep;99(9):e340-3. doi: 10.3732/ajb.1100531

Rubio-Moraga A, Castillo-López R, Gómez-Gómez L, Ahrazem O (2009) Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC Research Notes* 2: 189. doi: 10.1186/1756-0500-2-189 PMID: 19772674

Schmidt T, Heitkam T, Lietke S, Schubert V, Menzel G (2019). Adding color to a century-old enigma: multi-color chromosome identification unravels the autotriploid nature of saffron (*Crocus sativus*) as a hybrid of wild *Crocus cartwrightianus* cytotypes

*New Phytol.* doi:101111/nph.15715