

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA VEGETALE
XX CICLO**

**Studio sulla variabilità genetica e sulla provenienza del
germoplasma di *Olea europaea* L. in Emilia**

Candidata
Deborah Beghè

Tutor
Prof. Andrea Fabbri

Coordinatore
Prof. Marcello Tomaselli

2008

A Luca

INDICE

I SCOPO DELL'INDAGINE	1
II INTRODUZIONE	3
1. <i>Classificazione botanica e origini dell' Olea europaea L.</i>	3
2. <i>Diffusione e percorso storico dell'olivo coltivato</i>	4
2.1. <i>L'olivo nella storia dell'agricoltura dell'Italia settentrionale</i>	10
2.2. <i>L'olivo nella storia dell'agricoltura emiliana</i>	18
2.2.1 <i>Inquadramento ambientale dell'olivo in Emilia</i>	27
3. <i>Biodiversità in olivo</i>	28
3.1 <i>Salvaguardia della biodiversità</i>	29
4. <i>Classificazione varietale</i>	31
4.1. <i>Cronologia dei sistemi di classificazione e marcatori morfologici</i>	31
4.2. <i>Marcatori biochimici e molecolari</i>	35
4.2.1. <i>Analisi ultrastrutturali</i>	36
4.2.2. <i>Marcatori biochimici: proteine e isoenzimi</i>	36
4.2.3. <i>Marcatori molecolari "genetici"</i>	37
4.2.3.1. <i>RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	39
4.2.3.2. <i>Tecniche basate sulla reazione PCR</i>	40
4.2.3.2.1. <i>RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)</i>	41
4.2.3.2.2. <i>AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)</i>	43
4.2.3.2.3. <i>VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)</i>	44
4.2.3.2.4. <i>SSR (Simple Sequence Repeat)</i>	44
4.2.3.2.5. <i>SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)</i>	46
4.2.3.2.6. <i>PNA (Acido Peptido Nucleico)</i>	47
4.3. <i>Utilizzo simultaneo di marcatori morfologici e molecolari</i>	48
III MATERIALI E METODI	49
1. <i>Origine del materiale</i>	49

1.1. <i>Piante secolari dell'Emilia: luoghi di ritrovamento</i>	49
2. <i>Descrizione morfologica</i>	55
2.1. <i>Prelievo del materiale e acquisizione dati</i>	61
3. <i>Caratterizzazione molecolare</i>	62
3.1. <i>Estrazione del DNA da foglie</i>	65
3.2. <i>Analisi con marcatori SSR</i>	70
3.2.1. <i>Analisi dei dati SSR</i>	72
4. <i>Caratterizzazione morfologica</i>	73
4.1. <i>Creazione di un modello per la caratterizzazione morfologica in ambienti eterogenei</i>	73
4.2. <i>Elaborazioni dati</i>	76
IV RISULTATI	77
1. <i>Descrizione morfologica</i>	77
1.1. <i>Schede elaiografiche</i>	77
2. <i>Caratterizzazione molecolare</i>	81
2.1. <i>Caratterizzazione del germoplasma emiliano e relazioni genetiche con cultivar nazionali ed internazionali</i>	81
3. <i>Caratterizzazione morfologica</i>	92
3.1. <i>Creazione di un modello per la caratterizzazione morfologica in ambienti eterogenei</i>	92
V DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	105
VI BIBLIOGRAFIA	125

Ringraziamenti

SCOPO DELL'INDAGINE

La presenza di documenti storici e il reperimento di piante di olivo, alcune delle quali plurisecolari, dimostrano che nel passato esisteva un'attiva olivicoltura lungo la fascia pedemontana dell'Emilia Romagna.

È nell'ottica della valorizzazione e della salvaguardia della biodiversità che nasce la necessità di attuare programmi di ricerca che portino ad un mantenimento del patrimonio olivicolo emiliano. Tuttavia, impostare una ricerca per la rivalutazione di specie e cultivar dimenticate al fine di ripristinarne la coltivazione è ammissibile solamente a patto che i genotipi in studio si dimostrino promettenti da un punto di vista economico.

È su questa linea che lo studio riportato nel seguente lavoro è stato diretto, svolgendo una attività di ricerca atta al reperimento, recupero, conservazione, identificazione e classificazione delle antiche piante di olivo delle province di Modena, Parma, Piacenza e Reggio Emilia. Gli olivi presenti oggi in Emilia sono sprovvisti di nome e la loro origine è ignota potendosi trattare di piante derivate da semine casuali o da ricacci di portinnesto. Inoltre le piante, come tutti gli organismi viventi, vanno incontro a mutazioni.

Uno dei punti fondamentali da cui questa ricerca non può prescindere è, quindi, la conservazione del germoplasma olivicolo autoctono, che si rende necessaria al fine di evitare la scomparsa di genotipi potenzialmente interessanti.

È quindi la classificazione di queste piante il punto di partenza per capire il processo di selezione e per stabilire un eventuale programma di miglioramento genetico.

Lo studio intende ottenere informazioni sul fenotipo e genotipo di ognuna delle accessioni rinvenute nel territorio emiliano.

Il ricorso all'elaiografia permette di realizzare una ricerca, mediante lo studio dei caratteri morfologici, in grado di individuare e distinguere le caratteristiche proprie delle piante. Il risultato di questo studio sarà la costituzione di una scheda elaiografica basata sui caratteri morfologici e la possibilità di discriminare le accessioni locali.

L'uso, invece, delle metodologie di caratterizzazione molecolare, che presentano una elevata stabilità e affidabilità, consente di far fronte all'esigenza di distinguere le distanze che intercorrono tra un genotipo e l'altro e di identificarne omonimie e sinonimie.

Una classificazione così condotta porta alla realizzazione di uno studio in grado di accomunare i vantaggi derivanti dalla descrizione morfologica e dall'identificazione molecolare.

Inoltre, la georeferenziazione e le tecniche molecolari saranno usate allo scopo di rilevare la migrazione dei genotipi di *Olea europaea* L. e quindi stabilire la provenienza del germoplasma olivicolo del territorio emiliano.

In parallelo la ricerca prevede l'elaborazione di un modello che permetta una caratterizzazione morfologica di *Olea europaea* L. sia in ambienti omogenei che in ambienti eterogenei, mediante l'utilizzo di quei caratteri meno influenzati dall'ambiente.

INTRODUZIONE

1. Classificazione botanica e origini dell' Olea europaea L.

L'olivo appartiene alla famiglia delle Oleaceae, che comprende circa 30 generi, a portamento arboreo o arbustivo e distribuiti nelle regioni temperate e subtropicali, alcuni dei quali di notevole valore ornamentale (*Fraxinus*, *Ligustrum*, *Jasminus* e *Syringa*).

Il genere *Olea*, a cui si ascrive l'olivo, comprende 35 specie e l'olivo (*Olea europaea* L.) è l'unica specie, tra le 600 che compongono tutta la famiglia, ad avere importanza agricola grazie alla commestibilità del suo frutto.

Molte sono le ipotesi sull'origine dell' *Olea europaea* L.; secondo alcune, tre specie non mediterranee avrebbero contribuito principalmente alla sua evoluzione: la presahariana *Olea laperrini* Batt. e Trab, la sud africana *Olea chrysophylla* Lam. e l'asiatica *Olea ferruginea* Royle (Simmonds, 1976); secondo altre ipotesi, invece, in nessuna delle specie affini non mediterranee sarebbero individuabili progenitori di *Olea europaea* L. (Zohary, 1994). Le più recenti ricerche rafforzano l'ipotesi che la specie si sia evoluta a partire da fenomeni di ibridazione interspecifica, seguiti da raddoppiamento cromosomico (Falistocco e Tosti, 1996).

L'*Olea europaea* L. viene suddivisa in 2 sottospecie: *Olea europaea* L. subs. *europaea* (o *sativa* Hoffm. et Link), cui fanno capo le numerose varietà coltivate, e *Olea europaea* L. subs. *sylvestris* Miller (o *oleaster* Hoffm. et Link), cui appartengono le forme spontanee, denominate comunemente oleastri (Zohary, 1994).

Le principali differenze morfologiche tra le due sottospecie sono nelle dimensioni dei frutti (mentre il peso medio di un'oliva varia tra 1 e 12 gr il peso medio di un'oliva selvatica raggiunge difficilmente gli 0,5 gr), nel rendimento grasso dei frutti (maggiore nell'olivo coltivato), nella dimensioni e forma della foglia (molto più piccole e tondeggianti nell'oleastro e più grandi e di forma ellittica-lanceolata nel coltivato, anche se questa differenza non è generalizzabile).

Le due sottospecie sono totalmente interfertili e mostrano, inoltre, lo stesso numero di cromosomi ($2n = 46$); occasionalmente sono stati ritrovati casi di piante triploidi e tetraploidi, nonché un caso di polisomia ($2n=55$) (Brevegli e Battaglia, 1954).

2. Diffusione e percorso storico dell'olivo coltivato

Sebbene, quindi, le origini dell'olivo siano tuttora oggetto di dibattito tra gli studiosi del settore, si pensa che l'olivo coltivato derivi per selezione e successiva propagazione vegetativa dall'olivo selvatico (Zohary, 1994).

La coltivazione dell'olivo inizia nel bacino Mediterraneo nelle aree tra il Caucaso, l'Asia Minore e il Medio Oriente, culla dell'attività agricola umana, e alla successiva diffusione dell'olivo domesticato verso occidente. Tale processo di diffusione, avvenuto proprio tramite la selezione, l'apprendimento delle prime tecniche di clonazione e il commercio è rappresentato in figura 1; le tappe fondamentali nella diffusione dell'olivo nel Mediterraneo si possono riassumere in tre successivi “*centri di diversificazione*”:

- l'area del Medio Oriente nel periodo tra il V e III millennio a.C.;
- la penisola ellenica e la zona del mar Egeo durante il III-II millennio a.C.;
- la Magna Grecia durante l'espansione della civiltà romana.

Secondo questa ipotesi, i capostipiti delle varietà di olivo oggi coltivate proverrebbero dal territorio montagnoso che si estende a sud del Caucaso, comprendente l'odierna Turchia orientale, l'Iran occidentale, Libano, nord Israele, Siria e nord Iraq, e che corrisponde al *centro primario di diversificazione* (Acerbo, 1937; Zohary, 1973).

Le antichissime origini dell'olivo coltivato sono testimoniate da reperti del neolitico, che attestano l'uso di olive come alimento, e dal ritrovamento di primitivi frantoi, rinvenuti in Siria e in Palestina. Queste tracce storiche confermano che l'utilizzo dei frutti di questa pianta risale almeno al 5000 a.C. (Zohary and Hopf, 1994).

In Israele sono stati ritrovati mortai di pietra, datati al V millennio a.C., in cui le olive venivano ridotte in pasta tramite la forza delle braccia. Particolari recipienti costituiti da rami d'olivo intrecciati (la cui forma ricorda l'attuale fiscolo in corda) e pietre sovrapposte venivano utilizzati per pressare la pasta d'olive.

Indizi risalenti al IV millennio a.C. attestano la coltivazione dell'olivo sulle coste e nelle isole del Mediterraneo orientale (Zohary and Spiegel-Roy, 1975).

La coltivazione dell'olivo è sicuramente attestata in siti archeologici databili al 3700 – 3500 a.C. (calcolitico): noccioli di grandi dimensioni e resti carbonizzati di legno d'olivo, usato per il fuoco o come materiale da costruzione, sono stati trovati a nord del mar Morto e sono prova della presenza di oleastri o di olivi (Zohary e Spiegel-Roy, 1975). Talvolta questi resti sono presenti in aree semidesertiche, dove l'olivo non avrebbe potuto crescere spontaneamente, e quindi testimoniano i primi sforzi umani per diffondere l'olivo coltivato.

Dall'Asia Anteriore l'olivo è stato successivamente diffuso in tutta l'area mediterranea, accompagnando senza eccezioni tutte le civiltà che nel tempo si succedettero: da quella egizia a quella minoica, per passare alle civiltà greca e fenicia.

In queste civiltà, l'olivo e l'olio da esso prodotto, ricoprirono un importante ruolo simbolico e ornamentale oltre che alimentare.

Gli Egiziani, intorno al 2300 a.C., ornavano le tombe dei faraoni con rami d'olivo, simbolo di vita e di fecondità. Teofrasto e Strabone menzionano estese coltivazioni di olivo nella zona di Tebe, del Fajjum e nei pressi di Alessandria, e la più antica documentazione in merito, nella storia dell'antico Egitto, riguarda il progetto del giardino di una villa della XVIII dinastia (1580 – 1320 a.C.) (Germano, 1998).

Da reperti archeologici (papiri) si apprende il volere di Ramses III (1198 – 1166 a.C.) di piantare degli olivi intorno al Tempio di Tebe (un'area di 2750 ha) la cui produzione doveva essere offerta al dio Ra (Bartolini e Petrucci, 2002). Rami di olivo sono inoltre scolpiti sui bassorilievi del tempio di Ramses II a Ermopoli, risalente al XIII secolo a.C.

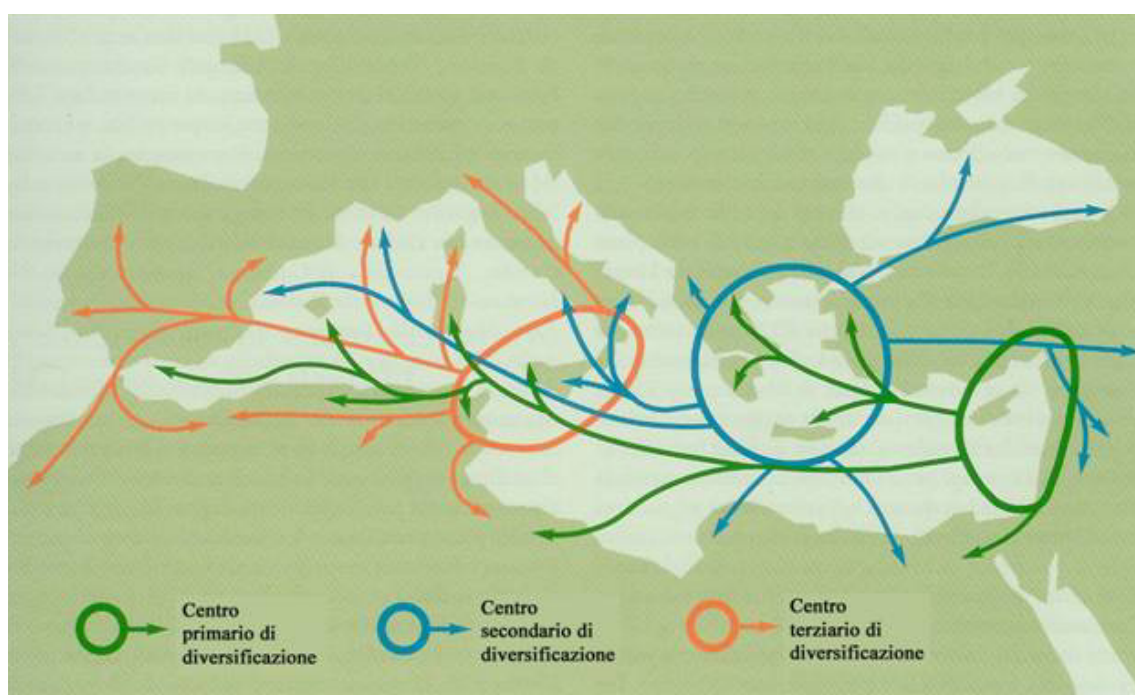


Fig. 1 – Diffusione dell'olivo coltivato (Simmons, 1974; Rallo et al., 2005).

Un altro importante reperto sono le tavole di argilla ritrovate a Ebla e risalenti al 2500 a.C., che testimoniano la produzione di olio ai tempi del re Minosse. Le tavolette d'argilla, che costituiscono gli archivi amministrativi e contabili, sono la più antica testimonianza scritta riferita all'olivo, all'olio e agli usi nel periodo di maggiore splendore della civiltà minoica (Sacchi, 1973).

Come a Creta e in Egitto, l'olivicoltura e l'uso dell'olio d'oliva erano apprezzati e ricercati anche in Mesopotamia. Ne sono testimonianza leggi sulla regolamentazione della produzione e del commercio dell'olio d'oliva contenute nel famoso Codice di Hammurabi (XVIII sec. a.C.).

Dal Mediterraneo orientale l'olivo fu diffuso verso occidente, in Grecia e negli arcipelaghi dell'Egeo, anche se Creta e Cipro vanno considerati come parte del centro più antico. In questa zona, considerata un *centro secondario di diversificazione*, l'olivo fu probabilmente oggetto di selezione da parte dell'uomo, in un periodo tra il III e il II millennio a.C.

Ne è esempio il ritrovamento di un deposito imponente di orci nella reggia di Cnosso, a Creta, risalente al XVI secolo a.C. e capace di immagazzinare quantità di olio pari a cinque volte il fabbisogno dell'isola. Questo ha fatto supporre che a quella data non solo la produzione, ma anche il commercio di olio fossero notevolmente sviluppati (Boardman, 1977).

Il ritrovamento di un antico frantoio, in pietra lavica, nell'isola greca di Santorini testimonia la grande cultura olivicola già presente in età micenea. Il frantoio è composto da una pietra concava dove si ponevano le olive, e da una pietra convessa, che ruotandovi sopra le schiacciava. La pasta di olive veniva immessa in cesti sovrapposti, che premendo uno sull'altro lasciavano fuoriuscire un liquido dalla cui decantazione affiorava l'olio.

Nello stesso periodo, molte popolazioni della Palestina erano ormai dedite all'olivicoltura: tra di esse quella che più ha lasciato resti di strutture per la trasformazione delle olive è la tribù dei Filistei. Le antiche origini dell'olivicoltura in Palestina sono testimoniate anche dalla presenza di alberi plurisecolari che si trovano nel luogo dove era situato l'orto del Getsemani.

La continua e sempre maggiore richiesta d'olio e di vino in Mesopotamia, Egitto ed Anatolia, determinò lo sviluppo e la prosperità delle zone costiere in cui era possibile coltivare olivo e vite. Il successivo trasporto degli oli, nei luoghi desiderati, veniva fatto in otri di pelle. In questo senso, un ruolo determinante ed essenziale fu assunto da Ebla, uno dei centri principali della rete commerciale carovaniere, che riforniva di vino e d'olio d'oliva l'Egitto, i centri mesopotamici e l'Assiria (le principali, e le più rilevanti, realtà economiche di quei tempi).

Alla coltura dell'olivo si dedicarono soprattutto gli abitanti dell'Asia minore e i Greci (questi ultimi, come testimoniano Plinio, Polluce e Teofrasto, erano riusciti a catalogare almeno una decina di varietà di olivo) che contribuirono anche alla sua diffusione nel resto d'Europa e non solo.

Regole precise stabilivano con grande minuzia anche gli aspetti concreti delle pratiche agricole, come l'allineamento e la distanza dei filari di olivi (<http://leonardodavinci.csa.fi.it>).

Prodotto pregiato, l'olio veniva utilizzato nella cosmesi e nella cura del corpo piuttosto che nell'alimentazione, come testimoniato in una notevole serie di citazioni letterarie. Ogni cittadino greco che frequentava il ginnasio consumava una quantità di olio stimata intorno ai 55 litri

annui: circa 20 litri venivano usati per l'alimentazione, circa 3 litri venivano usati per l'illuminazione, circa 30 litri per l'igiene corporea dell'individuo, circa 2 litri venivano usati in ambito religioso per riti spirituali e circa 0,5 litri per la farmacopea (<http://leonardodavinci.csa.fi.it>).

Lo sviluppo di un'intensa attività commerciale contribuì fortemente alla diffusione dell'olivo e dell'olio anche nella parte occidentale del bacino del Mediterraneo. La produzione olearia greca, assieme a quella fenicia, invase il Mediterraneo, trasportata in anfore ed otri in pelle. Ogni comunità greca del Mediterraneo utilizzava un diverso tipo di anfora, in modo tale che sui mercati si potesse immediatamente riconoscere la provenienza della merce.

L'olivo fu introdotto in un gran numero di luoghi, tra cui Spagna, Francia meridionale, Nord Africa, con risultati talvolta incerti (Germano, 1998).

Un passo importante nella diffusione dell'olivo nel bacino Mediterraneo ebbe luogo a partire dal primo millennio a.C., per merito delle colonie fenicie e greche, che introdussero la coltura dell'olivo in tutta la Magna Grecia (Sicilia e Calabria) e nel regno Cartaginese (odierna Tunisia). Questi territori sono considerati il *centro terziario di diversificazione* dell'olivo.

Stando al resoconto degli autori classici, il passaggio dell'olivo dal mondo greco a quello romano sarebbe avvenuto verso il VI secolo (Acerbo, 1937; Smartt and Simmonds, 1988); tuttavia esso beneficiò anche dell'influenza della civiltà Etrusca che possedeva vaste piantagioni nell'Italia centro-settentrionale (Boardman, 1977).

Dopo la fine della terza guerra punica (146 a.C.), la conquista di gran parte dei territori che si affacciavano sul Mediterraneo da parte delle legioni romane, e la loro trasformazione in un vasto, unico impero, rese le comunicazioni ed il commercio estremamente più intensi e sicuri. L'intero Mediterraneo fu coinvolto in un processo di diffusione dell'olivo, dando vita alla più importante area di interesse economico produttivo di questa coltivazione.

I romani diffusero, così, la coltivazione dell'olivo in numerose nuove aree, o la favorirono ove questa ristagnava, soprattutto quando l'Italia divenne incapace di supplire ai crescenti fabbisogni interni.

Il commercio dell'olio era, con quello dei cereali, il più importante, e veniva effettuato via mare e via terra. Documenti che testimoniano il commercio dell'olio sono le anfore betiche a Roma accumulate tra il I e il III secolo d.C. nelle vicinanze delle installazioni portuali sul Tevere (il cumulo del Monte Testaccio) (Aguilera Martín et al., 1999).

L'olivicoltura crebbe quindi di importanza, e raggiunse l'apogeo nel II-III secolo d.C., soprattutto nel nord Italia (Imberciadori, 1983), ma anche in Spagna, Dalmazia, Provenza: la produzione, il commercio e il consumo dell'olio d'oliva crebbero in modo significativo,

contemporaneamente allo svilupparsi dell'organizzazione della proprietà terriera e dell'apparato politico e amministrativo dello Stato.

In età romana furono introdotti alcuni importanti perfezionamenti nella tecnologia olearia. Numerose opere latine di agronomia scritte a partire dal II secolo a.C. da Autori come Catone, Columella, Plinio, ed altri, indicavano ai proprietari terrieri le migliori forme di coltivazione da adottare nei loro possedimenti e tutti gli opportuni accorgimenti nelle pratiche di potatura, concimazione, raccolta e lavorazione delle olive: dalle varietà più adatte alla potatura, all'epoca e ai sistemi di raccolta fino alle tecniche di frangitura. Sono proprio gli antichi Romani a introdurre i primi sistemi di classificazione dell'olio; l'olio di oliva, a seconda della qualità, veniva classificato in cinque categorie: "oleum ex albis ulivis" proveniente dalla spremitura delle olive verdi, "oleum viride" proveniente da olive a uno stadio più avanzato di maturazione, "oleum maturum" proveniente da olive mature, "oleum caducum" proveniente da olive cadute a terra e "oleum cibarium" proveniente da olive quasi passite che era destinato all'alimentazione degli schiavi.

Al tempo dei romani l'olio era indispensabile anche nel mantenimento e sostentamento dell'esercito, e per questo occorreva che la sua produzione e commercio fossero il più possibile distribuiti sul territorio dell'impero. Note di S. Giannini affermano che "l'olio nell'organizzazione romana ha un valore strategico: la legione romana (circa 30000 uomini) consumava "olio", i legionari mangiavano farro macinato, il "*boletum*" o salsa di pesce sott'olio, formaggi sott'olio e ulive, poca cacciagione, e tutti i giorni si lavavano con l'olio! Una legione ha un enorme consumo di olio, quasi mezzo chilo a testa di olio al giorno. Proprio per questo motivo, per primi i romani, estendono ai limiti nord la coltivazione dell'olivo (Liguria, sud Francia, Istria...). Il mondo romano è uno straordinario produttore di olio".

A causa dell'attenzione delle ricche famiglie patrizie romane per questo prodotto pregiato, la richiesta di olio nella capitale crebbe a dismisura. Si pensi che durante il regno di Costantino (IV secolo d.C.) esistevano in Roma 250 forni per il pane e ben 2300 distributori di olio, che veniva poi utilizzato per una varietà di scopi (per cucinare, per la cosmesi, per i massaggi e la cura del corpo alle terme, per la palestra, per accendere le lucerne, ecc.).

Dopo il trasferimento della capitale da Roma a Costantinopoli, operata da Costantino nell'anno 326 d.C. e soprattutto dopo la caduta dell'Impero, i controlli statali sul commercio dell'olio iniziarono a scemare. I grandi oleifici cessarono di funzionare e grandi organizzazioni di distribuzione si sfaldarono; mancando la struttura imperiale, diminuirono traffici e commerci.

La fine del mondo romano e l'avvento delle popolazioni barbare fecero diminuire il consumo di olio, e con esso l'abitudine a diffonderne la coltivazione, la produzione e il commercio.

Il Medioevo conobbe un'agricoltura diversa, non tanto impegnata nel commercio quanto rivolta al sostentamento. La coltura dell'olivo venne ridimensionata, con conseguente diminuzione della diffusione, mentre i terreni migliori venivano dedicati alla produzione di cereali di base e vino.

Relativamente al nostro paese, nuovi incentivi alla piantagione dell'olivo si ebbero in epoca alto-medievale grazie al benefico apporto dei Benedettini i quali estendendo la loro influenza in agricoltura (per donazioni di campi e piantagioni) imponevano ai loro affittuari la coltivazione dell'olivo (soprattutto per il suo valore religioso).

Dopo l'anno Mille l'olivo tornò ad essere, grazie soprattutto agli ordini religiosi, una coltura diffusa e importante. Gli oliveti aumentarono in tutta la penisola, soprattutto in Toscana, dove la borghesia commerciale scoprì nella produzione e nel commercio dell'olio d'oliva una fonte importante di guadagno.

A partire dal secolo XIV, l'avvento di un clima più freddo distrusse gran parte del patrimonio olivicolo e solo nel 1600, specialmente in Toscana per volere dei Medici, si ebbe una ripresa della coltivazione dell'olivo e della produzione di olio.

I mercati del nord nel corso degli anni riservarono sempre più accoglienza al prezioso olio, e mentre si impiantavano nuovi oliveti in Italia, le Repubbliche Marinare di Genova e di Venezia iniziarono a commerciare per mare il nobile condimento. In particolare l'Italia meridionale fu soggetta a grandi trasformazioni, che videro l'aumento degli impianti e della produzione destinata ad un'importante esportazione.

La destinazione principale dell'olio d'oliva durante il Medioevo non fu tuttavia quella alimentare bensì quella liturgica, in quanto il severo rispetto delle Sacre Scritture imponeva che lampade poste sugli altari potessero essere alimentate solo dall'olio d'oliva.

Il XVIII secolo, con la scomparsa del feudalesimo, vide anche la fioritura di un più libero mercato dell'olio, e l'aumento dei profitti tratti dal suo commercio. Questo ridiede slancio alla diffusione del prodotto italiano. In particolare erano oggetto di commercio vari tipi di olio: quello di provenienza orientale era impiegato soprattutto a scopi industriali (per esempio per lavare le lane, come lubrificante, o per l'illuminazione), mentre gli oli italiani, più fini, venivano utilizzati a scopo alimentare.

Dal XIX secolo in poi, l'olivicoltura italiana incontrò periodi altalenanti di sviluppo e successivo ridimensionamento, a causa delle alterne vicende storiche e politiche dei regni italiani. Tuttavia essa venne mantenuta viva dalle classi contadine e dai governi con la volontà di salvaguardare un prodotto di cui l'Italia è diventata, oggi, il più pregiato produttore del mondo. Attualmente la diffusione dell'olivo nel mondo interessa la fascia temperata dei continenti, quella che va dal 30° al 45° parallelo nord e la zona corrispondente dell'emisfero Sud.

Senza dubbio la zona di maggiore importanza, per la coltivazione dell'olivo, è il bacino del Mediterraneo con ben il 92,1% del totale di superficie dedicati all'olivicoltura nel mondo (FAOSTAT, 2004) e con la produzione media di 2,3 milioni di tonnellate di olio (Plan National de Regadios-Horizontes 2008, <http://www.mapya.es/desarrollo/pags/pnr/documentos/apartado3-5.pdf>).

Tuttavia, si produce olio anche negli Stati Uniti (California e Arizona), in America meridionale (Messico, Cile, Perù, Argentina e Antille), in Sudafrica, in Estremo Oriente, in Russia e in Ucraina, in Australia e in Nuova Zelanda.

Negli ultimi anni infatti si è assistito ad un deciso incremento delle produzioni e dei consumi di olio di oliva. I principali paesi produttori hanno aumentato la loro produzione, ma non hanno incrementato allo stesso modo i consumi complessivi, confermando un crescente trend di espansione geografica dei consumi verso nuovi paesi.

I volumi consumati dai nuovi paesi consumatori sono naturalmente molto ridotti rispetto ai paesi tradizionali, ma le prospettive sono positive. Va segnalato inoltre che gli Stati Uniti sono diventati il principale importatore mondiale.

Le ragioni di questa tendenza sono molteplici: è riconosciuta all'olio d'oliva una valenza nutrizionale e salutistica che riceve continue conferme dal mondo scientifico.

2.1. L'olivo nella storia dell'agricoltura dell'Italia settentrionale

Le notizie relative alla presenza dell'olivo coltivato a Nord degli Appennini sono scarse e discontinue, segno evidente che la coltura di questa specie arborea non può che essere stata contraddistinta, pur con alti e bassi, da superfici sempre contenute e da vicende contrastanti che ne hanno influenzato la sopravvivenza.

Tuttavia, l'ipotesi più accreditata stima l'introduzione dell'olivo in tali regioni ancor prima dell'epoca romana, ad opera degli Etruschi.

Gli Etruschi, esperti agricoltori, avrebbero importato la coltura dell'olivo attraverso la direttrice commerciale Mediterraneo – Valle del Reno, via Brescia, Bergamo e Como sfruttando la linea navigabile che dall'Adriatico, mediante i fiumi Po e Mincio, sbocca nel Garda. Questa ipotesi è avvalorata dai siti archeologici del V secolo a.C. che rivelano una città etrusca sulle rive del Mincio a sud di Mantova, presso Bagnolo San Vito (Bassi, 2003).

L'epoca di introduzione dell'olivo a Nord, d'altronde, è difficile da stabilire, in quanto l'inizio della colonizzazione etrusca della valle del Po centro occidentale risale alla prima metà del

primo millennio a.C. e per alcuni gli Etruschi si sarebbero spinti fino al Piemonte sin dagli inizi di tale colonizzazione (Cavallero, 2006).

La prima segnalazione storica risale a Saserna, georgico latino appartenente ad una famiglia di agricoltori di origine etrusca che conducevano terre di loro proprietà nel piacentino.

Questi scrisse, all'inizio del I secolo a.C., un trattato agronomico di cui ci rimangono frammenti riportati da Columella (*De agricultura*, 1,5) e da cui emerge che nel Nord Italia il clima era molto mutato rispetto al passato, tanto che regioni in cui era prima impossibile coltivare la vite e l'olivo erano, ai tempi dell'Autore, ricche di "pingui oliveti e vigneti" (Pinna, 1996). In effetti sappiamo che vi fu un periodo di relativo riscaldamento tra il III sec. a. C. e il III sec. d. C. (Pinna, 1996).

Ritrovamenti carpologici, di residui vegetali e studi di archeopalinologia testimoniano la presenza di *Olea europaea* L. in Lombardia in età romana (Castelletti et al., 2001).

La cultura dell'olivo si diffonde quindi nei secoli successivi, ad opera dei romani, e con essa anche la tecnica di estrazione, produzione e commercio di olio; testimonianze di un'intensa attività di trasformazione sono i ritrovamenti di resti di frantoi in ville rurali, come la villa di Desenzano, risalenti all'epoca romana. Di epoca analoga sono gli scritti di Flavio Cassiodoro (V–VI secolo d.C.), politico e scrittore romano, che attestano la presenza di folti oliveti sulle sponde del Benaco (Bassi, 2003); allo stesso periodo risale la prima testimonianza di olivi presenti in Val d'Aosta (Donnas, Verrès, Pont S. Martin e sulla riva sinistra della Dora), si tratta di un atto di donazione del 515 d.C. dove Sigismondo, re di Borgogna, appena convertito al cristianesimo dal chierico gallo-romano Alciminius Ecditus Avitus, dona varie terre tra le quali oliveti in Valle d'Aosta (Cavallero, 2005); altri oliveti sono segnalati nell'attuale Cantone Vallese (Donna, 1944). Sempre dello stesso periodo sono documenti di compravendita che parlano di oliveti a Classe (RA) e in altre zone della provincia.

L'olivo non sembra però molto diffuso nell'Italia padana in età romana, grazie alla facilità di trasporto da altre regioni dell'Impero. I pochi olivi esistenti sono colpiti dalle profonde devastazioni provocate dalla guerra greco-gotica prima, e dalla discesa dei longobardi poi. Sono proprio i longobardi a riconoscerne l'importanza e a favorirne la diffusione.

L'olivo entra nel paesaggio agrario del Nord Italia e diventa, in questo periodo, una pianta abbastanza importante, tanto che nel VII secolo l'editto di Rotari prevede addirittura multe a coloro che danneggiano piante di olivo.

Nel secolo successivo (VIII) le tracce storiche si intensificano: numerose sono quelle relative alla segnalazione di olivi ai laghi di Lugano (Campione), di Como, d'Iseo e di Garda (quest'ultimo, che nei primi secoli dell'era cristiana non pare interessato dalla coltura, diviene nel giro di pochi secoli una delle più importanti aree di produzione olearia dell'alto medioevo).

Cominciano a nascere i primi toponimi: nella laguna veneta esiste un villaggio chiamato Olivola.

Lo storico bresciano Paolo Guerrini ricorda che la Pieve di Manerba nel IX secolo fu un territorio della Badia di Leno e che proprio i monaci di Leno dissodarono tali paludi e colline per impiantarvi vigne e olivi (Bassi, 2003). Documenti tra il IX e X secolo testimoniano la presenza dell'olivo anche nel nord-est del Piemonte, nella zona dei laghi e delle odierne province di Verbania e Novara: dell' 885 sono documenti che menzionano olivi sul Mont'Orfano nei pressi del lago di Mergozzo, e del 1148 per la Val d'Ossola.

È del periodo tra i secoli IX e XI la menzione, in atti notarili, di oliveti nel novarese, nel piacentino e nel bresciano; sembra inoltre che nel tardo medioevo l'olivicoltura arrivasse fino al Cremonese, probabilmente lungo le sponde del Po (Castelletti et al., 2001).

Altri toponimi, relativi all'olivicoltura, nascono numerosi e successivamente scompaiono: è il caso di una località in Valpolicella (presso Pozzo di Val di Marano), che nel 1084 fu detta Olivo (Toniolo, 1914), di Castro Oliveto e Corte Monte Oliveto nel reggiano (1115) e dell'ancora esistente Madonna dell'Uliveto presso Borzano (RE). Numerosi sono anche i toponimi che nello stesso periodo sorgono in Friuli-Venezia Giulia, alcuni dei quali sono rimasti fino ai nostri giorni: Ronco degli Ulivari, Braida degli Olivi, Oleis (quest'ultimo dà il nome ad un intero paese), ecc. (Battigelli, 2002).

Nel 1151 Vincenzo di Praga descrivendo la marcia verso Garda dell'esercito di Federico Barbarossa, scrive che egli progrediva "*inter olivas splendidissimas*" e che vide cadere "*olivas preciosissimas ad focum et ad equorum stabula...*" (Toniolo, 1914).

Sono attestati, in nord Italia, nei secoli IX e X gli oliveti dei vescovati di Verona, Vicenza e Reggio Emilia, dei monasteri di S. Colombano di Bobbio, S. Giulia di Brescia, S. Martino di Tours, e di quelli veronesi di S. Zeno e S. Maria in Organo (Varanini, 2000). Oltre il Piave, pur se varie fonti letterarie (Strabone V, 1,8) documentano l'importanza di Aquileia come centro per il commercio di olio in età romana, la prima documentazione certa sulla presenza dell'olivo coltivato in Friuli risale al 1140; si tratta di una donazione a un monastero (Battigelli, 2002).

L'olivo ormai è ampiamente diffuso e nei secoli XII e XIII sono numerosissime le segnalazioni di oliveti in tutto l'arco della pianura padana (Fig. 2) :

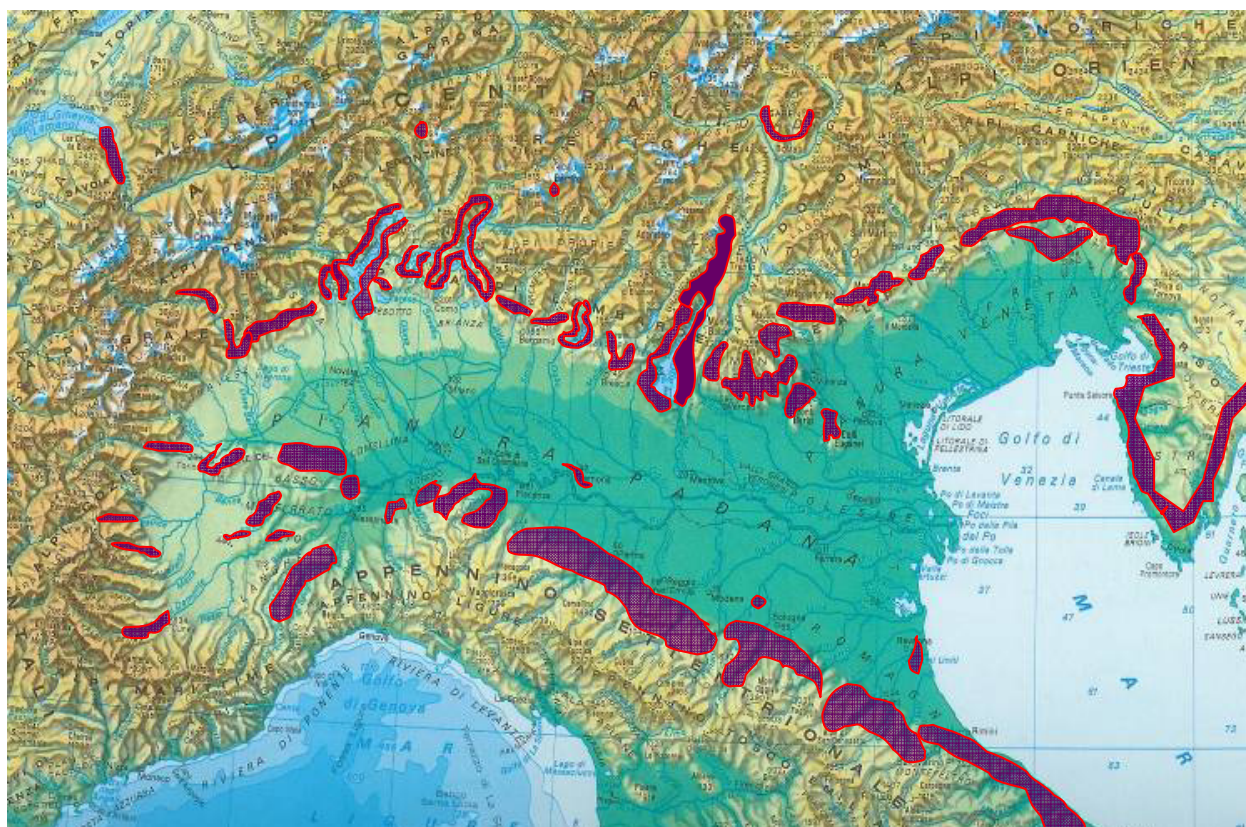


Fig. 2 – Presenza dell’olivo nell’Italia settentrionale accertata mediante documenti storici. Le zone evidenziate indicano le aree storicamente interessate dalla coltivazione dell’olivo

○ Olivi sono coltivati in Piemonte, dal Canavese e Biellese (Ivrea, Chiaverano, alture di Biella), dove numerosi sono i documenti e catasti tra il ‘200 e il ‘700, alla zona di Torino, dove oliveti sono segnalati a Castelvechio di Moncalieri, a Rivoli, in Val Susa e Val Pellice (anche se si pensa che nella Val Pellice, come riferisce uno studio del Malan (1935/38), l’olivo fosse stato introdotto dalla vicina Provenza, fra il 1545 e 1564).

La massima diffusione della coltivazione dell’olivo in Piemonte si verifica nella seconda metà del XIII, allorché molti statuti prevedono l’obbligo della piantagione di olivi nella fascia pedemontana che va dalla Langa al Monferrato, fino ad arrivare, verso nord, ad aree con microclimi più compatibili al loro sviluppo quali il lago di Viverne, il lago d’Orta e le xerofile valli di Susa. Olivi sono stati coltivati anche in provincia di Cuneo nel Saluzzese, nell’Albese (Vezza d’Alba) e a S. Stefano Belbo, nel Monferrato e in provincia di Alessandria, se devono far fede toponimi nei comuni di Avolasca e Frassinello. Un documento del 20 febbraio 1167 attesta l’arrivo degli ulivi a Rocca delle Donne: Guglielmo, marchese di Monferrato, effettuò la donazione di vari ulivi alla Chiesa ed in particolare al Monastero di Santa Maria della Rocca, che aveva vari possedimenti a Maranzana ed a Ronco. L’importanza assunta nel Monferrato casalese dell’ulivo tra l’XI ed il XIII secolo è testimoniata dalle lotte giuridiche durate parecchi

decenni tra i comuni di Gabiano, Fontanetto, Palazzolo e Rocca delle Donne per il possesso di un vasto territorio denominato Giara o Oliveto, e nel quale venivano coltivati gli ulivi.

Documenti tra il X e il XV secolo testimoniano la presenza della coltura dell'olivo sul lago Maggiore (Cànnero, Griffa, l'isola maggiore delle Borromee, nominata come "*insula olivarum*" nel 998), e sul lago D'Orta (Cureggio e Gozzano). Molti ulivi dovevano essere coltivati nelle aree rivierasche del novarese, dove la presenza di olivo, nel XII e XIII secolo, coincide esattamente con la curva climatica favorevole. In quel periodo il Vescovo Giovanni de Urbe, rinnovando l'invito ad impiantare ulivi e mandorli nei terreni agricoli nella misura di una pianta per ciascun "sestario di pertica", minacciò di infliggere multe severe ai trasgressori: ben 5 soldi imperiali per ogni pianta omessa.

A Ivrea un editto del 1329 proibiva la vendita di piantine da olio ai forestieri, ed un altro del 1341 obbligava i proprietari di terreno di superficie superiore ad uno iugero nei territori comunali di Bollengo, Palazzo, Burolo e Piverone a piantare 10 alberi d'olivo e mandorlo.

A Torino il 7 febbraio 1369 è emesso un ordinato che impone di piantare ulivi e mandorli a chiunque abbia vigne; gli Statuti Criminali di Chieri, dello stesso secolo, impongono gravi multe a chi estirpi, rubi o danneggi piante di olivo, e se non può pagare "*ponatur ad berlinam sine remissione per tres dies continuos*" (Gribaudo, 1897).

La presenza di ulivi nel Canavese è testimoniata nel secolo successivo: infatti un editto del 1449 stabiliva premi ai proprietari di oliveti in produzione, mentre a Chiaverano uno statuto sanciva tra le varie norme le distanze da rispettare tra i terreni privati e le strade, citando l'olivo tra i diversi alberi di medio fusto. Ancora nel XV secolo il catasto di Chivasso riportava nei comuni di Vestignè, Strambino e Parella alcuni toponimi come Regione d'oliva e Giardino d'oliva (Cavallero, 2005).

- In Lombardia, la presenza dell'olivo si ha maggiormente intorno ai laghi Maggiore, di Lugano, di Como, d'Iseo e del Garda, ma anche su molte pendici collinari prealpine; in particolare quelle della provincia di Brescia sono cosparse di ulivi (Cherubini, 1985).

- Nelle Venezie la coltivazione si spinge ben più a Nord del lago di Garda e della piana del Sarca, per arrivare fino al laghetto di S. Massenzio e nei dintorni di Bolzano (Valle dell'Adige) (Cherubini, 1985).

Relativamente abbondanti sono gli ulivi sui colli veronesi e vicentini, sui colli Berici ed Euganei fino a Bassano e alle pendici della Valle del Brenta, località quest'ultime nelle quali la coltura dell'olivo non si è mai interrotta, ed anzi sta conoscendo una vigorosa rinascita. In atti di locazione del 1238, riguardanti i possedimenti di S. M. in Organo nella Valpantena (VE), si menziona l'affitto di due poderi, uno con viti e ulivi, e l'altro solo a ulivi (Toniolo, 1914). Lo Statuto di Castelnuovo Veronese sull'anfiteatro morenico gardense del 1260 contiene un

capitolo in cui si minaccia una grossa multa contro chi “...*faciet ire aquam oliue in alienas terras*”, cioè per chi utilizzava, per l’irrigazione, l’acqua di vegetazione derivata dalla spremitura delle olive (Toniolo, 1914). Documenti relativi a Panego (1334) e Clozago (1343) nel veronese testimoniano la presenza di olivi anche in queste zone (Toniolo, 1914). Una locazione di mezzadria del 1458 nel veronese fa obbligo al mezzadro di non seminare sotto gli olivi, il che dimostra che vi erano anche dei veri oliveti specializzati.

○ Oltre il Piave nei secoli (XII-XV) i documenti divengono numerosi, anche se le superfici e produzioni riportate restano modeste, segno evidente, in fondo, dell’importanza attribuita alla coltura e al prodotto. La coltivazione dell’olivo appare presente su tutto l’arco pedemontano che va dalle alture occidentali della provincia di Pordenone, i primi contrafforti delle Prealpi Carniche, alle Prealpi Giulie, passando per l’anfiteatro morenico posto tra S. Daniele, Gemona e Udine. Nel Collio, in particolare, l’olivo sembra aver trovato un ambiente relativamente favorevole, tanto che nel secolo XIX vi si produceva ancora olio; attività che ha iniziato a rifiorire solo negli ultimi decenni.

Le alture di Gorizia e Monfalcone continuano la sottile striscia di coltura che, attraverso la ben posizionata area triestina, confluisce nella tradizionale olivicoltura istriana.

La coltivazione dell’olivo ha senza dubbio fatto parte dell’agricoltura dell’Italia padana per un lungo periodo storico, nel quale ha costituito una presenza, se non eminente da un punto di vista quantitativo, sicuramente continua e di particolare pregio.

L’olivicoltura padana raggiunge, come abbiamo visto, la massima diffusione nel periodo che va dal secolo XII alla prima metà del secolo XIV (Pini, 1980). Questo a causa dell’interesse delle classi dirigenti ad estenderne la coltura. Innumerevoli sono gli Statuti, gli Editti e le Ordinanze che obbligano gli agricoltori a piantare olivi, tra quelli non ancora nominati, si possono ricordare: quello della Valsolda (Lago di Lugano) del 1246 (Toniolo, 1914), di Parma del 1258 (Bianchedi, 1880), di Castelnuovo Veronese del 1260 (Toniolo, 1914), di Vicenza del 1264 (Toniolo, 1914), di Este (Colli Euganei) del 1276 (che rinnovava un precedente statuto del 1212 che obbligava i coloni a piantare 12 piante per villa) (Toniolo, 1914), di Novara del 1276 – 1286, di Riviera d’Orte del 1357, fino alle sovvenzioni offerte dal comune di Torino nel 1377 a chi avrebbe piantato olivi sulle rive del Po (Bianchedi, 1880; Toniolo, 1914; Donna, 1944; Pini, 1980).

Ricordi della coltivazione dell’olivo si trovano sempre più frequenti nel sec. XV in tutto il distretto del Garda e del veronese, dove fino a quel momento, favorita dalle leggi, doveva aver raggiunto una grande estensione (Toniolo, 1914).

Nello stesso periodo (XV – XVI secolo) la zona del Garda produce tanto olio che può esportarlo nelle zone di Bergamo, Mantova e nei paesi del nord, passando dal Trentino verso la Germania;

e Marco Dandolo nel 1629 scrive *“la riviera un anno per l’altro rende sei et più milla mozi di oglio del quale se ne ispedisce per Alemagna circa moza quattromila et del rimanente parte ne va a Brescia et parte si consuma in servizio di quelli sudditi”* (Lanaro Sartori, 1992).

Testimonianze del Gallo e del Clementi evidenziano che in Lombardia, già dal periodo rinascimentale, l’utilizzo intensivo delle colline moreniche spinse ad importanti opere di terrazzamento utilizzate per la coltura di vite, olivo e agrumi (Bassi, 2003).

In Piemonte le fortune dell’olivo sembra siano durate a lungo: almeno fino alla fine del XIV secolo l’olivo risultava ben presente in tutto il Piemonte, e veniva segnalato a Buttigliera, Camino, Ceresole d’Alba, Corneliano e sicuramente in tutto il Roero, che si stava risollevando dalle lotte con Asti, dedicando ogni forza alla coltivazione delle alture, dove gli abitanti si erano dovuti trasferire. A Gabiano e Montiglio gli uliveti erano frequenti, ma la presenza di olivi era segnalata anche a Villadeati, Vignale, Viale, Viarigi, Ozzano, Revigliasco, Rosignano, Lu, Santo Stefano Belbo, Sinio e perfino a Murazzano, posta in alto, ma soleggiata e dolce (Fabbri, comm. pers.).

Nel 1566, in occasione del pranzo offerto per l’incoronazione di Pio V, sono servite, come ghiottoneria, olive di Tortona.

Alcuni studiosi ritengono che ancora all’inizio del ‘700 in Piemonte fosse più diffusa l’olivicoltura che la viticoltura, e comunque l’olio d’oliva era certamente prodotto in quantità considerevole, sia per uso alimentare, anche se meno dell’olio di noci, sia come olio da lampada per la illuminazione. Ancora nel 1800 l’abate Goffredo Casalis compila una nutrita lista di località piemontesi in cui si coltiva l’olivo (Pini, 1980).

Tuttavia questa spinta fu arrestata da una serie di fattori avversi: uno di essi fu senza dubbio il crollo demografico dovuto al peggioramento del clima e alle carestie che ne seguirono, e quindi alle pestilenze di cui quella di metà secolo XIV fu solo la più famosa e devastante. Molti villaggi vennero abbandonati e quindi anche parte dei terreni meno produttivi, favorendo le culture alimentari di base.

Da un punto di vista climatico dalla metà del ‘500 alla metà dell’800 poi si ebbe il periodo climaticamente peggiore, quella che è chiamata Piccola Era Glaciale; anni caratterizzati da forte abbassamento medio delle temperature, al quale l’olivo è sensibile.

Emblematiche sono le “Cronache Spilimberghesi”: “Nell’anno 1432 il freddo seccò gli olivi insieme agli allori e agli alberi di fico” (Zamparutti, 2004). Un resoconto analogo si ha per Cividale nel 1490 (Battigelli, 2002). Da questo si deduce tra l’altro che l’olivo era presente anche in pianura, e in una zona sfavorita geograficamente; questa presenza dell’olivo in pianura o in presenza di rilievi appena accennati non riguarda solo Spilimbergo, ma altre zone del nord; alcune erano favorite dalla vicinanza del mare, quali Aquileia, Jesolo, Venezia, ma in altri casi

(Cremona, Malerba, S. Giovanni in Persiceto) era stata la mitezza del clima a spingere la coltura in zone oggi inimmaginabili.

Ma più che da avvenimenti climatici, l'olivo fu ostacolato da eventi socio – economici: si stava uscendo dal medioevo, la classe dei mercanti si espandeva e con essa i commerci e le comunicazioni. A rendere più difficoltosa la produzione in loco di olio di oliva fu il verificarsi della differenziazione dei noli, per cui il costo del trasporto delle merci non era più legato al peso o all'ingombro, ma al loro valore: questo rendeva il trasporto a distanza di prodotti agricoli meno costoso, e veniva a cadere la convenienza a produrre derrate che venivano prodotte a costi minori altrove. Rientrava in questa tipologia di derrate l'olio di oliva. Così, via via che gli olivi, per varie ragioni, scomparivano, non venivano rimpiazzati, ma piuttosto sostituiti da colture arboree di più pronta entrata in produzione e di sicuro reddito: la vite e il gelso.

Alla decadenza della coltura locale contribuì anche la nuova politica economica iniziata nella prima metà del sec. XVII dalla Repubblica di Venezia, la quale, mentre favoriva la coltivazione dell'olivo sulle coste e le isole del suo impero Mediterraneo, aggravava con provvedimenti fiscali la coltura degli olivi sulla terraferma, per mantenere il mercato alla produzione più abbondante e sicura delle terre d'oltremare; il rifornimento di olio nell'entroterra cominciò quindi a dipendere sempre più da Venezia.

In alcune zone del Veneto (valli d'Illasi, del Chiampo e dell'Agno) la produzione andò, nell'XIX secolo, declinando soprattutto per motivi economici: infatti la costruzione della ferrovia facilitò la concorrenza di altri oli importati dalla Toscana e dalle Puglie (Toniolo, 1914; Lanaro Sartori, 1992). Ovviamente si tratta di un fenomeno che non può non aver interessato tutta l'Italia Settentrionale, e che si è completato in epoca recentissima (sec. XX). Verso il 1840 aveva cominciato anche ad apparire il *verme o mosca dell'olivo* (*Bactrocera oleae* Gmelin), insetto che recò gravi danni alla produzione dell'olio (Clementi, 1847). La comparsa della mosca rappresentò un motivo di sostituzione degli olivi con specie più redditizie (gelso e vite) nel vicentino.

Quando i commerci si intensificarono ulteriormente la stentata olivicoltura padana continuò ulteriormente a regredire o, più esattamente, a concentrarsi e a svilupparsi nelle zone più adatte: laghi lombardi, colline veronesi, vicentine, padovane e romagnole. In queste zone è sopravvissuta fino ad oggi.

2.2. L'olivo nella storia dell'agricoltura emiliana

L'introduzione dell'olivo in Emilia Romagna sembra sia avvenuta ad opera dei romani.

Ne è testimonianza un ritrovamento archeologico, avvenuto nel 1977, nelle colline reggiane (Cervi, 1992). Gli ambienti riportati alla luce durante lo scavo hanno permesso di dimostrare che la costruzione in oggetto doveva appartenere alla *pars fructuaria* di una fattoria o "villa rustica"; un locale mostra ancora ben chiari i segni distintivi di un frantoio, mentre l'ambiente adiacente, contiene i resti di quattro dolii di media capienza. La localizzazione e la struttura di queste stanze rappresenta la realizzazione di quello che si evince nel trattato "*De Architectura*" (libro VI – cap. IX) di Vitruvio: "...la cella olearia deve essere collocata in modo da ricevere luce da mezzogiorno, cioè dalle regioni calde: perché l'olio non deve gelare ma anzi affinarsi col calore", confermando la destinazione d'uso degli stessi. Inoltre manufatti, oggetti e monete hanno permesso di datare la villa in oggetto come risalente al I secolo d.C. (Cervi, 1992).

Altre indagini, di tipo archeobotanico, hanno segnalato tracce di polline di *Olea europaea* L., risalenti al I a.C. e al V-VI secolo d.C., presso San Giovanni in Persiceto (Bologna) (Marchesini, 1998; Baldini, 2003).

E' lecito, dunque, ipotizzare che con l'impero romano si è verificato l'inizio della diffusione della coltivazione dell'olivo in Emilia, anche se in modo casuale e sporadico. La mancanza di una sufficiente documentazione sull'estensione della coltivazione dell'olivo in età romana e la nota longevità della pianta non permettono di valutare in maniera adeguata quanti oliveti ancora presenti nell'alto medioevo siano stati piantati al tempo di Roma Imperiale (Imberciadori, 1975). Diventa quindi difficile determinare con precisione l'epoca in cui è stato introdotto l'olivo attualmente presente in Emilia Romagna.

La ricerca attraverso leggi, editti, bandi, rogiti, e inventari ha permesso di ripercorrere e datare le alterne fasi in cui questa coltivazione ha acquistato o perso rilevanza nella vita delle collettività umane e nel paesaggio agrario emiliano romagnolo.

Tra la prima testimonianza sicura e le successive, intercorrono circa cinque secoli: il ritrovamento di un vasetto in legno di olivo del V-VI secolo d.C presso Bazzano (Marchesini, 1998) e la provata presenza di oliveti nel riminese nel 541 d.C (Pini, 1980) sono le uniche prove sicure che attestano la presenza dell'olivo in questa epoca. La scarsissima diffusione dell'olivo nella pianura padana in età romana fu dovuta al fatto che l'olio, utilizzato soprattutto come fondo di cottura e come combustibile per l'illuminazione, veniva facilmente trasportato da altre regioni dell'impero. Questa è una possibile motivazione della distanza di ben cinque secoli dalla precedente testimonianza.

Gli anni compresi tra la fine dell'impero e il primo medioevo furono caratterizzati da una forte crisi agricola che portò ad incrementare lo sviluppo locale di questa coltivazione.

Nel medioevo l'olio era principalmente utilizzato per l'illuminazione e per scopi liturgici, mentre per cucinare era diffuso l'uso dei grassi animali, soprattutto nel nord Italia.

Abbastanza informativa è la documentazione alto medioevale relativa all'Italia padana: in un atto notarile dell'ottavo secolo (776) presente nelle carte nonantoliane, si hanno accenni di un oliveto situato nei pressi di Monteveglio, tra il modenese e il bolognese (Gaudenzi, 1916), ed in particolare lo si individua in una località qui detta "Casale Sociolo", la quale verrà di seguito denominata Oliveto (Pini, 1980). In questo atto notarile dell'ottavo secolo, il Duca Giovanni da Persiceto trasferiva al monastero di Nonantola la proprietà di alcune terre "*in pago Montebelio*" (Monteveglio) specificando che la località era "*oliveto circumdato*" (Passeri, 1978).

In questo stesso territorio la coltivazione dell'olivo fu attestata anche da altri documenti quali, ad esempio, una donazione del duca Orso datata 30 dicembre 789, un analogo atto del vescovo Warino datato 15 luglio 1016 (Baldini, 2003) e un documento di donazione da parte di Carlo Magno a favore della Chiesa di Modena. In questo ultimo documento, datato 822, viene chiaramente specificata l'elargizione dell'oliveto sito presso il castello di Monteveglio (Vicini, 1931).

Una carta di livello dell'878 può far pensare alla presenza di un oliveto nel piacentino. In questo documento è infatti previsto un canone di olio, così come il polittico Bobbiese del X° secolo lo faceva supporre nel parmense. In particolare questa testimonianza, seppur frammentaria, ha la particolarità di specificare la produzione di olio di questo oliveto, che si aggira intorno alle 500 libbre (Pini, 1980).

In questo periodo storico sempre con maggiore frequenza vi sono passaggi di proprietà, a causa del sistematico avvicendamento gerarchico, tipico del Medioevo. I documenti redatti in seguito agli accordi presi spesso rilevano la presenza di toponimi direttamente collegati all'olivicoltura. È il caso di Castro Oleriano che viene ceduto al comitato di Parma nel 944 (Rombaldi, 1978). In provincia di Reggio Emilia, nei dintorni di Albinea, si ha una presenza inequivocabile di oliveti, confermata da diverse testimonianze: quella di Enrico II di Germania, in un diploma del 1002, ancora nominato nel 1072 da Papa Alessandro II, che conferma al monastero di S. Prospero la proprietà di "S. Maria di Pissignano coll'oliveto attiguo", che solamente un anno dopo, nel 1073, il vescovo reggiano Gandolfo cita come "S. Maria de Oliveto". L'attività principale di questi monaci doveva essere la coltivazione dell'olivo, pianta che "abbondava nelle vallate, di Montericco e di Borzano, esposte a mattina e riparate dai venti e dai geli" (Corradini, 1979). Ancor oggi si possono vedere, in queste zone olivi che per secoli hanno fornito prezioso olio alle

lampade delle chiese reggiane e rametti ai parrochiani di Montericco nel periodo pasquale (Corradini, 1979).

Altra località del territorio matildico in cui si produce olio è Cortenova nel 1102; inoltre in una carta di precario del monastero di Nonantola del 1115 si citano Castro Oliveto e Corte dei Monti Oliveti (Rombaldi, 1978).

Un provvedimento del 1136, disposto dall'arcivescovo di Ravenna, da cui allora dipendeva la chiesa di Bologna, accordò ai canonici di Santa Maria del Reno il privilegio su tutti i possedimenti di cui essi già godevano nel territorio bolognese, comprese alcune "...vineas et oliveta..." (Baldini, 2003).

Pagamenti in olio sono menzionati in alcuni contratti agrari del 1161 relativi al territorio di Montecatone (Baldini, 2003), mentre documenti che risalgono ai secoli XII e XIII accennano alla coltivazione dell'olivo in terreni di proprietà della canonica di San Cassiano (Imola) (Mancini et al., in Baldini 2003).

Nell'atto di compravendita (n°553) conservato nell'Archivio Capitolare del Duomo di Reggio, si legge di una vendita "in Vergnano il 29 dicembre 1212, di una terra con ulivi" da parte di Guido fu Marclochi da Borzano (Basenghi e Pellini, 2003). Pellini, nella sua monografia *Alberi nella storia di Reggio* (1996), scrive che il prodotto derivato dalla frangitura delle olive veniva utilizzato in svariati modi: per la liturgia, la medicina, la farmacopea, l'illuminazione di ambienti sacri, per la lavorazione di tessuti e del sapone. Testimonianze della presenza di questa specie sono ancora oggi presenti nei pressi della Chiesa vecchia di Montericco di Albinea (denominata appunto "Madonna dell'Uliveto"), nei pressi del Castello di Bianello e nella zona di Canossa.

Il raggiungimento della massima diffusione dell'olivicoltura nell'Emilia Romagna, come del resto in tutta l'Italia del nord si ha probabilmente tra il tredicesimo e il quattordicesimo secolo, vari atti citano gli olivi di Miserazzano e gli strumenti che venivano usati per estrarre l'olio (Pini, 1980)

Nel tredicesimo secolo, la coltivazione dell'olivo nel parmense è testimoniato dal fatto che se ne fa menzione al pari di colture risaputamente più importanti: nel "*1234 il freddo fa gelare le viti i fichi e gli uliveti*" (Dall'Acqua e Lucchesi, 1979). È proprio il freddo una delle cause dell'alternata presenza degli olivi nell'Emilia; il monitoraggio del clima dal XII al XVII secolo nel bolognese (Masini, in Baldini, 2003), e successivamente fino ai giorni nostri (Baldini, 2003), segnala il verificarsi di eccezionali eventi climatici (taluni fuori stagione) con particolare riguardo alla temperatura e alle nevicate (Tab. 1).

Tab. 1– Eventi meteorologici critici verificatisi in Emilia dal XII al XX secolo.

Anno	Descrizione evento
1199	5 – 7 Agosto: fu cosa insolita veder scendere per tre giorni la neve con inestimabile freddo.
1234	22 Dicembre: fu un verno tanto freddo che agghiacciò nelle botti il vino e si seccarono moltissimi alberi e quasi tutte le viti. Nei territori di Parma nel 1234 il freddo fa gelare le viti i fichi e gli uliveti (Dall’Acqua e Lucchesi, 1979).
1269	24 Agosto: in questo giorno cadè tanta neve che venne alta due piedi (75 cm).
1344	3 – 4 Maggio: fu gran pioggia che, convertendosi in neve, gagliardamente fioccò con eccessivo freddo.
1359	18 Novembre: nevò sei giorni e sette notti di continuo di maniera che la neve si alzò quattro braccia (250 cm) da terra e molte case e chiese rovinarono.
1380	24 Settembre: cadette tanta neve che venne alta più di due piedi (75 cm) e cagionò estremitissimo freddo.
1455	18 Giugno: fu gran freddo e nevò di modo che fece gran danno alli raccolti delle campagne (Masini, in Baldini, 2003).
1587	6 Giugno: dal cielo cadde neve in modo tale che per qualche ora stette coperta la terra (Masini, in Baldini, 2003).
1594	14 Aprile: nevò tutto il giorno e la notte ancora e la neve venne molto grossa e grandissimo freddo che fece moltissimi danni alle campagne e particolarmente alle uve e ai frutti de’ quali ne fu carestia (Masini, in Baldini, 2003).
1608	11 Febbraio: la neve venne altissima che mai più fu veduta tanto ingrossata (Masini, in Baldini, 2003).
1644	9 Maggio: nevò in modo tale che sopra terra si alzò poco meno d’un palmo (20 cm) e la notte seguente fu ghiaccio e brina che grandemente danneggiarono le campagne e massime le viti (Masini, in Baldini, 2003).
1709	Gennaio: per lo freddo (-20°C), oltre la gran quantità di viti si seccarono di più infiniti piedi di nuce, moltissimi di fico, perciò quest’anno se ne sono veduti pochissimi e questi assai cari, come altresì le olive, i melaranci, i cedri e simili agrumi (Macchiavelli, in Baldini, 2003). Il freddo durò 16 giorni tale che gelò tutti gli olivi, noci e anche querce, e un’infinità d’altri alberi e tutte

	le viti del reggiano, guastallese, mantovano e una parte del parmigiano (Pellini, 1996).
1829	12 Febbraio: la galaverna (-9 °C) accompagnata da un “gran nevone” che causò seri problemi per il traffico e i commerci cittadini e gravi danni all’edilizia e all’agricoltura (Bortolotti, 1958).
1830	Gennaio (-16.9°C) e Febbraio (-11.6°C).
1858	Febbraio (-10.4°C)
1893	Gennaio (-11°C)
1894	Gennaio (-10.6°C)
1929 - 1930	Inverno (-22°C): dopo il rigido inverno nessun ulivo di età matura perì, quantunque molti altri alberi fruttiferi perissero sotto la mala influenza di quella dura stagione; viceversa le piccole e giovani pianticelle si disseccarono a piè di terra rigermogliando poi per la maggior parte nella successiva primavera, contro ogni aspettazione dei nostri inesperti agricoltori che le credettero irrimediabilmente perdute e ne atterrarono non poche, tanto che fu d’uopo in seguito impedirlo anche con severe minacce (Brunetti, 2001).
1947	(-11.6°C)
1956	Febbraio (-20.1°C)
1968	(-10.4°C)
1985	Gennaio (-20°C)

La presenza dell’olivo in provincia di Parma è attestata sia da testi storici che da reperti archeologici. Fu appunto nel 1258, secondo quanto dettato dagli statuti comunali di Parma, il cui originale si trova in pergamena nell’Archivio di Stato, che il podestà Giberto Da Gente impose ai conduttori di terreni in collina l’obbligo di piantare 20 piante d’olivo (xx pedes olivarum) in 29 specifiche “villae” nel primo anno e 10 in seguito. Si sottoscrissero inoltre le pene gravanti per i trasgressori. Si giunse ad emettere la legge senz’altro per ridurre le importazioni di olio dagli stati limitrofi. Nella legge si indicano le zone dell’intervento (si riporta il nome integrale in latino): “*Traversetulum, Bazanum, Guardaxonum, Rivalia, Mulazanum, Lesignanum, Langhiranum, Torclarea, Casaticum, Arolis, Castrum de Felino, Sancti Vitalis Bagantiae, Nivianum, Furnovum et omnes aliae terrae ultra Taronum*” (Bianchedi, 1880).

Le motivazioni che hanno spinto i governanti di allora a tale scelta sono riconducibili alla situazione economica dell’epoca. Infatti, così facendo ci si poteva rendere autonomi ed

indipendenti dall'importazione di olio in particolar modo dalla Liguria. Da considerare, inoltre, le numerose difficoltà dei trasporti d'allora, soprattutto per valicare gli Appennini (il passo della Cisa fu aperto solo nel 1820).

In seguito Bianchedi, nel 1880, scrive che “dopo qualche lustro si videro le coste di molti dei nostri colli floride e popolate d'olivi che vi prosperarono per oltre due secoli”, fenomeno influenzato positivamente da un periodo caratterizzato da un aumento delle temperature.

Nel 1300 due Autori bolognesi, Pier De'Crescenzi e Paganino Bonafede, scrivono due trattati agronomici di rilevante successo ed entrambi dedicano particolare attenzione all'olivo. Paganino Bonafede, nel suo “*Thesaurus rusticorum*” del 1360, dà un'ampia e originale descrizione della pratica dell'innesto come metodo di propagazione ma sostiene che per l'olivo è preferibile la propagazione per talea; inoltre Paganino dà consigli anche sulla potatura e sulla concimazione.

Per tutto il medioevo la valle del Reno fin verso Vedegheto fu “*coperta di oliveti*” (Rabbini, 1999).

Un documento del 1387 testimonia che in Albinea (*ad Puzalium*) si affittava per cinque anni una terra “casamentiva, clausurativa, vineata, olivata, figata”, cioè una casa, chiusa con vigna, olivo e fico (Pellini, 1996). Sulle colline reggiane compaiono, in questo periodo, terreni coltivati a ulivo e fichi; una di queste località è addirittura chiamata Figarium “*una pecia terre figate clausurate et olivate*”. Nel 1390 si danno a mezzadria per un anno, rinnovabili, sei bif.¹ di terra lavorativa “*olivata figata in loco dicto ad Figarium*”, nel documento viene specificato che “il mezzadro darà metà del grano, olio e fichi, ricevendo cinque fiorini in auxilium laborandi” (Pellini, 1996).

Esempio di quella alterna fortuna alla quale questa coltura è stata soggetta nel tempo, è la sorte di tre oliveti posseduti dal monastero bolognese di San Procolo alla fine del duecento, (due situati sulle colline immediatamente a sud della cinta urbana, una nella zona collinare di Casalecchio dei Conti). A neppure un secolo di distanza di essi non restava più nulla, se non un “*olivatum satis desolatum et triste*”. Simile sorte toccava ad un oliveto situato nella valle del Savio, che nel XVI secolo era ormai scomparso per lasciare posto a vigneto e selva (Baldini, 2003).

Nel periodo rinascimentale l'olivicoltura di tutta l'Emilia subì comunque un forte declino sotto il combinato effetto di vari fattori: da un lato le avversità climatiche e il crollo demografico provocato da pestilenze e denatalità; dall'altro la rivoluzione dei trasporti e dei noli. Inoltre la disaffezione degli agricoltori attratti dalle più facili e remunerative coltivazioni di pianura, indirizzò gli abitanti a concentrarsi nei centri maggiori, portando ad un progressivo declino delle

¹ una “bif.” è un'unità di misura emiliana corrispondente ad una bifolca, cioè alla quantità di terra che un bifolco (contadino) riesce a lavorare in un giorno, pari a circa 1/3 di ettaro. Oggi la bif. è stata sostituita dalla “biolca”, il cui valore è simile alla bif., ma con approssimazione diversa a seconda della zona.

produzioni locali di olio, pur mantenendosi costante il fabbisogno che ora poteva essere coperto dagli scambi di mercato.

Di conseguenza le notizie storiche diventano sempre più sporadiche e l'olivicoltura viene citata nelle opere di pochi Autori.

A riguardo, Rognoni nel 1897, nel suo “saggio Storico sull'antica Agricoltura parmense”, cita testualmente: *“sebbene ancor si incontrino sui nostri colli ulivi annosi, pure non è a credere che la coltivazione loro durasse gran tempo profittevole a noi. Gli statuti del 1494 non ne fanno parola, tuttoché la storia ricordi che ancora alla metà del XVI secolo il colle e il piano della nostra provincia portassero ulivi”*. Inoltre, secondo l'autore, il duca del Ducato di Parma e Piacenza, Pier Luigi Farnese, fece piantare nella zona di Salsomaggiore diversi esemplari di olivo, che tuttavia non soddisfacevano il bisogno di olio locale.

L'Alberti nel 1551 (in Baldini, 2003), racconta di ulivi nel bolognese (verso Imola), i quali producevano una specialità di Bologna. Tali ulivi veniva descritti dall'Autore come “quegli olivotti tanto stimati confettati da ogni lato d'Italia e massimamente a Roma”.

Ed infine ve ne sono accenni da parte del Bussato (1578), del Garzoni (1584) e dal Tanara (1644). Quest'ultimo attesterà il completo abbandono dell'olivicoltura bolognese, visto lo spostamento dell'agricoltura verso la pianura. A tal proposito ne “*L'Economia del Cittadino in Villa*”, l'autore annota questo processo quando scrive che, pur avendo sostenuto la buona reputazione degli agricoltori locali, pensa di “...inciampare nell'ignominia de' bolognesi, poiché tralascia la coltivatione di questo nobilissimo frutto, aborrendo i colli, tutti sono intenti alla coltura del Piano...” . (Pini, 1980).

Nel 1688 in uno schizzo a penna viene raffigurata la presenza di ulivi tra la chiesa di S. Maria di Monteveglio e la nuova strada detta del Calvario (Fig. 3) (Baldini, 2003).

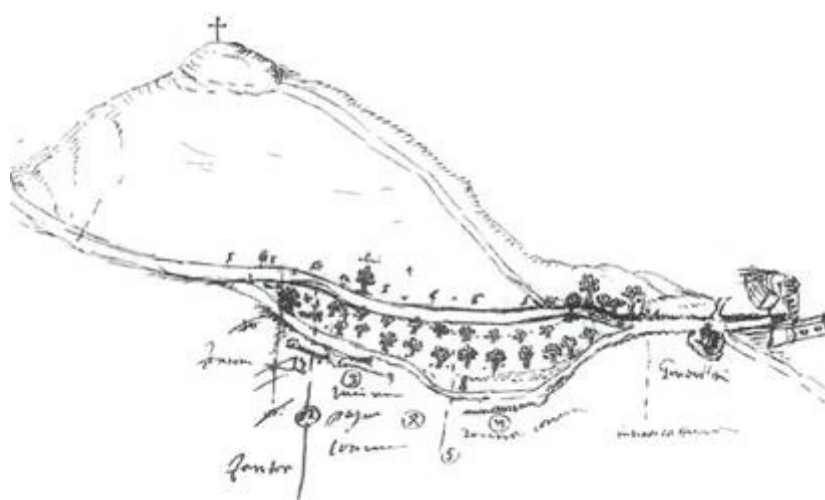


Fig. 3 – Appezzamento olivetato (5) compreso tra la vecchia e la nuova strada detta del Calvario in territorio di Monteveglio (Baldini, 2003).

L'inverno del 1709 fu caratterizzato da un'eccezionale gelata che, secondo Calindri (in Baldini, 2003), provocò la morte di oltre 5000 olivi nel bolognese.

Nel territorio di Reggio Emilia, dalle mappe del 1720 di Andrea Bandoli apprendiamo che il canale di Secchia azionava in città 10 mulini e serviva 31 filatoi e 2 galgarie. Nelle galgarie, presenti già nel 1300, si utilizzavano le galle delle querce per la concia e tintoria delle pelli. Alcuni di questi mulini (Fig 4) venivano invece utilizzati per la molitura di "prodotti di alberi", e più precisamente castagne e olive (Pellini, 1996).



Fig. 4 – Mulini presenti sul territorio reggiano.

Risale al 1761 un carteggio di Du Tillot Léon Guillard, primo ministro riformatore alla corte del duca Filippo Borbone, che propone l'introduzione dell'impianto di nuovi olivi nel parmense. Non si conosce l'effetto di questo mandato, sappiamo tuttavia che nel 1765 si propose un impianto di 34.000 olivi, anche sulle colline piacentine, cosa che tuttavia non ebbe seguito a causa di ragioni climatiche ed economiche. A testimonianza di questo sta una lettera del commissario di Castell'Arquato al Du Tillot del 6 Luglio 1765, nella quale si spiega che "sarebbe impossibile trovare una tale quantità, senza contare la spesa notevolissima" oltre che il tempo notevole che richiedevano per la crescita: "pianta poco adatta alla fretta dell'età delle riforme" (Carboni, 2007).

Tra il 1772 e il 1785 la produzione media di olive in provincia di Bologna era stata di 6000 libbre all'anno, aveva raggiunto le 8000 libbre nel 1829, ma nel 1837 si assistette ad un crollo della produzione (3800 libbre). Molto interessante è l'esistenza, nel 1831 a Bologna, di tre "mole da olio" (tre frantoi) (Baldini, 2003); molti sono i documenti che accertano la presenza di frantoi nel bolognese tra il XVIII e il XIX secolo, attualmente sono stati individuati e posizionati

su carta un molino da olio azionato da animali, presente a Montemaggiore, e cinque molini ad acqua, presenti a Rigosa, Brigola, Panico, Salvaro e Monteveglio (Pignone R., 2007).

Anche nel parmense e nel piacentino fino a duecento anni fa esistevano dei frantoi, ne è testimonianza, nel piacentino, un documento del 1821 del Catasto Napoleonico conservato presso l'Archivio Storico di Piacenza nel quale, per motivi fiscali, sono elencati tutti i beni del Comune di Nibbiano e dove si annovera l'esistenza di almeno un torchio da olio a Trevozzo (Anonimo, 2003); altresì, nel parmense, Bianchedi (1880) riporta che "Veggonsi, anche specie a Medesano, indizi eloquenti di torchi da olio in cui anticamente si eseguiva la lavorazione delle olive per estrarne l'olio".

Antonio Boccia, capitano francese, nel suo resoconto "Viaggio ai monti di Piacenza" (1805) a seguito delle truppe napoleoniche, segnala la presenza di piantagioni di olivo "i quali vegeti e rigogliosi allignano nella costa sotto le case dei Mazzoni (Vernasca) ove se ne conta qualche centinaio" nel piacentino.

Nel reggiano, più precisamente nella zona di Albinea (castello di Bianello), intorno al 1850 si ha l'introduzione di olivi da impiantare intorno al castello come risposta all'aumento del prezzo dell'olio da parte del Duca di Pontremoli (Pellini, comm. pers.).

Per ultima si annovera l'opera dell'Ingegnere Camillo Bianchedi che nel 1880 scrive, in chiave lodevolmente propositiva, *L'olivo sulle colline parmensi*, con l'intento di poter ripristinare questa antica coltivazione di cui sono rimasti come testimonianza "olivi sparsi e non pochi anche prosperosi e secolari, accennanti indubbiamente ad una più estesa florida e propizia coltivazione di quella pianta". L'autore segnala, per la provincia di Piacenza, la presenza di olivi "nelle plaghe meglio esposte dei colli di Lugagnano" e nella "costiera che da sotto a monte Giogo si distende fino a Castell'Arquato". Per la Provincia di Parma, invece, segnala "sui colli di Medesano, a case Ramiola, S. Andrea, S. Lucia, in quelli di Varano Melegari, da Casa Cenci fino ai confini di Visiano, in quelli di Castellano presso Sala, in quelli di Salso Maggiore sulla costa dello Stirone della villa di Scipione..."... "in territorio di Oriano nel comune di Solignano" e manifesta la volontà di reintrodurre questa coltura in tutto il territorio parmense, interessando addirittura 1180 ettari, però senza successo (Bianchedi, 1880).

Ancora oggi la toponomastica mantiene vive le memorie e la traccia che gli olivi hanno lasciato nel tempo e che successivi avvenimenti hanno cancellato; ad esempio nel parmense esiste una valle denominata Olivelle (Lesignano), un monte denominato Monte Oliva (tra le colline di Fidenza), un campo denominato Campo degli olivi (Medesano) e presso il ponte del Rio Fabiola esiste un'altra località denominata Olive). Così il nome del paese di Torrechiara si pensa derivi dal volgare "torciera", ossia luogo dove vi sono i torchi di olive; analogamente il nome di Ramiola, sembra derivi dal latino "ramus olea" si ritiene, per questo che alluda alla presenza di

olivi in questa zona, come d'altronde testimoniato dal ritrovamento di olivi secolari (Lona et al., 1981).

Attualmente in Emilia-Romagna, l'olivo è diffuso in tutta la provincia di Rimini, sulle prime colline di Forlì e di Cesena e in provincia di Ravenna, esclusivamente nel territorio brisighellese.

Nelle altre parti della regione non sono presenti colture di olivo, ma sulle colline dell'Appennino emiliano si trovano ancora maestosi olivi secolari, di intenso significato storico-culturale e scientifico, che sono sopravvissuti fino ad oggi.

2.2.1. Inquadramento ambientale dell'olivo in Emilia:

Per quanto concerne l'habitat dell'olivo, fin dall'antichità si sono dettate precise indicazioni: Catone (234 a.C.- 149 a.C.) ci ricorda che il campo buono è "...quello rivolto verso il favonio (Zefiro-vento di ponente) e ben esposto al sole". Columella, nella sua *Res Rustica* (60-65 d.C), ricorda che l'olivo ama "...i pendii di media altezza e moderati..." e per quanto riguarda il terreno consiglia "...quello che ha il fondo costituito da ghiaia, se lo strato superiore è formato da sabbione ed argilla...", essendo da escludere "...un terreno totalmente argilloso, e, ancor peggio, in cui ci siano delle polle e dove sempre stagni l'umidità..."(Pignone R., 2007).

Così, si è visto che nell'Italia settentrione la pianura è stata raggiunta dalla coltura dell'olivo solo in periodi estremamente favorevoli, mentre la norma sono sempre state zone collinari ben riparate sul lato nord dalle incursioni di masse di aria fredda, o zone lacustri sub-alpine in virtù del loro clima insubrico, mesoclima di transizione fra clima alpino e clima padano, caratterizzato dall'azione mitigatrice delle masse d'acqua dei laghi stessi.

L'Appennino emiliano, in particolare, presenta alcune zone collinari in cui il microclima è piuttosto mite e si avvicina a quello dell'Italia Centrale; grazie a queste particolari condizioni microclimatiche lungo la fascia pedemontana delle province di Modena, Reggio Emilia, Parma e Piacenza, si può osservare la sorprendente sopravvivenza di piante, ceppaie, cespugli, alcuni dei quali plurisecolari.

Recenti studi, diretti allo scopo di individuare l'eventuale presenza di specie vegetali indicatrici di bioclima mediterraneo associate all'olivo e di definire il contesto cenologico in cui questa pianta si è conservata fino a noi, hanno mostrato la presenza di specie arboree ed arbustive termofile non autoctone, ma tipiche della fascia climatica mediterranea (Tomaselli, comm. pers.). Le analisi pedologiche di queste zone, inoltre, hanno evidenziato che l'olivo persiste su

suoli subalcalini, ricchi di sostanza organica a tessitura principalmente di tipo franco-argilloso, franco-argillo-limoso e argillo-limoso.

3. Biodiversità in olivo

L'olivo presenta, a differenza di quasi tutte le altre specie coltivate, un vastissimo patrimonio genetico rappresentato da più di 1200 varietà, oltre che da un esteso numero di piante selvatiche (Bartolini et al., 2005); il solo germoplasma italiano rappresenta il 48% di tutto il germoplasma conosciuto, essendo costituito da circa 600 cultivar; molti esemplari antichi, inoltre, sono ancora in attesa di essere identificati (Bartolini et al., 2005).

Molteplici sono i fenomeni che hanno portato a una così grande variabilità genetica: innanzitutto l'olivo è una specie allogama con elevato grado di etero-impollinazione che conduce ad elevati livelli di eterozigosi e polimorfismo del DNA tra gli individui (Angiolillo et al. 1999; Rallo et al. 2000). Nel corso dei millenni, perciò, si sono originate, per incrocio spontaneo e successiva disseminazione naturale dei noccioli, nuove cultivar che, qualora apprezzate dall'uomo, sono state fissate per via vegetativa. La longevità di questa pianta e la selezione di un gran numero di varietà hanno, poi, contribuito alla conservazione della sua variabilità e hanno permesso di tramandare una quota consistente di questa diversità genetica (Rallo et al., 2000). Infine la diffusione della specie è stata possibile grazie alla facilità di moltiplicazione per ovulo, pollone, grossa talea di branca e innesto, tutte tecniche di uso antico e tradizionale (Baldini e Scaramuzzi, 1952). In aggiunta a queste considerazioni non è da trascurare il fatto che le mutazioni gemmarie, verificatesi nel corso dei secoli e fissate per via vegetativa, hanno contribuito ad aumentare il numero di genotipi e quindi di cultivar.

Un altro fattore che ha contribuito ad aumentare la biodiversità di questa specie è il fatto che, nel passato, a differenza delle altre piante da frutto, l'ampia variabilità genetica dell'olivo è stata fissata e diffusa liberamente senza preoccupazione di fedeltà a un archetipo morfologicamente definito, in quanto il prodotto finale non è il frutto intero, come per la maggior parte degli altri fruttiferi, ma il risultato della sua spremitura, l'olio. Per le cultivar di olivo, quindi, non è mai esistito uno “*standard varietale di riferimento*” (Roselli et al. 1974).

Questo ha portato, nel tempo, alla costituzione di cultivar policlonali a fenotipo eterogeneo piuttosto che di cultivar monoclonali. Nel caso di questa pianta, infatti, si dovrebbe parlare di “gruppo di individui” (es. gruppo Frantoio, gruppo Moraiolo, ecc.), intendendo con tale termine un insieme di cloni simili per alcuni caratteri tipici della cultivar. Tali “gruppi” di individui sono stati propagati da molte generazioni esclusivamente per via agamica e ciascun gruppo

costituisce una popolazione di cloni, ossia discendenze provenienti dalla moltiplicazione di un solo individuo. Questa particolarità è molto utile ai fini pratici perché, in questo modo, si possono isolare per ogni cultivar individui più produttivi, o comunque più rispondenti a determinate necessità agricole e commerciali.

Da un punto di vista scientifico, inoltre, le singole cultivar possono essere viste come sorgente potenziale di materiale genetico utilizzabile per trasmettere determinati caratteri di produzione, resistenza o tolleranza in nuovi genotipi prodotti dall'attività di miglioramento genetico.

Questo porta alla necessità di *catalogare, classificare ed identificare* quante più varietà possibili, al fine di *conservare e salvaguardare tutto il patrimonio genetico esistente* (che include i pool genetici delle varietà domestiche e quelli delle specie selvatiche affini).

3.1 Salvaguardia della biodiversità

La salvaguardia del germoplasma, quindi, gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della biodiversità e nella riduzione dell'erosione genetica, sempre più forte, specialmente negli ultimi anni; queste risorse possono essere conservate con due metodologie differenti: conservazione *in situ* ed *ex situ* (Ledig, 1986; Finkeldey e Gregorius, 1994):

- 1) Per conservazione *in situ* si intende la conservazione della specie nelle aree d'origine con lo scopo di proteggere le risorse biologiche sfruttando la crescita e lo sviluppo delle specie nel proprio habitat naturale. Comporta la creazione di aree protette naturali come riserve genetiche, riserve di biosfera, parchi e oasi. Gli obiettivi da perseguire sono: la valutazione delle effettive risorse genetiche esistenti in natura per ciascuna specie o gruppi di specie, e lo studio dei meccanismi (adattativi, evolutivi, storici e economici) che regolano il mantenimento delle diversità genetica e la sua fruizione diretta (consumo umano) ed indiretta (coltivazione, utilizzazione per programmi di miglioramento genetico a livello regionale, nazionale ed internazionale). Per conseguire tali obiettivi, è necessario allestire banche dati complete di informazioni genetiche e tassonomiche (Sakai, 2000).

Le tecniche di conservazione *in situ* sono tecniche piuttosto impegnative in quanto richiedono il pieno coinvolgimento del territorio e la collaborazione di agricoltori competenti.

- 2) Per conservazione *ex situ* si intende il mantenimento delle specie al di fuori del loro habitat naturale con lo scopo di assicurare il mantenimento della biodiversità e rendere le piante disponibili per l'uomo. La conservazione *ex situ* presenta lo svantaggio di mantenere solo una parte della variabilità genetica dei taxa, che può essere soggetta a deriva genetica e quindi per questa particolarità le può essere preferita la conservazione *in situ* perché mantiene inalterati le funzioni e i processi ecologici, permettendo di conservare le risorse genetiche delle varie specie, favorendo inoltre una loro continua evoluzione (Ledig et al, 1990; Finkeldey e Gregorius, 1994): un programma di conservazione della biodiversità deve prevedere un equilibrato bilanciamento tra i due tipi di conservazione (*in situ* ed *ex situ*).

Oltre che per il mantenimento delle risorse genetiche, la tecnica di conservazione *ex-situ* ha altri scopi (Grassi, 2004), quali:

- sviluppare nuove cultivar durante i programmi di miglioramento genetico;
- fornire popolazioni di riserva da utilizzare per consentire la sopravvivenza delle specie durante le fasi di reintroduzione e ripopolamento o per favorire il recupero e la riabilitazione degli habitat;
- fornire materiale per l'industria, per l'agricoltura, per la formazione e la ricerca;
- assicurare, attraverso lo stoccaggio a lunga scadenza, materiale per i bisogni futuri.

I metodi di conservazione *ex-situ* maggiormente utilizzati sono: banche di germoplasma, banche di DNA e di semi, colture di tessuti e di cellule, tecniche in vitro e crioconservazione.

Nel campo dell'olivo, innumerevoli sono i campi collezione di germoplasma distribuiti nei principali paesi olivicoli e non, (www.oleadb.eu); tra questi , le più importanti collezioni riconosciute a livello mondiale sono: la Banca mondiale di Cordoba in Spagna, quella di Rende (CS) in Italia e quella di Marrakech in Marocco. Tali campi collezioni, anche quelli più conosciuti, presentano però varie problematiche da risolvere.

Il primo problema delle collezioni è la corretta identificazione delle accessioni: vastità della coltura, mancanza di uno standard varietale riconosciuto a cui fare riferimento e i criteri piuttosto generici di denominazione che l'uomo ha utilizzato nei processi di selezione e diffusione delle varietà, hanno portato alla ripetizione dello stesso nome per differenti varietà (omonimie) e all'utilizzo di nomi diversi per la stessa varietà (sinonimie); generando quindi un buon grado di "confusione varietale".

Nella tabella 2 viene portato un esempio di tale problema, nel caso specifico vengono riportate tutte le sinonimie della cultivar Santa Caterina. Altri esempi sono evidenziati nella banca dati della FAO (www.oleadb.eu).

Tab. 2 Esempio di sinonimie della cultivar Santa Caterina (www.oleadb.eu).

Cultivar	Sinonimo	Area di coltivazione
Santa Caterina	Katerina	Kavkaz (AZ); Krymski (UA)
	Oliva da Indolcire	Toscana (I) autoctona
	Oliva di San Biagio	Toscana, Molise (I) autoctona
	Oliva di San Giacomo	Toscana, Liguria (I) autoctona
	Oliva Lucchese	Toscana, Molise, Basilicata (I) autoctona
	Santa Catalina	Argentina, Catamarca, Cordoba, Entre Rios, Jujuy, Mendoza, San Juan, Valle de Huaral (RA)

Un secondo problema delle collezioni è la rappresentatività delle varietà, in quanto viene espressa solamente in modo parziale la ricchezza varietale di un paese, ed è probabile che molte delle collezioni offrano una insufficiente rappresentatività del materiale coltivato presente nei paesi dove esse sono localizzate.

E' quindi di fondamentale importanza la corretta identificazione delle varietà in un'epoca in cui gli scambi del materiale vegetale tra i paesi aumentano rapidamente; è inoltre di prioritaria importanza l'identificazione del materiale presente nelle banche di germoplasma prima della sua diffusione nel settore.

4. Classificazione varietale

4.1. Cronologia dei sistemi di classificazione e Marcatori morfologici

Fin dai tempi antichi, i diversi ricercatori sono stati spinti a studiare dei “caratteri idonei”, utilizzabili come sistemi di identificazione e attraverso i quali raggruppare e riconoscere le caratteristiche delle cultivar e dei loro eventuali cloni.

La tabella 3 mostra i principali modelli di classificazione proposti dal 1700 al 2007: la descrizione dell'olivo è stata eseguita utilizzando più di 20 modelli e impiegando circa 240 diversi caratteri a diversi livelli (Ganino et al., 2006).

Inizialmente gli studi di classificazione hanno fatto riferimento unicamente a caratteri “botanici”, il fine era quello di distinguere le varietà in base alle variazioni morfologiche della foglia, del frutto, dell’endocarpo, dell’infiorescenza; tra gli autori più importanti si possono ricordare: Tournefort (1719) in Francia, Clemente (1815) in Spagna, Tavanti (1819) in Italia, Rudy (1917) in Francia. I primi modelli presentati, però, non sono stati sufficienti a descrivere in modo univoco le varietà.

A partire dai primi decenni del ‘900, sono stati considerati nuovi caratteri, ecologici prima e bio-agronomici poi, che hanno portato a una netta svolta nel sistema di descrizione di questa specie. Col passare degli anni, sono stati presentati modelli sempre più complessi fino ad arrivare a quello presentato da Ciferri e collaboratori nel 1942, che consisteva in una scheda elaiografica basata su caratteri morfologici, biologici, ecologici e agronomici (Ciferri, et al., 1942). Questa scheda permetteva l’identificazione varietale con un grado di attendibilità soddisfacente, prevedendo rilievi accurati, in ambiente omogeneo.

Nel 1954 Patac in Spagna propose, poi, un sistema d’identificazione innovativo: oltre ai già considerati caratteri botanici venivano ritenuti importanti i caratteri che potevano dare informazioni sulla trasformazione del prodotto. In questo modo la scheda ampliava il raggio dei parametri analizzati estendendo l’indagine ad un ambito non solo strettamente botanico ma anche agronomico e industriale, tale proposta tuttavia non fu approvata dagli esperti del C.O.I. (Consiglio Oleicolo Internazionale).

Nei 30 anni successivi non vi furono importanti innovazioni sulla tematica della classificazione dell’olivo. Nei Paesi in cui l’olivicoltura era maggiormente praticata, tuttavia, si sentiva la necessità di fare ordine nel complesso mondo del germoplasma olivicolo e nel 1985 l’UPOV (Unione Internazionale per la protezione di nuove varietà) propose una scheda specifica per la distinzione di cultivar di olivo. Nella scheda venivano presi in considerazione i caratteri della pianta, rami fruttiferi, foglie, infiorescenze, fiori, frutti ed endocarpo. L’intento era quello di uniformare la metodologia di raccolta dei dati e di imporre una “scheda guida” utilizzabile da tutti i ricercatori che si avventurino nella descrizione e classificazione di cultivar di olivo. Questa iniziativa rappresentava il secondo tentativo, dopo quello di Ciferri e collaboratori (1942), di classificare con una metodica univoca il germoplasma olivicolo presente nei diversi Paesi.

Solo da una decina d’anni, nel 1998, è stato proposto da Bartolini e collaboratori, per la descrizione del germoplasma mondiale di olivo, l’utilizzo di una scheda pomologica semplificata. Tale scheda è costituita da dati del passaporto, caratteri dell’albero e caratteri agronomici (produttività, resa in olio, tolleranze a stress biotici ed abiotici, ecc).

Tab. 3 Confronto di sistemi di classificazione caratterizzanti la storia dell'identificazione dell'olivo proposti dal 1700 al 2005 nei paesi del mediterraneo.

Anno	Autori	Paese	Caratteri utilizzati
1719	Pitton de Tournefort	Francia	Caratteri Botanici
1815	Simón de Rojas Clemente	Spagna	Foglia e Frutto
1819	Tavanti	Italia	Endocarpo
1908	Marinucci	Italia	Endocarpo
1917	Ruby	Francia	Foglia, Frutto ed Endocarpo
1932	Miliani	Italia	Caratteri ecologici
1932	Zito	Italia	Endocarpo
1937	Bracci	Italia	Foglia, Infiorescenza, Frutto, Endocarpo e Caratteri Ecologici
1937	Frezzotti	Italia	Endocarpo
1939	Savastano	Italia	Endocarpo
1942	Ciferri et al.	Italia	Caratteri Morfologici, Biologici e Agronomici
1954	Patac	Spagna	Caratteri Morfologici, Botanici e Agronomici
1984	Barranco and Rallo	Spagna	Caratteri Morfologici e Agronomici
1985	UPOV	Mondo	Caratteri Morfologici e Agronomici
1986	Leitão et al.	Portogallo	Caratteri Morfologici e Agronomici
1998	Bartolini et al.	Mondo	Passaporto, caratteri Agronomici, Analisi Biochimica e Molecolare, Collezioni, ecc.
2000	Barranco et al.	Mondo	Passaporto e Caratteri Agronomici
2000	Pannelli et al.	Italia	Caratteri Morfologici, Agronomici e Commerciali
2005	Rallo et al.	Spagna	Passaporto, Caratteri Morfologici, Agronomici e Commerciali
2005	Bartolini et al.	Italia	Passaporto, Caratteri Morfologici, Agronomici e Commerciali, Caratteri Biochimici, Marcatori Molecolari
2007	Caruso et al.	Italia	Passaporto, Caratteri Morfologici, Agronomici e Commerciali

Vengono inoltre introdotte per la prima volta informazioni importanti come la presenza di brevetti, collezioni e dati riguardanti la caratterizzazione biochimica e molecolare.

È di recente pubblicazione (2000) il “Catalogo Mondiale delle Varietà di Olivo”, da parte del Consiglio Oleicolo Internazionale (C.O.I.) e redatta da numerosi studiosi dell’olivo (Barranco et al., 2000a), che propone, come sistema di classificazione, schede descrittive valide per le cultivar di tutte le zone olivicole. Tali schede sono costituite da una lista di caratteri descrittivi accompagnati da una sintetica valutazione bioagronomica.

Le informazioni si articolano indicando alcuni dati generali:

- “dati del passaporto” (il nome più comune della cultivar, gli eventuali sinonimi, il paese d’origine, le zone predominanti di coltura, l’importanza della cultivar per i territori di riferimento e la destinazione del prodotto);
- “caratteri morfologici”, che impiegati sistematicamente permettono l’identificazione e la caratterizzazione primaria di ogni cultivar. Tali caratteri sono stati strutturati in base a descrittori qualitativi (forme, espressione di caratteristiche morfologiche) e quantitativi (indici biometrici);
- “considerazioni agronomiche e commerciali” che raccolgono infine le informazioni che possono essere d’utilità agli olivicoltori, ai ricercatori e agli operatori del settore (Barranco et al., 2000a).

Viene nuovamente messa in evidenza, per la classificazione, la necessità di un sistema unificato e idoneo al fine di garantire la conservazione del patrimonio olivicolo. La proposta C.O.I., che è poi in definitiva il risultato di un lavoro congiunto di esperti e ricercatori del mondo olivicolo, è l’ennesimo tentativo di unificare le metodologie di classificazione per l’olivo.

Altri Autori, negli anni seguenti, hanno proposto altre schede prendendo spunto dalle metodiche esistenti (Cicoria et al., 2000; Pugliano et al., 2000; Cimato et al., 2001; Rotundo e Marone, 2002; Trigui et al., 2002; Parlati e Pandolfi, 2003; Lombardo et al., 2003; Bassi, 2003; Lombardo et al., 2004; Caruso, 2007) che però non presentano grosse variazioni rispetto a quelle precedentemente citate.

Negli ultimi decenni, infine, la comparsa di metodiche di indagine più raffinate come marcatori molecolari e analisi chimico – organolettiche dell’olio, sono certamente fra le caratteristiche più distintive delle più recenti schede elaiografiche; la scheda proposta da Bartolini ed Altri Autori nel 1998 e successivamente nel 2005, ne è un esempio (Bartolini, comunicazione personale). In quest’ultimo modello si propone l’utilizzo di una sola scheda descrittiva basata sulla costruzione di una banca dati completa per l’olivo; la scheda deve raccogliere tutte le informazioni relative ad ogni varietà nota, indipendentemente dall’importanza dei caratteri considerati.

A rendere assai difficoltosa l'identificazione varietale attraverso tali metodi concorre lo stesso assetto varietale dell'olivo assai frequentemente caratterizzato dalla presenza di coltiva-
popolazioni o popolazioni di cloni piuttosto che da cultivar monoclonali (Bartolini et al., 1992).

Nel corso degli anni si sono identificati gli elementi meno variabili ed idonei: foglie, drupe, noccioli, mediante analisi statistica della variabilità dei singoli caratteri (Baldini e Scaramuzzi, 1952, 1955; Damigella 1960). Più recentemente, lo studio di varie metodiche di analisi statistica multivariata ha evidenziato l'esistenza di numerose variabili biometriche relative al frutto ed alla pianta o di composizione acidica dell'olio con soddisfacente potere discriminante (Barone et al., 1994; Barone et al., 1995; Perri et al., 1995; Cantini et al., 1999; Barranco et al., 2000a.; Barranco et al. 2005).

Nonostante i numerosi studi sull'argomento, i marcatori morfologici restano scarsamente discriminanti per l'identificazione varietale in quanto sono caratterizzati da una elevata variabilità ambientale; il loro studio va, per questo, integrato con le recenti tecniche ultrastrutturali, biochimiche e genetico-molecolari.

4.2. Marcatori biochimici e molecolari

Un “marcatore ideale”, per l'identificazione di specie agrarie, deve possedere alcuni requisiti per una sua pratica utilizzazione, e cioè deve essere:

- carattere mendeliano;
- stabile nel tempo;
- neutro (senza effetti sul fenotipo);
- altamente polimorfico (presenza di elevata variabilità);
- facilmente individuabile;
- evidenziabile direttamente sul DNA;
- riproducibile;
- economico.

In natura, non esistono marcatori con tutte le caratteristiche su esposte e pertanto, nel tempo, ne sono stati utilizzati alcuni che solo parzialmente soddisfano tali requisiti.

Attualmente per la classificazione delle varietà dell'olivo si utilizzano più metodiche: ai classici sistemi di identificazione vengono affiancate tecniche ultrastrutturali, biochimiche e molecolari i cui protocolli vengono aggiornati con metodologie sempre più sofisticate. Questi studi ricoprono

un ampio campo di analisi, dallo studio della morfologia del polline (analisi ultrastrutturali), all'analisi di proteine totali e di riserva (Durante, 1992), all'ibridazione del DNA con sequenze note (le cosiddette sonde RFLP), fino alle più recenti tecniche basate sull'amplificazione del DNA (PCR) attraverso l'uso di marcatori polimorfici (RAPD, SSR, AFLP , SNP) (Ganino, 2006).

4.2.1. Analisi ultrastrutturali

Alcuni Autori (Quiros, 1975; Maas, 1977) propongono la morfologia del polline (sezione, forma, ecc.) come mezzo utile nella identificazione varietale. Il polline, sebbene rientri tra i caratteri morfologici, è considerato un carattere intermedio tra quelli morfologici veri e propri e i caratteri biochimici. In particolare, del polline è considerata la struttura dell'esina (parte esterna della parete cellulare circondante i granuli pollinici a maturità), le cui caratteristiche (diametro del granulo, spessore delle maglie del reticolo, ecc.) sono sotto il controllo del genoma dello sporofito (cellula madre del polline) (Pandey e Troughton, 1974). La struttura della parete è pertanto una caratteristica più stabile rispetto ai caratteri morfologici, in quanto è una risultante specificatamente genetica scarsamente soggetta all'influenza dell'ambiente.

L'Autore che per primo ha utilizzato l'analisi ultrastrutturale del polline per l'identificazione di cultivar di olivo è Roselli (1979), con uno studio condotto su tredici varietà di olivo da mensa; non ne sono però emerse informazioni sufficienti per l'identificazione varietale.

Nel 1995 Lanza, Marsilio e Martinelli, mediante l'ausilio della microscopia elettronica a scansione, hanno studiato la morfologia del pattern esinico del granello pollinico di quattro varietà di olivo: i dati ottenuti hanno consentito la completa differenziazione delle quattro cultivar (Lanza et al., 1995).

Queste analisi, però, forniscono scarse informazioni per l'identificazione di cultivar geneticamente vicine (Bartolini e Petruccelli, 1994); altri studi su vari aspetti anatomici e ultrastrutturali non hanno fornito risultati incoraggianti.

4.2.2. Marcatori biochimici: proteine e isoenzimi

L'analisi proteica (proteine totali e proteine di riserva) viene utilizzata fin dagli anni '70 come efficace applicazione per identificare specie e cultivar: infatti, grazie ad alcune specifiche caratteristiche, le proteine di riserva si prestano ad essere utilizzate come marcatori del genoma.

Questo tipo di applicazione, rispetto ad altri marcatori biochimici, presenta il vantaggio della semplicità della tecnica di estrazione e separazione, mentre le informazioni fornite sulla variabilità genetica sono meno esaustive. E' con lo scopo di identificare specie e varietà diverse che viene impiegata l'analisi proteica: in particolare per l'olivo, si sono studiate le proteine di riserva del seme (Durante et al., 1992) e le proteine totali delle foglie (Petrucelli, 1992).

Gli enzimi sono proteine altamente specializzate che catalizzano le numerose reazioni chimiche che avvengono negli esseri viventi. Il termine "isoenzima" (o isozima) è stato proposto da Markert e Moller (1959) per indicare l'insieme delle differenti forme molecolari multiple di un enzima, dette isoforme, che catalizzano la stessa reazione biochimica. L'elettroforesi isoenzimatica permette di rilevare la variabilità genetica che ricorre in molte proteine enzimatiche, le differenze varietali sono evidenziate attraverso il polimorfismo isoenzimatico. Poiché le sequenze di amminoacidi delle proteine sono determinate dalle sequenze del nucleotide del gene, "l'analisi di una struttura proteica, usando l'elettroforesi, è in prima approssimazione, un'analisi del gene" (Gottlieb, 1977). Il polimorfismo isoenzimatico risulta un semplice marcatore per analizzare le relazioni genetiche nella popolazione (Gottlieb, 1981).

La tecnica isoenzimatica tuttavia presenta alcune limitazioni: i loci isoenzimatici saggiati rappresentano una piccola parte dei geni strutturali di un intero genoma (meno dell'1%); la variazione presente in una popolazione può non essere totalmente espressa; solo parte delle sostituzioni nucleotidiche che si hanno a livello del DNA vengono identificate perché non sempre si verificano variazioni nella frequenza aminoacidica della proteina.

Ciononostante numerosi Autori come Pontikis (1980), Trujillo et al. (1989), Roselli et al. (1990), Petrucelli (1992), hanno utilizzato gli isoenzimi per l'identificazione di cultivar di olivo.

Oggi i marcatori isoenzimatici sono poco utilizzati e i genetisti che si occupano di analisi di popolazione o di miglioramento genetico preferiscono utilizzare tecniche più precise e di più certa interpretazione.

4.2.3. Marcatori molecolari "genetici"

Negli ultimi anni, parallelamente al progredire delle tecniche di marcatura biochimica e molecolare (Hatzopoulos et al., 2002), sono state messe a punto metodiche molecolari di fingerprinting. In particolare l'introduzione di marcatori del DNA e delle tecniche di DNA fingerprinting ha fornito un buon sistema di discriminazione indipendente dalle condizioni ambientali, in grado di fornire un utile contributo alla soluzione di problemi diversi quali quelli

di errata identificazione in collezioni, di certificazione vivaistica o di tutela e garanzia nell'ambito delle DOP (Testolin, 2000). L'impiego di queste tecnologie ha già consentito sia la revisione tassonomica all'interno del genere *Olea* e delle forme collegate ad *Olea europaea*, sia di chiarire le relazioni intercorrenti tra le forme coltivate e quelle spontanee, e sia infine di contribuire allo studio della variabilità delle cultivar e del genoma di olivo ponendo altresì le basi per l'identificazione di marcatori associati a specifici caratteri di interesse agronomico (Rugini e Baldoni, 2003.).

Nella tabella 4 vengono riportati alcuni importanti marcatori molecolari e le loro principali caratteristiche messe a confronto.

Tab. 4 – Vantaggi e Svantaggi dei marcatori molecolari più utilizzati.

						Costi		Tempo		DNA	
Marcatori	Tipo di eredità	Polimorfismo	Specificità	Conoscenza della sequenza	Riproducibilità	Sviluppo	Impiego	Sviluppo	Impiego	Quantità	Qualità
RFLPs	Codominante	Basso	No	No	Alta	Alto	Alto	Alto	Alto	Alta	Alta
RAPDs	Dominante	Medio	No	No	Bassa	Basso	Basso	Basso	Basso	Bassa	Bassa
AFLPs	Dominante	Medio – alto	No	No	Media	Basso	Basso	Alto	Alto	Alta	Alta
SSRs	Codominante	Alto	Si	Si	Alta	Alto	Basso	Alto	Basso	Bassa	Bassa
SNPs	Codominante	Alto	Si	Si	Alta	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Esistendo tuttavia dei limiti all'applicazione delle nuove tecniche d'identificazione, si deve sempre tenere presente che:

- solo le differenze dei profili di DNA, costantemente riproducibili, offrono la sicurezza del risultato;
- quando invece i profili molecolari tra due piante a confronto sono identici, non si ha l'assoluta certezza che si possa trattare di uno stesso genotipo. Si può, di fatto, solo ragionevolmente dedurre che due varietà siano riferibili allo stesso genotipo con margini di errore molto bassi o non significativi (meno dell'1%), purché si siano superate le soglie numeriche di accettabilità dei profili dei marcatori molecolari saggiati (che variano a seconda delle specie e del tipo di marcatore);

- sono di difficile analisi le specie caratterizzate da bassa variabilità genetica (come per alcune specie da frutto), in quanto queste varietà sono affette da un alto livello di “inbreeding” dovuto, ad esempio, a genitori discendenti da incroci di varietà di comune origine;
- l’analisi dei mutanti clonali, cioè delle varietà derivate da semplice mutazione spontanea di varietà diffuse e note, è un ulteriore punto debole del “fingerprinting” (Sansavini e Pancaldi 2000).

4.2.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Gli RFLP sono marcatori che permettono di analizzare il polimorfismo generato nel DNA dopo digestione con enzimi di restrizione. E’ quindi una tecnica che porta ad individuare le variazioni nella lunghezza dei frammenti di restrizione del DNA omologhi ad una sonda marcata, dopo la digestione del DNA stesso con un enzima di restrizione. Questi enzimi riconoscono sequenze nucleotidiche specifiche, generalmente di quattro o sei coppie di basi e tagliano in corrispondenza o nelle vicinanze di queste sequenze; i frammenti così ottenuti sono chiamati “Restriction Fragment Length Polymorphisms”(RFLPs) (Beckmann e Soller, 1986).

I grossi vantaggi di questi marcatori risiedono nella loro codominanza, nella distribuzione uniforme sul genoma, nella mancanza di effetti pleiotropici, nell’eredità mendeliana (RFLP genomici) e nell’eredità materna (RFLP degli organelli) e infine nella possibilità di generare un numero pressoché illimitato di polimorfismi semplicemente variando le combinazioni sonda-enzima.

Questa tecnica è però molto complessa e laboriosa e presenta elevati costi. Il fatto poi del frequente ricorso a metodi radioattivi costituisce un ulteriore limite nell’utilizzo degli RFLP.

In olivo gli RFLPs sono stati utilizzati per la prima volta nel 1991 (Gallitelli et al., 1991). L'utilizzo di marcatori RFLP ha consentito di confermare il bacino del Mediterraneo quale areale di domesticazione dell'olivo (Besnard et al., 2001).

La tecnica RFLP è stata ancora utilizzata in un lavoro del 2003 realizzato da De la Rosa e collaboratori che hanno analizzato novantacinque individui derivati dall’incrocio tra due cultivar (Leccino e Dolce Agogia).

4.2.3.2. Tecniche basate sulla reazione PCR

I marcatori molecolari oggi maggiormente utilizzati sfruttano, per l'analisi dei polimorfismi, la reazione PCR (*Polymerase Chain Reaction* o *Reazione Polimerasica a Catena*), ingegnoso metodo messo a punto nel 1984 da Kary Mullis, allo scopo di amplificare specifiche sequenze del DNA. La PCR sfrutta alcune peculiarità della duplicazione cellulare del DNA: da un filamento singolo di DNA (stampo) ne viene sintetizzato uno nuovo, ma complementare. Tale processo viene indotto da un enzima, la DNA-polimerasi, che assolve diverse funzioni fra cui la riparazione e la duplicazione del DNA (Arnheim et al., 1990).

Il metodo di amplificazione prevede tre fasi fondamentali (Fig. 5):

- *Denaturazione* (mediante riscaldamento), cioè separazione delle doppie eliche che costituiscono le molecole di DNA. La temperatura in questa fase è circa 94°C per un tempo di circa 5 minuti: in queste condizioni si ha l'attivazione dell'enzima e la denaturazione del DNA con formazione di singoli filamenti stampo dove si legano i primers nei passaggi successivi.
- *Ibridazione dei primer*, abbassando la temperatura si permette ai primer oligonucleotidici di appaiarsi alla sequenze complementari presenti nelle molecole di DNA, definendo i punti d'inizio della sintesi. Scelta critica di questa tappa denominata "annealing" è la determinazione della temperatura di appaiamento, parametro variabile capace di determinare la specificità della PCR e la produzione degli stampi costituiti da filamento singolo a cui si è legato il primer, così da permettere l'azione della DNA-polimerasi. Questo è anche uno dei passaggi caratterizzanti questa tecnica, ossia il fatto che la DNA-polimerasi possa essere indirizzata a sintetizzare una regione specifica di DNA.
- *Allungamento* (sintesi di nuovi segmenti di DNA), la temperatura attuale è 72°C, temperatura alla quale l'attività della Taq DNA polimerasi è ottimale. Quest'ultima è una polimerasi termoresistente proveniente da *Thermus aquaticus*, un batterio termofilo che riesce a vivere in acqua a 75°C producendo un enzima in grado di rimanere attivo per una serie completa di cicli di amplificazione (Watson et al., 1998).

Mediante una serie di cicli termici, caratterizzati dal ripetersi di queste tre fasi, si ottiene un'amplificazione esponenziale della sequenza di "DNA target" in soluzione.

La PCR viene effettuata mediante l'impiego di apparecchi termostatici ciclici, programmabili al fine di effettuare i cicli della PCR alle temperature e per i tempi desiderati. I nuovi filamenti di DNA che vengono sintetizzati a partire da ciascun primer si estendono sino alla posizione del primer del filamento opposto generando, in ciascun filamento di DNA di nuova sintesi, nuovi siti a cui si appaierà il primer nel ciclo successivo.

La quantità di DNA richiesta per la PCR è minima (sono sufficienti quantità nell'ordine del nanogrammo). Il risultato che si ottiene dall'amplificazione, al termine di n cicli, è un miscuglio di reazione che contiene un numero massimo teorico di DNA a doppia elica pari a 2^n ; tali molecole sono le copie della sequenza di DNA compresa tra i due primer.

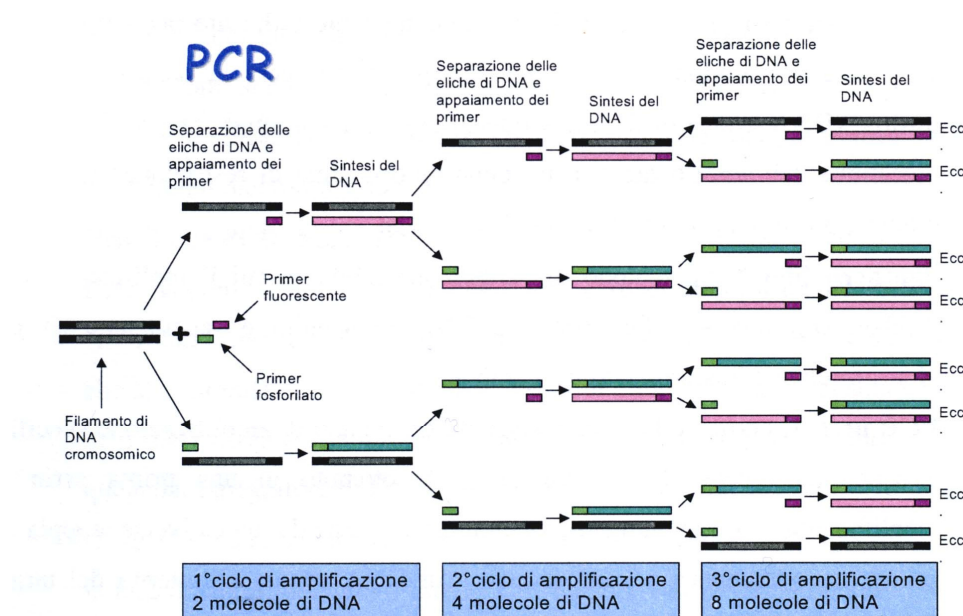


Fig.5 Schema di PCR, fase di denaturazione, annealing e amplificazione del tratto di DNA di interesse

4.2.3.2.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La tecnica RAPD si basa sull'amplificazione in PCR di regioni casuali del DNA con l'ausilio di un unico primer di sole 10-20 paia di basi. La ridotta dimensione dei primers consente un facile appaiamento dei medesimi alle zone complementari del DNA genomico.

Il numero di frammenti prodotti dipende da due fattori: la sequenza del primer e la dimensione del DNA genomico della specie in studio.

I frammenti, separati su gel di agarosio ad elevato potere risolutivo ed evidenziati con etidio bromuro, vengono osservati su trasluminatore a luce ultravioletta; Negli ultimi anni l'analisi dei frammenti è facilitata e velocizzata grazie all'uso di "analizzatori di immagini".

La tecnica, impiegata in numerosissime ricerche presenta numerosi vantaggi rispetto alle altre metodologie: elevato potere discriminante, rapidità operativa, basse quantità di DNA necessarie per l'analisi, possibilità di automazione e costi relativamente bassi. Per contro la tecnica presenta alcuni limiti, quali: ripetibilità dell'amplificazione, possibilità di influenzare la reazione

attraverso l'estrazione di DNA, determinazione della concentrazione dei reagenti, qualità del materiale utilizzato, ecc.

I frammenti amplificati probabilmente rappresentano solo una porzione dei più numerosi candidati all'amplificazione; il background genetico dunque opererebbe una sorta di effetto epistatico, favorendo l'amplificazione degli uni o degli altri. Un altro svantaggio rispetto agli isoenzimi e alla stessa tecnica RFLP, è dovuto al fatto che i RAPD sono marcatori dominanti, e quindi in grado di fornire il più basso livello di informazione (non discriminano infatti le progenie eterozigoti da quelle omozigoti dominanti).

La tecnica RAPD è stata applicata con successo in molti studi per sondare il polimorfismo di cultivar di olivo e tentare di distinguerle (Bogani et al., 1994; Fabbri et al., 1995; Cresti et al., 1996; Perri et al., 1998; Mekuria et al., 1999; Perri et al., 1999; Gemas et al., 2000; Gonzalo Claros et al., 2000; Belaj et al., 2001; Belaj et al., 2002; Bronzini de Caraffa et al., 2002; Guerin et al., 2002; Mailer e May, 2002; Russo et al., 2002; Fabbri e Ganino, 2003; Belaj et al., 2003a; Nikoloudakis et al., 2003; Belaj et al., 2004a; MirAli e Nabulsi, 2004; Ganino e Fabbri, 2005; Hossein-Mazinani, 2005).

In dettaglio, Bogani et al., (1994) hanno utilizzato cinque primer per differenziare undici cultivar non riuscendo però a costituire una relazione costante.

Nel 1995 Fabbri e collaboratori hanno utilizzato i RAPD come marcatori, identificando diciassette cultivar utilizzando diciassette primers.

L'analisi mediante RAPD condotta su trentasei accessioni siciliane, ha rilevato un elevato grado di polimorfismo nel DNA osservato, permettendo agli Autori di riscontrare una elevata variabilità del germoplasma di olivo siciliano (Perri et al., 1999).

La tecnica RAPD è stata utilizzata da Roselli e collaboratori nel 2002, per valutare la variabilità inter ed intra-cultivar stimando la diversità genetica di trentasette accessioni, reperite da cinque varietà toscane; i primers utilizzati sono stati ventidue, diciannove dei quali hanno rilevato il polimorfismo corrente tra le accessioni, tre primers sono stati sufficienti per distinguere le varietà coltivate mentre ne sono occorsi cinque per valutare la variabilità intra-cultivar.

Identificazioni mediante marcatori RAPD sono state realizzate da Belaj et al., (2003a) allo scopo di classificare trentadue accessioni siriane, avvalendosi di tredici primers; i quali hanno permesso di evidenziare che le trentadue accessioni fanno capo a tre raggruppamenti principali.

Nel 2002 ben centotre cultivar, provenienti dalla World Germplasm Bank di Cordoba (Spagna), rappresentative delle principali zone olivicole del Mediterraneo, sono state classificate utilizzando ventuno primers. Dall'elaborazione del dendrogramma derivato dai polimorfismi ottenuti, si è osservata la presenza di tredici raggruppamenti principali (Belaj et al., 2002).

Osservando le pubblicazioni sopra citate si evince che lo studio del polimorfismo del DNA mediante l'analisi RAPD si è dimostrato di grande utilità, sia ai fini della identificazione varietale, sia ai fini dello studio delle relazioni esistenti tra le diverse accessioni di olivo.

Assieme RAPD e RFLP hanno contribuito alla classificazione tassonomica all'interno del genere *Olea* (Besnard et al., 2002), mentre RAPD abbinati a ISSR hanno permesso, in Portogallo, di valutare la variabilità e l'identificazione di nuove cultivar (Martins-Lopes P., 2007).

4.2.3.2.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

La tecnica AFLP è molto sensibile nel trovare polimorfismi in tutto il genoma. La procedura è stata pubblicata per la prima volta nel 1995 e successivamente modificata, in campo vegetale, nel 2000 (Ranamukhaarachchi et al., 2000).

La tecnica prevede i seguenti passaggi chiave:

- Estrazione del DNA e sua digestione (taglio) con enzimi di restrizione.
- Ligazione di adattatori ai frammenti prodotti (questi adattatori terminano con una sequenza complementare al sito di restrizione e si attaccano ai frammenti di DNA).
- Amplificazione (PCR) con primers identici agli adattatori ma con 2-3 basi azotate in più: in questo modo non si amplificano tutti i frammenti ma solo una parte degli stessi.
- Per la separazione dei frammenti amplificati vengono usati gel di sequenza (di poliacrilamide).

Numerosi sono i vantaggi degli AFLP: sono molto informativi, molto polimorfici (si ottengono fino a 100 bande per lane, delle quali alcune decine sono spesso polimorfiche). La tecnica permette inoltre di produrre sia marcatori dominanti (85% dei casi circa), sia codominanti. Dunque sono da considerarsi un ottimo strumento per scopi di fingerprinting mappaggio e analisi di linkage. Tra gli svantaggi della tecnica meritano invece di essere ricordati l'esigenza di disporre di DNA in grande quantità e di elevata qualità, privo cioè di contaminanti che inibiscano gli enzimi di restrizione inoltre non è altamente riproducibile. La tecnica è inoltre decisamente costosa e richiede l'uso della radioattività, anche se in commercio sono già disponibili metodi non radioattivi per rilevare le amplificazioni.

Gli AFLP sono stati marcatori di ruolo primario nella comprensione delle relazioni genetiche intercorrenti tra le diverse forme di *Olea* esistenti e l'olivo coltivato (Angiolillo et al 1998a; Labombarda e Fontanazza 2002a; Strikic et al., 2005).

Mediante l'utilizzo di marcatori AFLP sono state analizzate le affinità genetiche tra alcune cultivar di diverse regioni italiane, anche nel tentativo di risolvere casi di sinonimie ed

omonimie: in Sicilia (Angiolillo et al., 1999; Baldoni et al., 2002a; Baldoni et al., 2003a; Labombarda e Fontanazza, 2004), Sardegna (Angiolillo et al., 1998b), Liguria (Sebastiani et al. 2004), Umbria (Marchionni et al., 1999; Labombarda et al., 2002b; Baldoni et al., 2003b), Marche (Baldoni et al., 2002b), Molise (Pilla et al., 1999), Campania (Ambrosino et al. 2004), Puglia (Resta et al, 2002) e colli Euganei (Ziliotto et al., 2002).

L'utilizzo di AFLP, inoltre, ha recentemente consentito di individuare numerose similitudini tra alcune cultivar di olivo del Molise e alcune cultivar francesi ed italiane (Angiolillo A., 2006).

4.2.3.2.3. VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*)

I Minisatelliti o Polimorfismi di lunghezza di sequenze ripetute (VNTR), si basano sullo studio di piccole frazioni del genoma che possono essere isolate per mezzo del loro peso specifico. Consistono di ripetizioni a tandem di una corta sequenza di DNA e il polimorfismo è dovuto all'elevato numero di volte che l'elemento può essere ripetuto nel genoma (Soller e Beekmann, 1983). I minisatelliti, dopo digestione del DNA con enzimi di restrizione (taglio al di fuori del minisatellite), sono riconosciuti dopo ibridazione con una sonda; tale sonda riconosce simultaneamente numerosi loci VNTR. La variazione delle sequenze dei minisatelliti fornisce un'impronta genetica stabile del DNA e specifica per ogni individuo (Deumling, 1981).

Per l'uso dei minisatelliti non è necessaria la costruzione di librerie genomiche, la tecnica è costosa (Bartolini e Petruccelli, 1994).

Contento e collaboratori (2002) hanno compiuto uno studio basato sui tandem repeats appartenenti a tre sequenze di DNA nucleico di *Olea europaea* L.

4.2.3.2.4. SSR (*Simple Sequence Repeat*)

I Polimorfismi di Sequenze Semplici o Microsatelliti (SSR) individuano le regioni di DNA caratterizzate da una ripetizione in tandem di una stessa sequenza di 1 – 6 basi azotate. La ripetizione AT è la più frequente nelle piante mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione AC/TG. Differiscono dai minisatelliti VNTRs per la lunghezza del motivo ripetuto, che in questi ultimi è di qualche decina di basi.

I microsatelliti sono diffusissimi e dispersi in tutti i genomi, negli animali come nelle piante, nei lieviti, nei batteri e nei cloroplasti; presentano inoltre un livello elevato di ipervariabilità all'interno di ciascuna specie; questa caratteristica li rende un ottimo strumento sia per la

mappatura sia per il fingerprinting. È stato infatti stimato che la frequenza nel genoma delle piante sia di una SSR ogni 50 kb, valore alquanto variabile da specie a specie. Inizialmente le analisi dei microsatelliti erano basate sulla tecnica RFLP, ovvero il DNA veniva tagliato e poi ibridato con sonde a sequenza ripetuta, cioè omologa alla regione microsatellite. Si è poi dimostrato più conveniente l'uso della tecnica PCR grazie a coppie di primer in grado di riconoscere e quindi amplificare la regione (Fig. 6). Le regioni amplificate sono poi separate mediante elettroforesi su matrici ad alta risoluzione, e negli ultimi anni gli amplificati vengono separati su gel di acrilamide mediante l'uso di sequenziatori automatizzati.

I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo dovuto all'alto tasso di mutazione delle sequenze. Una delle cause della mutazione è lo scivolamento (*slippage*) della polimerasi durante la duplicazione della sequenza: un fenomeno che crea l'allungamento del microsatellite stesso in una delle due catene (Tautz, 1989). Il microsatellite, nonostante lo scarso significato biologico della sua sequenza, può essere considerato un *locus* genetico a tutti gli effetti. E' provato che la tecnica permette di identificare fino a più di una decina di alleli per *locus*.

Di contro questa tecnica ha un'interpretazione delle bande non sempre semplice, alti costi iniziali e una messa a punto lunga e difficile per identificare e sequenziare i microsatelliti al fine di disegnare i primer da unire per la loro amplificazione.

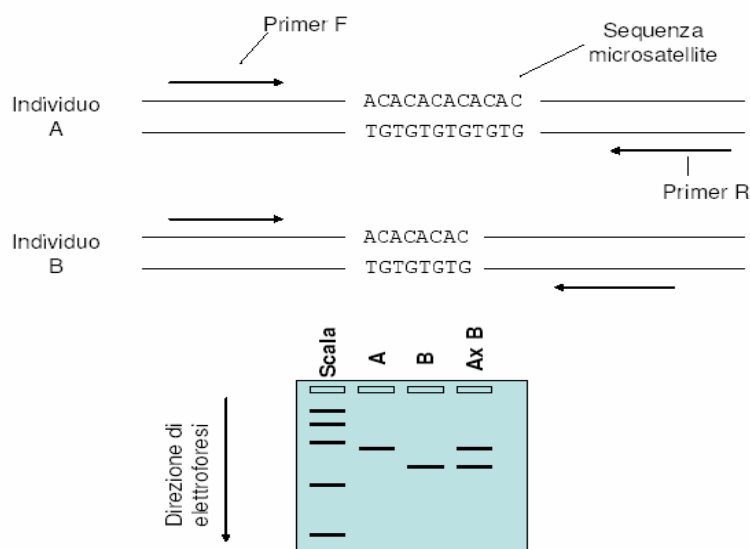


Fig. 6 Schema base sulla tecnica degli SSR.

Allo stato attuale la tecnica SSR si è dimostrata in grado di fornire marcatori molto affidabili e utili per la risoluzione del problema dell'identificazione varietale e della tipizzazione genetica dell'olivo in quanto si è riusciti a dimostrarne l'alta trasferibilità, l'elevato polimorfismo e, aspetto particolarmente interessante per l'olivo, la co-dominanza (Sefc et al., 2000; Bandelj et al., 2002; Carriero et al., 2002; Cipriani et al., 2002; Marrazzo et al., 2002; Belaj et al., 2003b; Belaj et al., 2004b; Belaj et al., 2005a; Belaj et al., 2005b; Bracci et al., 2005; Diaz et al., 2005a; Diaz et al., 2005b; Lopes et al., 2005; Diaz et al., 2006a; Diaz et al., 2006b; Khadari et al., 2007) che li distingue dai marcatori RAPD e AFLP dal carattere dominante. Altri studi che utilizzano i microsatelliti per identificare cultivar di olivo sono eseguiti nel 2000 da Rallo e collaboratori che analizzano quarantasei genotipi reperiti in diversi Paesi. Nel 2001 la tecnica degli SSR è stata utilizzata per caratterizzare antiche cultivar dell'Italia centrale ed in prossimità del lago di Garda (Cipriani et al., 2001).

Aspetti morfologici, fenologici e studi molecolari (marcatori SSR) sono stati utilizzati in Sicilia per la caratterizzazione del germoplasma esistente in questa regione (Caruso et al., 2005). In Iran, nel 2006, è stato possibile identificare nuove cultivar e approfondire la diversità genetica in olivo (Omrani – Sabbaghi et al., 2006).

Con l'utilizzo combinato di RAPD e SSR si è riusciti a dirimere alcuni casi di sinonimie (Barranco et al., 2000b; La Mantia et al., 2006). La combinazione degli stessi marcatori ha portato all'identificazione e caratterizzazione di cultivar di olivo in Emilia Romagna, in nord-Italia, (Ganino et al., 2007) e in Iran (Shahriari et al., 2005).

L'utilizzo simultaneo di AFLP e SSR ha consentito l'identificazione del grado di parentela tra alcune cultivar di olivo slovene e italiane (Bandelj et al., 2004), spagnole, francesi e greche (Montemurro et al., 2005); dell'Emilia-Romagna (Rotondi et al., 2003), tunisine (Taamalli et al., 2006) e liguri (Bracci et al. 2005).

RAPD, AFLP e SSR sono stati utilizzati da Belaj e collaboratori (2003b) per valutare le relazioni genetiche tra cultivar italiane e spagnole.

Isoenzimi, RAPD e SSR sono stati utilizzati per individuare la parentela esistente tra le varietà di olivo presenti nel campo collezione mondiale di Córdoba (Belaj et al., 2005a).

4.2.3.2.5. SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)

Gli SNP costituiscono una nuova ed alternativa tecnica di identificazione molecolare.

Con questo tipo di analisi è possibile individuare in tempi molto brevi differenze di un'unica base all'interno del genoma (Cooper et al., 1985). Questo tipo di marcatori si è rilevato

fortemente discriminante sia in campo umano (Collins et al., 1998), sia in campo vegetale su mais (Rafalski et al., 2001) e soia (Rafalski, 2002). Per le loro caratteristiche, gli SNPs, si presentano come dei potenti marcatori molecolari, tuttavia la conoscenza delle sequenze degli alleli da studiare rappresenta uno dei limiti della tecnica. Gli SNP possono essere identificati attraverso diversi approcci che includono il risequenziamento degli ampliconi ottenuti in PCR, con o senza pre-screening e lo sviluppo di SNP da librerie EST (Expressed Sequence Tag) (Rafalski, 2002).

Attualmente sono disponibili migliaia di marcatori SNP identificati in altre specie quali *Arabidopsis* (3.702), mais (4.577), cipolla (4.676), pino (71.647), riso (4.530), soia (3.847), canna da zucchero (128.810), per l'olivo al momento pochi SNP sono stati isolati.

In olivo gli SNP sono stati utilizzati per la prima volta a Cordoba per classificare 51 cultivar di olivo ottenendo buoni risultati (Díaz Bermúdez, 2005); hanno inoltre permesso di discriminare 49 varietà di olivo coltivate per la produzione di olio nel bacino del Mediterraneo (Consolandi, 2007) e di identificare nuove cultivar (Reale, 2006). Infine, sono tra i marcatori migliori utilizzati per identificare geneticamente oli di oliva extra-vergini e mediante essi è anche possibile determinare la composizione varietale di miscele di oli di oliva (Busconi et al., 2003; Muzzalupo e Perri, 2002; Pasqualone et al., 2004; Pafundo et al., 2005; Testolin 2005; Messina 2007).

4.2.4.2.6. PNA (*Acido Peptido Nucleico*)

Nella valutazione dell'identità genetica, negli ultimi anni, ha preso piede l'impiego di sonde molecolari quali quelle ad Acido Peptido Nucleico (PNA) che sembrano offrire notevoli vantaggi (Germini et al., 2005). Tali sonde sono analoghi del DNA, in cui lo scheletro zuccherofosfato del DNA è sostituito da uno di tipo pseudo-peptidico, costituito da unità di amminoetilglicina legate covalentemente alle nucleo basi.

La particolare struttura molecolare fa sì che il duplex PNA/DNA sia molto più stabile e specifico di quello DNA/DNA. Perciò, i PNA sono molto specifici nelle ibridazioni e risultano sensibili alle mutazioni puntiformi.

Tali caratteristiche fanno dei PNA dei marcatori in grado di offrire notevoli vantaggi applicativi, in particolare rappresentano una nuova modalità per testare l'autenticità degli oli identificando geneticamente le varietà che compongono gli oli stessi. Tuttavia, questa tecnica è relativamente recente e per questo richiede di essere perfezionata.

4.3 Utilizzo simultaneo di marcatori morfologici e molecolari

Meno sviluppata è per contro, allo stato attuale, l'integrazione tra metodiche statistiche applicate alla biometria e l'analisi biomolecolare.

Aspetti morfologici, fenologici e studi molecolari (marcatori SSR) sono stati utilizzati in Sicilia per la caratterizzazione del germoplasma esistente in questa regione (Caruso et al., 2005); l'utilizzo simultaneo di AFLP, RAPD e caratteri morfologici ha consentito di discriminare alcune varietà di olivo greche (Hagidimitriou et al, 2005).

Tuttavia, molte applicazioni di entrambe le metodiche sullo stesso pool genetico (Bassi et al., 2002; Marra et al., 2006) hanno dimostrato che non sempre le due tecniche conducono ad una medesima rappresentazione delle relazioni di similitudine tra le cultivar.

Per questo motivo, si rendono necessari ulteriori approfondimenti prima di poterne garantire l'affidabilità e consigliarne l'applicazione nel settore olivicolo.

MATERIALI E METODI

1. Origine del materiale

1.1 Piantе secolari dell'Emilia: luoghi di ritrovamento

Questo lavoro di tesi fa parte di un progetto di ricerca iniziato nel 2003 dal titolo “*Studio sullo sviluppo dell’olivicoltura da olio in Emilia Romagna, nelle province di Modena, Reggio Emilia, Parma e Piacenza*”.

Il punto di partenza è stato quello di effettuare la ricerca delle piante di olivo, spesso rilevatesi secolari se non plurisecolari.

I siti di ritrovamento delle piante sono stati segnalati da abitanti del luogo (anziani, vecchi contadini, parroci, ecc.) e da indagini storiche, anche se in alcuni casi la scoperta della presenza di esemplari di olivo è stata casuale. Le accessioni individuate sono state nominate con il nome del Comune della zona di ritrovamento della pianta e con un codice numerico identificativo.

Ad oggi sono state individuate e censite 213 piante di olivo lungo la fascia pedemontana dell’Appennino emiliano, più precisamente: 17 accessioni per la provincia di Piacenza, 58 accessioni per la provincia di Parma, 44 accessioni per la provincia di Reggio Emilia e 95 accessioni per la provincia di Modena (Tab 5).

Tali ritrovamenti sono importanti sia da un punto di vista storico-culturale, in quanto sono prove tangibili dell’antica esistenza di questa coltura nel nostro territorio, sia da un punto di vista scientifico in quanto sono il risultato di un rigido processo di selezione naturale (primo tra tutti, le basse temperature, tipiche di queste zone) avvenuto nel corso dei secoli.

La situazione attuale delle piante è molto varia: nella maggior parte dei casi si tratta di piante abbandonate che possono trovarsi in terreni non coltivati con coperture vegetali scarse, in terreni coltivati (vigneti, prati o cereali) o in terreni con coperture arboree fitte (Fig. 7).

Si possono, inoltre, trovare in prossimità di chiese, oppure in proprietà signorili o di ordini ecclesiastici. E’ interessante notare come molte delle località in cui sono state rinvenute tali piante coincidano con quelle citate nell’editto del 1258 (Bianchedi, 1880).

Questi olivi, infine, hanno come caratteristiche comuni l'esposizione (sud – est, sud, sud – ovest) e una certa pendenza del terreno, luoghi quindi riparati da correnti fredde, in assenza di ristagni idrici e ad una altitudine compresa tra i 100 e i 600 m s.l.m.



Fig. 7 Olivi secolari siti rispettivamente nei comuni di Medesano (PR), Vezzano sul Crostolo (RE), Quattro Castella (RE).

Tab. 5 – Accessioni di *Olea europaea* L. delle quattro province emiliane:

a)Piacenza; b)Reggio Emilia; c)Parma; d)Modena.

a)

GERMOPLASMA PIACENZA	ID	GERMOPLASMA PIACENZA	ID
<i>Gropparello</i>	63	<i>Lugagnano Val D'Arda</i>	72
<i>Piozzano</i>	64	<i>Lugagnano Val D'Arda</i>	73
<i>Piozzano</i>	65	<i>Ziano Piacentino</i>	74
<i>Piozzano</i>	66	<i>Castell'Arquato</i>	75
<i>Ziano Piacentino</i>	67	<i>Castell'Arquato</i>	76
<i>Gropparello</i>	68	<i>Castell'Arquato</i>	77
<i>Ziano Piacentino</i>	69	<i>Castell'Arquato</i>	78
<i>Ziano Piacentino</i>	70	<i>Vernasca</i>	79
<i>Lugagnano Val D'Arda</i>	71		

b)

GERMOPLASMA REGGIO EMILIA	ID	GERMOPLASMA REGGIO EMILIA	ID
<i>Quattro Castella</i>	10	<i>Castellarano</i>	138
<i>Albinea</i>	11	<i>Castellarano</i>	139
<i>Albinea</i>	12	<i>Castellarano</i>	140
<i>Albinea</i>	13	<i>Castellarano</i>	141
<i>Albinea</i>	14	<i>Castellarano</i>	142
<i>Quattro Castella</i>	15	<i>Castellarano</i>	143
<i>Quattro Castella</i>	16	<i>Castellarano</i>	144
<i>Quattro Castella</i>	17	<i>Castellarano</i>	145
<i>Quattro Castella</i>	18	<i>Castellarano</i>	146
<i>Quattro Castella</i>	19	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	147
<i>Quattro Castella</i>	20	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	148
<i>Quattro Castella</i>	21	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	149
<i>Quattro Castella</i>	22	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	150
<i>Quattro Castella</i>	23	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	151
<i>Quattro Castella</i>	24	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	152
<i>Quattro Castella</i>	25	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	153

<i>Quattro Castella</i>	26	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	154
<i>Quattro Castella</i>	27	<i>Vezzano sul Crostolo</i>	155
<i>Canossa</i>	134	<i>Albinea</i>	156
<i>Canossa</i>	135	<i>Scandiano</i>	157
<i>Canossa</i>	136	<i>Scandiano</i>	158
<i>S. Polo d'Enza</i>	137	<i>Albinea</i>	224

c)

GERMOPLASMA PARMA	ID	GERMOPLASMA PARMA	ID
<i>Fornovo di Taro</i>	1	<i>Medesano</i>	108
<i>Salsomaggiore Terme</i>	2	<i>Medesano</i>	109
<i>Lesignano de' Bagni</i>	3	<i>Medesano</i>	110
<i>Langhirano</i>	4	<i>Medesano</i>	111
<i>Langhirano</i>	5	<i>Collecchio</i>	112
<i>Medesano</i>	6	<i>Collecchio</i>	113
<i>Fornovo di Taro</i>	7	<i>Collecchio</i>	114
<i>Varano Marchesi</i>	8	<i>Collecchio</i>	115
<i>Varano Marchesi</i>	9	<i>Collecchio</i>	116
<i>Neviano degli Arduini</i>	88	<i>Collecchio</i>	117
<i>Medesano</i>	89	<i>Collecchio</i>	118
<i>Medesano</i>	90	<i>Collecchio</i>	119
<i>Medesano</i>	91	<i>Collecchio</i>	120
<i>Medesano</i>	92	<i>Collecchio</i>	121
<i>Medesano</i>	93	<i>Sala Baganza</i>	122
<i>Medesano</i>	94	<i>Solignano</i>	123
<i>Medesano</i>	95	<i>Solignano</i>	124
<i>Medesano</i>	96	<i>Solignano</i>	125
<i>Medesano</i>	97	<i>Solignano</i>	126
<i>Medesano</i>	98	<i>Solignano</i>	127
<i>Medesano</i>	99	<i>Medesano</i>	128
<i>Medesano</i>	100	<i>Medesano</i>	129
<i>Medesano</i>	101	<i>Cotignaco1</i>	130
<i>Medesano</i>	102	<i>Cotignaco2</i>	131

<i>Medesano</i>	<i>103</i>	<i>Noceto</i>	<i>132</i>
<i>Medesano</i>	<i>104</i>	<i>Felino</i>	<i>133</i>
<i>Medesano</i>	<i>105</i>	<i>Salsomaggiore Terme</i>	<i>159</i>
<i>Medesano</i>	<i>106</i>	<i>Salsomaggiore Terme</i>	<i>160</i>
<i>Varano de' Melegari</i>	<i>107</i>	<i>Terenzo</i>	<i>161</i>

d)

GERMOPLASMA MODENA	ID	GERMOPLASMA MODENA	ID
<i>Castelvetro di Modena</i>	<i>28</i>	<i>Marano sul Panaro</i>	<i>177</i>
<i>Fiorano Modenese</i>	<i>29</i>	<i>Marano sul Panaro</i>	<i>178</i>
<i>Riolunato</i>	<i>30</i>	<i>Marano sul Panaro</i>	<i>179</i>
<i>Castelvetro di Modena</i>	<i>31</i>	<i>Costantini</i>	<i>180</i>
<i>Fiorano Modenese</i>	<i>32</i>	<i>Riolunato</i>	<i>181</i>
<i>Castelvetro di Modena</i>	<i>35</i>	<i>Riolunato</i>	<i>182</i>
<i>Castelfranco Emilia</i>	<i>36</i>	<i>Riolunato</i>	<i>183</i>
<i>Castelfranco Emilia</i>	<i>37</i>	<i>Riolunato</i>	<i>184</i>
<i>Castelfranco Emilia</i>	<i>38</i>	<i>Guiglia</i>	<i>185</i>
<i>Castelfranco Emilia</i>	<i>39</i>	<i>Savignano sul Panaro</i>	<i>186</i>
<i>Castelfranco Emilia</i>	<i>40</i>	<i>Savignano sul Panaro</i>	<i>187</i>
<i>Castelfranco Emilia</i>	<i>41</i>	<i>Prignano sulla Secchia</i>	<i>188</i>
<i>Castelfranco Emilia</i>	<i>42</i>	<i>Prignano sulla Secchia</i>	<i>189</i>
<i>Montebudello</i>	<i>43</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>190</i>
<i>Montebudello</i>	<i>44</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>191</i>
<i>Montebudello</i>	<i>45</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>192</i>
<i>Montebudello</i>	<i>46</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>193</i>
<i>Montebudello</i>	<i>47</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>194</i>
<i>Montebudello</i>	<i>48</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>195</i>
<i>Montebudello</i>	<i>49</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>196</i>
<i>Montebudello</i>	<i>50</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>197</i>
<i>Fiorano Modenese</i>	<i>51</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>198</i>
<i>Fiorano Modenese</i>	<i>52</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>199</i>
<i>Fiorano Modenese</i>	<i>53</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>200</i>
<i>Marano sul Panaro</i>	<i>54</i>	<i>Fiorano Modenese</i>	<i>201</i>

<i>Marano sul Panaro</i>	55	<i>Fiorano Modenese</i>	202
<i>Marano sul Panaro</i>	56	<i>Fiorano Modenese</i>	203
<i>Fiorano Modenese</i>	57	<i>Fiorano Modenese</i>	204
<i>Fiorano Modenese</i>	58	<i>Fiorano Modenese</i>	205
<i>Fiorano Modenese</i>	59	<i>Fiorano Modenese</i>	206
<i>Fiorano Modenese</i>	60	<i>Castelvetro di Modena</i>	207
<i>Fiorano Modenese</i>	61	<i>Castelvetro di Modena</i>	208
<i>Fiorano Modenese</i>	62	<i>Castelvetro di Modena</i>	209
<i>Guiglia</i>	162	<i>Castelvetro di Modena</i>	210
<i>Guiglia</i>	163	<i>Castelvetro di Modena</i>	211
<i>Guiglia</i>	164	<i>Castelvetro di Modena</i>	212
<i>Guiglia</i>	165	<i>Castelvetro di Modena</i>	213
<i>Guiglia</i>	166	<i>Castelvetro di Modena</i>	214
<i>Guiglia</i>	167	<i>Castelvetro di Modena</i>	215
<i>Guiglia</i>	168	<i>Castelvetro di Modena</i>	216
<i>Guiglia</i>	169	<i>Castelvetro di Modena</i>	217
<i>Guiglia</i>	170	<i>Castelvetro di Modena</i>	218
<i>Guiglia</i>	171	<i>Castelvetro di Modena</i>	219
<i>Guiglia</i>	172	<i>Castelvetro di Modena</i>	220
<i>Guiglia</i>	173	<i>Castelvetro di Modena</i>	221
<i>Guiglia</i>	174	<i>Castelvetro di Modena</i>	222
<i>Prignano sulla Secchia</i>	175	<i>Castelvetro di Modena</i>	223
<i>Marano sul Panaro</i>	176		

Nel corso dello studio, inoltre, abbiamo ritenuto interessante inserire nella popolazione in esame un gruppo di accessioni secolari ubicate nella zona di Castrocara Terme (FC) e non ancora caratterizzate; il materiale è stato fornito dal CNR-IBIMET di Bologna (Tab. 6).

Tab. 6 – Accessioni di *Olea europaea* L. della provincia di Forlì-Cesena.

GERMOPLASMA FORLÌ- CESENA	ID	PROVENIENZA MATERIALE
<i>Castrocaro Terme</i> MAT 3	AY	IBIMET (CNR BOLOGNA)
<i>Castrocaro Terme</i> TUM 2	AX	IBIMET (CNR BOLOGNA)
<i>Castrocaro Terme</i> MAT 1	BA	IBIMET (CNR BOLOGNA)
<i>Castrocaro Terme</i> MAT 5	BB	IBIMET (CNR BOLOGNA)
<i>Castrocaro Terme</i> LAN 3	BC	IBIMET (CNR BOLOGNA)
<i>Castrocaro Terme</i> ROC 1	BD	IBIMET (CNR BOLOGNA)
<i>Castrocaro Terme</i> CAS 3	BE	IBIMET (CNR BOLOGNA)

2 Descrizione morfologica

La descrizione morfologica ha interessato soltanto parte dei genotipi censiti, focalizzando lo studio solo sul materiale di due delle quattro province, Parma e Reggio Emilia.

Sono stati considerati, quindi, 61 individui (Tab.7) da cui è stato prelevato il materiale necessario per la compilazione di schede elaiografiche.

La mancanza di un campo collezione non ci ha permesso di poter studiare il comportamento di tutte le piante in condizioni ambientali omogenee.

Pertanto i rilievi sono stati condotti direttamente nei luoghi di ritrovamento degli olivi con lo scopo di costituire una scheda descrittiva. Per la descrizione delle accessioni si è presa in considerazione la metodica adottata dal C.O.I. (Consiglio Oleicolo Internazionale) (Barranco et al., 2000a).

La metodologia è stata opportunamente modificata per la descrizione di piante secolari ed integrata con la scheda adottata per la descrizione del germoplasma dell'Emilia Romagna (Cristoferi et al., 1997).

I caratteri ritenuti importanti per la descrizione del materiale reperito nelle province di Parma e Reggio Emilia sono riportati in tabella 8.

*Tab. 7 Accessioni di Olea europaea L. analizzate mediante marcatori morfologici
per schede elaiografiche*

GERMOPLASMA	ID	GERMOPLASM	ID	GERMOPLASMA	ID
PARMA		A		PARMA	
		PARMA			
<i>Fornovo di Taro</i>	1	<i>Medesano</i>	100	<i>Rubbiano 2</i>	124
<i>Salsomaggiore</i>	2	<i>Medesano</i>	101	<i>Rubbiano 3</i>	125
<i>Terme</i>					
<i>Lesignano de' Bagni</i>	3	<i>Medesano</i>	102	<i>Rubbi.Alto 2</i>	126
<i>Langhirano</i>	4	<i>Medesano</i>	103	<i>Rubbi.Alto 5</i>	127
<i>Langhirano</i>	5	<i>Medesano</i>	104	<i>Medesano</i>	128
<i>Medesano</i>	6	<i>Medesano</i>	105	<i>Medesano</i>	129
<i>Fornovo di Taro</i>	7	<i>Medesano</i>	106	<i>Salsomaggiore</i>	130
				<i>Terme</i>	
<i>Varano Marchesi</i>	8	<i>Varano</i>	107	<i>Salsomaggiore</i>	131
		<i>De'Melegari</i>		<i>Terme</i>	
<i>Varano Marchesi</i>	9	<i>Medesano</i>	108		
<i>Neviano degli</i>	88	<i>Medesano</i>	109		
<i>Arduini</i>					
<i>Medesano</i>	89	<i>Medesano</i>	110	GERMOPLASMA	ID
<i>Medesano</i>	90	<i>Medesano</i>	111	REGGIO EMILIA	
<i>Medesano</i>	91	<i>Collecchio</i>	112	<i>Quattro Castella</i>	10
<i>Medesano</i>	92	<i>Collecchio</i>	113	<i>Albinea</i>	11
<i>Medesano</i>	93	<i>Collecchio</i>	114	<i>Albinea</i>	12
<i>Medesano</i>	94	<i>Collecchio</i>	115	<i>Albinea</i>	13
<i>Medesano</i>	95	<i>Collecchio</i>	116	<i>Albinea</i>	14
<i>Medesano</i>	96	<i>Collecchio</i>	117	<i>Quattro Castella</i>	15
<i>Medesano</i>	97	<i>Collecchio</i>	118	<i>Quattro Castella</i>	21
<i>Medesano</i>	98	<i>Collecchio</i>	119	<i>Quattro Castella</i>	23
<i>Medesano</i>	99	<i>Rubbiano 1</i>	123		

Tab. 8 Caratteri utilizzati per la costituzione delle schede eliografiche

- Dati del passaporto: • Nome della cultivar; • Zona di recupero; • Probabile uso del frutto; • Cure colturali. - Caratteri della pianta: • Diametro della ceppaia; • Conformazione della ceppaia.	- Caratteri del frutto: • Peso; • Forma; • Diametro longitudinale; • Diametro trasversale; • Simmetria; • Umbone; • Presenza di lenticelle; • Invaiaitura; • Forma dell'apice; • Forma della base.
- Caratteri della foglia: • Peso; • Forma; • Lunghezza; • Larghezza; • Curvatura longitudinale della lamina; • Superficie; • Posizione della larghezza massima.	- Caratteri dell'endocarpo: • Peso; • Diametro longitudinale; • Diametro trasversale; • Forma; • Simmetria; • Posizione del diametro trasversale massimo; • Apice; • Base; • Superficie; • Terminazione dell'apice; • Numero di solchi fibro – vascolari.

Nella metodica C.O.I. i caratteri morfologici vengono strutturati in base a descrittori “quantitativi” (grammi, centimetri...) e “qualitativi” (forme, espressioni di caratteristiche morfologiche...).

Al fine di esaminare allo stesso tempo variabili quantitative e qualitative, variabili in scala numerica (es. lunghezza e larghezza), in scala ordinale (es. basso-medio-alto) ed in scala nominale (es. presenza-assenza, colore, forma ecc.), abbiamo apportato dei “descrittori numerici” a ciascun livello (o categoria) di carattere (Tab. 9).

Tab 9. Descrittori primari adottati dal COI

<i>Caratteri della foglia</i>			
			<i>indice</i>
<i>Lunghezza</i>	<i>ridotta</i>	<i><5 cm</i>	<i>1</i>
	<i>media</i>	<i>5-7 cm</i>	<i>2</i>
	<i>elevata</i>	<i>>7 cm</i>	<i>3</i>
<i>Larghezza</i>	<i>ridotta</i>	<i><1 cm</i>	<i>1</i>
	<i>media</i>	<i>1-1,5 cm</i>	<i>2</i>
	<i>elevata</i>	<i>>1,5 cm</i>	<i>3</i>
<i>Forma</i>	<i>ellittica</i>	<i>L/l <4</i>	<i>1</i>
	<i>ellittico-</i>		
	<i>lanceolata</i>	<i>L/l 4-6</i>	<i>2</i>
	<i>lanceolata</i>	<i>L/l >6</i>	<i>3</i>
<i>Angolo basale</i>	<i>Molto acuto</i>		<i>1</i>
	<i>acuto</i>		<i>2</i>
	<i>aperto</i>		<i>3</i>
<i>Angolo apicale</i>	<i>Molto acuto</i>		<i>1</i>
	<i>acuto</i>		<i>2</i>
	<i>aperto</i>		<i>3</i>
<i>Posizione Larghezza massima</i>	<i>Centro-apicale</i>		<i>1</i>
	<i>centrale</i>		<i>2</i>
	<i>Centro basale</i>		<i>3</i>

<i>Caratteri del frutto</i>			
			<i>indice</i>
<i>Peso</i>	<i>Basso</i>	<i><2 g</i>	<i>1</i>
	<i>Medio</i>	<i>da 2 a < 4 g</i>	<i>2</i>
	<i>Elevato</i>	<i>da 4 a 6 g</i>	<i>3</i>
	<i>Molto elevato</i>	<i>>6 g</i>	<i>4</i>
<i>Forma</i>	<i>sferica</i>	<i>L/l <1,25</i>	<i>1</i>
	<i>Ellittica</i>	<i>L/l 1,25-1,45</i>	<i>2</i>
	<i>allungata</i>	<i>L/l >1,45</i>	<i>3</i>
<i>Simmetria</i>	<i>simmetrico</i>		<i>1</i>
	<i>Leggermente</i>		<i>2</i>
	<i>asimmetrico</i>		
	<i>asimmetrico</i>		<i>3</i>
<i>Posizione del diametro trasversale massimo</i>	<i>basale</i>		<i>1</i>
	<i>centrale</i>		<i>2</i>
	<i>apicale</i>		<i>3</i>
<i>Apice</i>	<i>appuntito</i>		<i>1</i>
	<i>rotondo</i>		<i>2</i>
<i>Base</i>	<i>troncata</i>		<i>1</i>
	<i>arrotondata</i>		<i>2</i>
<i>Umbone</i>	<i>assente</i>		<i>1</i>
	<i>presente</i>		<i>2</i>
<i>N° lenticelle</i>	<i>rare</i>		<i>1</i>
	<i>numerose</i>		<i>2</i>
<i>Dimensione lenticelle</i>	<i>piccole</i>		<i>1</i>
	<i>grandi</i>		<i>2</i>

Caratteri endocarpo			
			indice
<i>Peso</i>	<i>basso</i>	<i><0,3 g</i>	<i>1</i>
	<i>medio</i>	<i>0,3-0,45 g</i>	<i>2</i>
	<i>elevato</i>	<i>>0,45 g</i>	<i>3</i>
<i>Forma</i>	<i>sferica</i>	<i>L/l <1,4</i>	<i>1</i>
	<i>ovoidale</i>	<i>L/l 1,4-1,8</i>	<i>2</i>
	<i>ellittica</i>	<i>L/l 1,8-2,2</i>	<i>3</i>
	<i>allungata</i>	<i>L/l >2,2</i>	<i>4</i>
<i>Simmetria</i>	<i>simmetrico</i>		<i>1</i>
	<i>Leggermente</i>		<i>2</i>
	<i>asimmetrico</i>		
	<i>asimmetrico</i>		<i>3</i>
<i>Posizione del diametro trasversale massimo</i>	<i>basale</i>		<i>1</i>
	<i>centrale</i>		<i>2</i>
	<i>apicale</i>		<i>3</i>
<i>Apice</i>	<i>appuntito</i>		<i>1</i>
	<i>rotondo</i>		<i>2</i>
<i>Base</i>	<i>troncata</i>		<i>1</i>
	<i>arrotondata</i>		<i>2</i>
<i>Superficie</i>	<i>liscia</i>		<i>1</i>
	<i>rugosa</i>		<i>2</i>
	<i>scabra</i>		<i>3</i>
<i>N °di solchi fibrovascolari</i>	<i>ridotto</i>	<i><7</i>	<i>1</i>
	<i>medio</i>	<i>7-10</i>	<i>2</i>
	<i>elevato</i>	<i>>10</i>	<i>3</i>
<i>Terminazione dell'apice</i>	<i>mucronato</i>		<i>1</i>
	<i>Senza mucrone</i>		<i>2</i>

Tab. 10 Descrittori primari aggiuntivi (Caruso et al., 2007)

Descrittori frutto-endocarpo			
			indice
<i>Rapporto polpa nocciolo</i>	<i>Basso</i>	<i>< 3</i>	<i>1</i>
	<i>Buono</i>	<i>3-5</i>	<i>2</i>
	<i>Ottimo</i>	<i>>5</i>	<i>3</i>
<i>Invaatura</i>	<i>dalla base</i>		<i>1</i>
	<i>uniforme</i>		<i>2</i>
	<i>dall'apice</i>		<i>3</i>

2.1. Prelievo del materiale e acquisizione dati

Tra il 2004 e 2007, all'epoca di maturazione del frutto ed in altre fasi fenologiche significative, sono stati eseguiti i prelievi di materiale vegetale per la raccolta dei dati necessari alla stesura delle schede morfologiche. Per ogni individuo sono state, inoltre, raccolte informazioni relative alle piante e al sito di ritrovamento.

Per ogni pianta sono stati prelevati 50 foglie/frutti/endocarpi, prelevati in modo randomizzato cercando di coprire tutti i lati della pianta. Per ogni pianta sono stati utilizzati i seguenti criteri di rilevamento:

- *foglie*: il rilievo è stato eseguito staccando le foglie adulte dalla parte mediana dei germogli dell'annata all'altezza dell'osservatore;
- *frutto*: sono stati prelevati dalla zona intermedia dei rami fruttiferi eliminando i frutti malformati o anormalmente piccoli e grossi rispetto all'insieme della popolazione presente;
- *endocarpo*: come per il frutto la descrizione si effettua per le caratteristiche carpologiche;
- *esposizione*: misurata lungo la linea di massima pendenza, mediante l'uso della bussola
- *descrizione della ceppaia*: misurata per il diametro massimo e descritta per la sua composizione in fusto unico o numero di polloni.

I dati biometrici sono stati elaborati statisticamente mediante analisi descrittiva e della varianza seguita da test di Tukey ($p \leq 0,05$) usando il programma statistico XLSTAT 2008 (AddinsoftTM 1995-2008).

L'analisi biometrica ha permesso di ottenere una valutazione media dei caratteri morfologici delle accessioni in esame. I valori medi ottenuti sono stati utilizzati per la compilazione della scheda elaiografica.

3. Caratterizzazione molecolare

Tutta la popolazione, costituita da 220 accessioni (213 individui campionati nelle province emiliane e 7 individui nella provincia di Forlì-Cesena) (Tab. 5 e Tab. 6), è stata sottoposta a caratterizzazione mediante marcatori SSR.

Al fine di ottenere un primo confronto con alcune varietà delle regioni limitrofe e valutare le relazioni intercorrenti con importanti varietà nazionali e di altri paesi europei, sono stati aggiunti alla caratterizzazione, 63 individui appartenenti a cultivar nazionali e internazionali (Tab.11).

Le varietà nazionali sono state scelte, in parte, in base a informazioni storiche nelle quali veniva specificata l'importazione di piante e olio dalle regioni limitrofe, e in parte scelte, in accordo con altri laboratori di ricerca italiani, come standard interni in ogni analisi.

Come standard interni sono state utilizzate le varietà Carolea, Cassanese, Coratina, Frantoio, Leccino, cultivar geneticamente distanti tra di loro e che permettono, quindi, un controllo interno e intra-laboratori, delle metodiche di analisi.

Il materiale vegetale relativo ai genotipi di olivo delle varietà nazionali ed internazionali è stato reperito in parte dal campo collezione dell'Istituto Sperimentale per l'Olivicoltura di Rende (CS), in parte dalla collezione di olivi del CNR-IBIMET di Bologna, in parte dalla collezione del CNR di Firenze e infine, da un campo collezione costituito dell'Università di Parma a Salsomaggiore Terme.

Considerando l'assetto varietale stesso dell'olivo, caratterizzato dalla presenza nell'olivo di "popolazioni di cloni" piuttosto che di cultivar monoclonali, e alla luce della ormai risaputa "confusione varietale" che permane tutt'oggi nelle collezioni di germoplasma, abbiamo ritenuto opportuno prelevare materiale vegetale di medesime varietà nazionali da più campi collezioni.

E' stato inoltre previsto un controllo interno, cioè sono stati considerati come individui separati, 2 campioni di foglie provenienti dalla stessa pianta (numero identificativo 61-62)

Tab.11 Genotipi nazionali ed internazionali di Olea europaea L. utilizzati come standard interni e per confronto varietale.

GERMOPLASMA STANDARD NAZIONALE		
<i>Cultivar</i>	<i>Identificativo</i>	<i>Provenienza materiale</i>
Carolea	A	Rende (campo collezione istituto) <i>Fila 2 Pianta D (4)</i>
Cassanese	C	Rende (campo collezione istituto) <i>Fila 2 Pianta H (8)</i>
Coratina	E	Rende (campo collezione istituto) <i>Fila 4 Pianta B (2)</i>
Leccino	D	Rende (campo collezione istituto) <i>Fila 8 Pianta H (8)</i>
Frantoio	B	Campo mondiale MIRTO (CS) <i>Campo A q2I Fila 4 Pianta 29</i>

EMILIA ROMAGNA		
<i>Cultivar</i>	<i>Identificativo</i>	<i>Provenienza materiale</i>
Carbuncion	AA	Campo mondiale MIRTO (CS)
Emilia	AB	Campo mondiale MIRTO (CS)
Rossina	AC	Campo mondiale MIRTO (CS)
Selvatico	AD	Campo mondiale MIRTO (CS)
Colombina	AE	Campo mondiale MIRTO (CS)
Oliva Grossa	AF	Campo mondiale MIRTO (CS)
Craputea	AG	Campo mondiale MIRTO (CS)
Nostrana di Brisighella	87N	Campo Salsomaggiore (PR)
Correggiolo di Montegrifoldo (Istea45)	AI	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Grappuda (Istea28)	AJ	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Correggiolo di Villa Verucchio (Istea8)	AL	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Rossina (Istea 5)	AM	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Selvatico (Istea 27)	AN	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Frantoio di Villa Verucchio (Istea 40)	AO	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Nostrana di Brisighella (Istea38)	AP	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Leccino (Istea30)	AQ	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Moraiolo (Istea26)	AR	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Colombina(Istea17)	AS	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Capolga (Istea 2)	AT	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Orfana (Istea 1)	AU	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Carbuncion di Carpineta) (Istea24)	AV	IBIMET (CNR BOLOGNA)
Ghiacciolo (Istea 51)	AZ	IBIMET (CNR BOLOGNA)

TOSCANA		
<i>Cultivar</i>	<i>Identificativo</i>	<i>Provenienza materiale</i>
Maurino	83N	Campo Salsomaggiore (PR)
Leccio del Corno	85N	Campo Salsomaggiore (PR)
Cucca	N	Campo mondiale MIRTO (CS)
Santa Caterina	AH	Campo BANNONE (PR)
Santa Caterina	BH	Campo mondiale MIRTO (CS)
Gremignolo	O	Campo mondiale MIRTO (CS)
Gremignolo di Bolgheri	P	Campo mondiale MIRTO (CS)
Moraiolo	BI	Campo mondiale MIRTO (CS)
Moraiolo PG	PG	Campo Collezione C.N.R. (FI)
Moraiolo FI	FI	Campo Collezione C.N.R.. (FI)
Carboncella Pescia		Campo Collezione C.N.R. (FI)
Carboncella Cella		Campo Collezione C.N.R. (FI)
Corniolo		Campo Collezione C.N.R. (FI)
Arancino		Campo Collezione C.N.R. (FI)
Tondello		Campo Collezione C.N.R. (FI)
LIGURIA		
<i>Cultivar</i>	<i>Identificativo</i>	<i>Provenienza materiale</i>
Taggiasca	Q	Campo mondiale MIRTO (CS)
Razzola	R	Campo mondiale MIRTO (CS)
Lavagnina	S	Campo mondiale MIRTO (CS)
Pignola	T	Campo mondiale MIRTO (CS)
Arnasca (Pignola di Arnasco)	U	Campo mondiale MIRTO (CS)
Feglina	V	Campo mondiale MIRTO (CS)
Ottobrino	Z	Campo mondiale MIRTO (CS)
Negrera	Y	Campo mondiale MIRTO (CS)
Olivo delle Alpi	J	Campo mondiale MIRTO (CS)
Spagnola di Missano	X	Campo mondiale MIRTO (CS)
CENTRO ITALIA		
<i>Cultivar</i>	<i>Identificativo</i>	<i>Provenienza materiale</i>
Ascolana Tenera	86N	Campo Salsomaggiore (PR)
Canino CS		Campo mondiale MIRTO (CS)

GERMOPLASMA INTERNAZIONALE		
<i>Cultivar</i>	<i>Paese Provenienza</i>	<i>Provenienza materiale</i>
Arbequina (H)	Spagna	Campo mondiale MIRTO (CS)
Gordal Sevillana (G)	Spagna	Campo mondiale MIRTO (CS)
Manzanilla (F)	Spagna	Campo mondiale MIRTO (CS)
Piquial (I)	Spagna	Campo mondiale MIRTO (CS)
Kalamata (L)	Grecia	Campo mondiale MIRTO (CS)
Koroneiki (M)	Grecia	Campo mondiale MIRTO (CS)
Picholine (BJ)	Francia	Campo mondiale MIRTO (CS)

3.1. Estrazione del DNA da foglie

Le foglie dalle quali è stato estratto il DNA sono state raccolte dalle accessioni in piena fase vegetativa. Per quanto possibile, la raccolta del materiale è stata eseguita avendo cura di prelevare foglie giovani (da germogli dell'anno), esenti da problemi fitosanitari. Il materiale vegetale è stato successivamente conservato, previa immersione in azoto liquido, in congelatore alla temperatura di -80°C.

Il DNA genomico è stato estratto seguendo tre metodologie Gounaris et al., (2002), kit Qiagen e CTAB (Belaj et al., 20001), poiché in ognuna sono stati riscontrati punti critici e conseguenti difficoltà di svolgimento.

1) La *metodologia di Gounaris et al. (2002)*, è stata necessariamente modificata in quanto i tessuti vegetali dell'olivo sono caratterizzati dalla presenza di elevate concentrazioni di fenoli, proteine e carboidrati. Proprio per questo motivo la prima fase della ricerca ha mirato all'ottimizzazione del protocollo di estrazione del DNA.

Un punto critico del protocollo è stato la composizione del tampone di estrazione; utilizzando il tampone di estrazione secondo Gounaris, la quantità di DNA (capacità di estrazione) ottenuta è stata scarsa, è stato quindi modificato il tampone agendo su due punti fondamentali: la forza ionica (Tris-HCl) e il potere chelante (EDTA) (Tab. 12)

Tab. 12 Composizione del tampone di estrazione Gounaris et al. (2002) e differenze di concentrazione e purezza di DNA dell'accessione 34 utilizzando il tampone di estrazione modificato.

Tampone di estrazione:	Tampone di estrazione modificato:
1% SDS (W/V)	1% SDS (W/V)
100 mM NaCl	200 mM NaCl
10 mM EDTA pH 8.0	10 mM EDTA pH 8.0
50 mM Tris-HCl, pH 8.0	100 mM Tris-HCl, pH 8.0
10 mM di 2–Mercaptoetanololo	10 mM di 2–Mercaptoetanololo

Estratto	OD₂₈₀	OD₂₆₀	R	Concentrazione DNA
34 (Gounaris et al.,2002)	0.1095	0.1464	1.3373	0.7320 µg/µl
34 (tampone modificato)	0.1840	0.3159	1.7169	1.5795 µg/µl

Di seguito vengono riportate le fasi dell'estrazione del DNA con metodo Gounaris e tampone modificato:

- 1 g di foglie e polverizzate in azoto liquido;
- aggiungere 7 ml di tampone d'estrazione (Tab. 13)
- sospendere il materiale vegetale;
- incubare a 65°C per 10 min.;
- aggiungere 1.9 ml di Acetato di Potassio 5M;
- agitare;
- incubare in ghiaccio per 20 min.;
- centrifugare a 4°C a 4800 xg per 40 min.;
- trasferire il surnatante in un nuovo tubo;
- aggiungere al surnatante un ugual volume di Isopropanolo e metà della soluzione iniziale di Acetato di Ammonio (7.5M stock);
- lasciare a -20°C per 20 min.;
- centrifugare a 4800 xg per 30 min.;
- scartare il surnatante e lavare il precipitato DNA aggiungendo un ugual volume di etanolo al 75%;
- agitare bene e centrifugare a 4800 xg per 15 min. (per 2 volte);

- scartare il surnatante;
- far seccare il precipitato a temperatura ambiente;
- risospendere il precipitato in 500 µl di tampone TE (Tab. 13)

Tab. 13- Soluzioni utilizzate per l'estrazione del DNA

-	Potassio Acetato 5M
pH	7.5
-	Sodio Acetato 3M pH
	5.2
-	Etanolo 75% (v/v)
-	Acetato d'Ammonio 2M
-	Tampone TE:
	10 mM Tris-HCl, pH 8.0
	1 mM EDTA pH 8.0

Il protocollo di estrazione ha previsto, inoltre, il trattamento del DNA con enzima (RNAsiA); questo processo ha permesso la completa eliminazione dell'RNA che poteva interferire durante il processo di quantificazione del DNA (sovrastimare la quantità di DNA nella reazione di amplificazione).

Una volta avvenuta la reazione enzimatica con RNAsiA, il DNA è stato precipitato e, dopo i lavaggi in etanolo, risospeso in almeno 100 µl di tampone TE.

2) Il kit di estrazione Qiagen è stato utilizzato poiché presenta il vantaggio di una notevole velocità di applicazione, migliorata grazie all'utilizzo, per la polverizzazione, di omogeneizzatore meccanico e per ovviare alle problematiche riscontrate con il metodo Gounaris, con lo scopo di ottenere DNA più puro.

Le fasi di estrazione con kit Quiagen sono le seguenti:

- prelevare 0,1 g di foglie precedentemente polverizzate in azoto con l'ausilio di un omogeneizzatore meccanico (Qiagen TISSUE Ruptor);
- aggiungere alla polvere 400 µl di buffer AP1;
- agitare vigorosamente la soluzione per sospendere il materiale vegetale;
- incubare in bagno riscaldato a 65°C per 10 min;

- aggiungere enzima RNAsiA (5 ng/μl);
- incubare nuovamente a 37°C per 30 min;
- aggiungere 130μl di buffer AP2;
- lasciar riposare in ghiaccio per 5 min;
- trasferire il miscuglio in un nuovo tubo fornito di filtro;
- centrifugare per 2 min a 12000 xg;
- scartare il surnatante e trasferire il filtrato in un nuovo tubo;
- aggiungere il buffer AP3 in quantitativo pari a 1,5 volte il volume iniziale;
- mescolare delicatamente per omogeneizzare il contenuto;
- trasferire in un nuovo tubo con filtro 650 μl del mix ottenuto;
- centrifugare per 1 min a 6000 xg;
- scartare il filtrato e aggiungere al surnatante tutto il mix avanzato dal precedente prelievo;
- centrifugare per 1 min a 6000 xg;
- aggiungere 500 μl di buffer AW
- centrifugare per 1 min a 6000 xg;
- scartare il filtrato;
- aggiungere ancora 500 μl di buffer AW;
- centrifugare per 2 min a 12000 xg;
- scartare il filtrato;
- lasciar seccare la membrana trasferendo il tubo interno fornito di filtro in un tubo normale;
- lavare il DNA con 50μl di buffer AE per 3 volte, intervallando ogni lavaggio con un riposo di 5 min e una centrifuga a 6000 xg per 1 min;
- Diluizione in 150 μl.

Utilizzando il kit Qiagen, tuttavia, le fasi di estrazione sono risultate difficoltose poiché parte dei campioni analizzati è costituita da foglie adulte (caratterizzate da alta concentrazione di carboidrati e polifenoli) e per questo la quantità di DNA estratta non è sempre risultata sufficiente. Inoltre il kit Qiagen ha a suo sfavore un elevato costo.

3) Per questi motivi si è deciso di tornare ad un metodo più tradizionale ed economico che non riscontrasse queste problematiche; è stato quindi applicato il metodo CTAB descritto da Belaj et al. (2001), che comprende l'utilizzo di fenolo/cloroformio, e che permette un lavaggio dei campioni con separazione delle sostanze organiche, evitando così la presenza di possibili interferenti nel corso delle analisi (Fig. 10).

Tale metodologia è piuttosto rapida e permette di ottenere una buona quantità e qualità di DNA estratto

Il protocollo utilizzato viene riportato di seguito:

- prelevare 0,1 g di foglie precedentemente polverizzate in azoto;
- preparazione del tampone di estrazione (500 µl per ogni campione) (Tab.14)

Tab. 14 soluzioni utilizzate per la preparazione di 2 ml di tampone di estrazione per l'estrazione di DNA con metodo CTAB

EDTA 0,25 M
TRIS 1 M
NaCl 2,5 M
CTAB 9%

- aggiungere al tampone DTT (50 µl/ml di tampone);
- incubare a 65°C per 5 min;
- aggiungere 500 µl di buffer a ciascun campione;
- agitare vigorosamente;
- incubare a 65°C per 3 min e successivamente lasciare riposare a T° ambiente per 2-3 min;
- aggiungere 500 µl di cloroformio isoamilico (24:1);
- centrifugare 12000 xg per 10 min;
- trasferire il surnatante;
- aggiungere 2/3 di isopropanolo a -20°C
- riporre a -20°C per almeno 15 min;
- per favorire ulteriormente la precipitazione del DNA riporre a 4°C per 10 min;
- centrifugare a 12000 xg per 5 min ed eliminare il surnatante;
- lavaggio in 500 µl di etanolo 70%;
- Precipitazione in freezer a -20°C ;
- Centrifugare 12000 xg per 7 min;
- Eliminare il surnatante e seccare il pellet;
- Risospendere il pellet in acqua (50-100 µl);
- Aggiungere 5 ng/µl di RNAsiA;
- Incubare in bagno riscaldato a 37°C per 40 min;
- Conservare a -20°C.

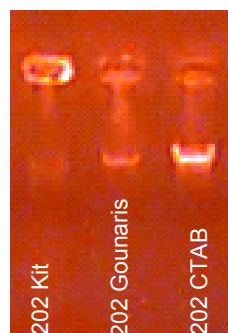


Fig. 10 – Confronto su gel di agarosio (0.8%) della capacità di estrazione del DNA dell'accessione 202 con tre metodi differenti (Kit Qiagen, metodo Gounaris, metodo CTAB).

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

La qualità del DNA è stata valutata inizialmente mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0.8% in TAE 1X in presenza di 0,5 µl/ml di bromuro di etidio, in modo da essere certi di aver eliminato tutto l'RNA e di avere un DNA non degradato. Solo dopo il test su gel si è passati a quantificazione allo spettrofotometro. Quantificato il DNA gli estratti sono stati diluiti in tampone TE portando la concentrazione del DNA di ogni campione a 20 ng/µl e conservati a -20 °C.

3.2. Analisi con marcatori SSR

Un totale di 284 campioni sono stati sottoposti a caratterizzazione con marcatori SSR.

Per l'amplificazione del DNA sono state usate 11 coppie di primer SSR già utilizzati da altri Autori, e che hanno mostrato una buona capacità discriminante: DCA3, DCA4, DCA 9, DCA 16 e DCA 18 (Sefc et al., 2000), UDO 24, UDO 39 e UDO-043 (Marrazzo et al., 2002) e GAPU 59, GAPU 101, GAPU103 (Carriero et al., 2002) (Tab.15)

Tab. 15– Elenco degli oligonucleotidi utilizzati e delle rispettive temperature di annealing.

Primer	Motivo	For 5'→ 3'	Rev 5'→ 3'	Size	T (°C) (annealing)
DCA3	GA	CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC	TGCTTTTGTCGTGTTTGAGATGTTG	250	50
DCA 4	GA	CTTAACTTTGTGCTTCTCCATATCC	AGTGACAAAAGCAAAAGACTAAAGC	136	55
DCA 9	GA	AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG	GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	191	55
DCA 16	(GT)(GA)	TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG	TTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	178	50
DCA 18	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (G A) ₁₉	AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC	GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	183	50
UDO 24	(CA)(TA)(CA)	GGATTATTAAAAAGCAAAACATACAAA	CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA	188	50
UDO 39	(AT)(GT)	AATTACCATGGGCAGAGGAG	CCCCAAAAGCTCCATTATTGT	170	57
UDO-043	GT	TCGGCTTTACAACCCATTTC	TGCCAATTATGGGGCTAACT	174	52
GAPU 59	CT	CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA	CAAAGGTGCACTTTCTCTCG	227	57
GAPU101	GA	CATGAAAGGAGGGGGACATA	GGCACTTGTTGTGCAGATTG	264	57
GAPU 103	(TC) ₂₆	TGAATTAACTTTAAACCCACACA	GCATCGCTCGATTTTATCC	245	57

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume di 25 µl contenente: 1x Tampone di Reazione (International PBI, Milano, IT), 1.5 mM MgCl₂ (International PBI, Milano, IT), 0.2 mM dNTPs (Amersham Biosciences), 0.2 µM primer (MWG Biotech, Ebersberg), 20 ng DNA genomico e 0.6 U di Taq polimerasi (International PBI, Milano, IT). Occorre aggiungere che per i primer UDO 43 e UDO 39, i cui amplificati alla valutazione con elettroforesi su gel di agarosio al 2% risultavano flebili, è stata utilizzata una concentrazione di MgCl₂ pari a 2.5 mM per ottenere un amplificato di maggior qualità.

La reazione di amplificazione è stata ottimizzata in thermal cycler MJ PCT 100 Research (Watertown, Mass.) programmando un primo passaggio a 95°C per 5 minuti seguito da 25 o 35 cicli di 45 secondi a 94°C, 45 secondi alla temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primer (Tab. 12), 45 secondi a 72°C rispettivamente per la denaturazione, l'annealing e l'estensione del primer, al termine dei cicli sono stati effettuati 8 minuti di incubazione a 72°C.

La scelta del numero di cicli in PCR è data al tipo di marcatura del primer e dalla sensibilità del sequenziatore nella lettura della fluorescenza. I primer utilizzati nell'analisi SSR sono stati marcati con due fluorofori, e più precisamente alcuni sono stati marcati con fluorofori ad emissione di luce blu (CY5) e altri con fluorofori ad emissione di luce verde (IRD700). La scelta dei due tipi di marcatura è dipesa dalla possibilità di analizzare contemporaneamente al

sequenziatore due prodotti di amplificazione ottenuti con primer diversi (analisi multiplex). Le amplificazioni con primer marcati con fluoroforo ad emissione di luce verde ha richiesto 35 cicli per ottenere un buon risultato.

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

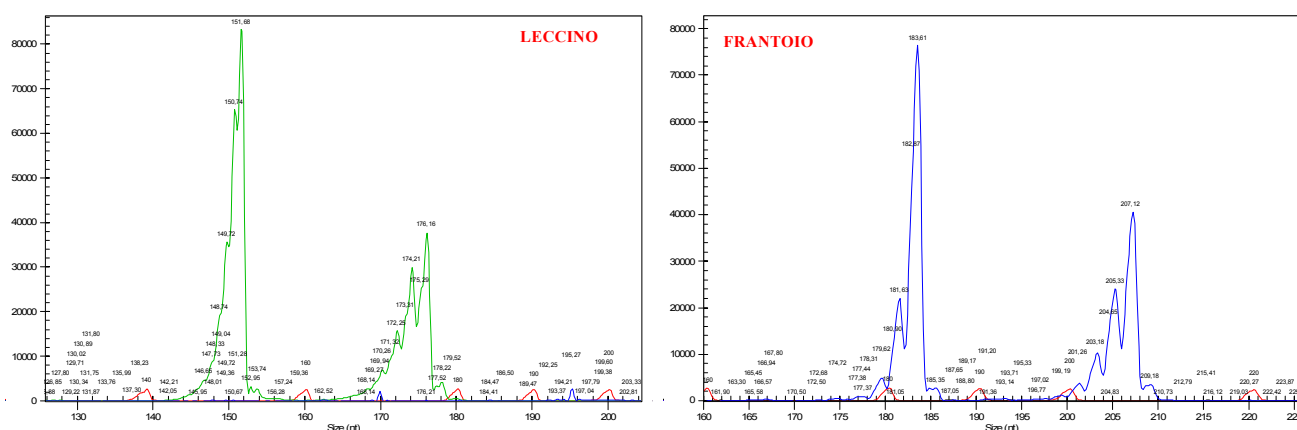


Fig. 11 – Ferogrammi di due cultivar di olivo dopo amplificazione e lettura al sequenziatore con due diversi primer marcati con fluorofori differenti.

3.2.1. Analisi dei dati SSR

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

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

Elaborazione dei dati: la biodiversità della popolazione in studio (costituita da 284 accessioni di olivo) è stata valutata in base al numero di alleli per locus all'interno della popolazione, alla frequenza allelica e alla percentuale di eterozigosi (H), sia osservata (H_0) che attesa (H_E). In particolare, il valore dell'eterozigosi attesa (H_E), in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg, è una misura per valutare la variabilità genetica di una popolazione, cioè la probabilità che estraendo casualmente due alleli dalla popolazione questi siano differenti.

Tali valori sono stati ottenuti utilizzando il software Identity 1.0 (Wagner e Sefc, 1999).

Il livello di similarità tra le accessioni in esame è stato ottenuto attraverso la matrice di similarità genetica utilizzando l'indice Dice (Dice 1945).

L'analisi dei cluster e la costruzione del dendrogramma relativo alle distanze genetiche sono stati ottenuti mediante il metodo UPGMA (Unweighted Pair-Grop Method) mediante software XLSTAT 2008 (Addinsoft™ 1995-2008).

4. Caratterizzazione morfologica

4.1. Creazione di un modello per la caratterizzazione morfologica in ambienti eterogenei

Presupposto imprescindibile per una corretta caratterizzazione morfologica (come proposto dal COI e dalle metodiche attualmente più accreditate), è il reperimento di dati morfologici in un ambiente omogeneo. Oltre a questo aspetto, altrettanto importante e fondamentale è la raccolta dei dati, questi, devono essere replicati per un numero minimo di tre anni (Barranco et al., 2000). Tali metodiche, quindi, sono da ritenersi limitanti in quanto non permettono la

caratterizzazione di individui *in situ*, cioè nell'ambiente in cui le piante vivono, che è la condizione della maggior parte dei genotipi ancora in attesa di identificazione.

Per questo motivo è stato ritenuto interessante elaborare un modello che permettesse una caratterizzazione morfologica di *Olea europaea* L. sia in ambienti omogenei che in ambienti eterogenei, mediante l'utilizzo di quei caratteri meno influenzati dall'ambiente.

Per questa prova è stata utilizzato parte del germoplasma reperito nelle provincie di Parma e di Reggio Emilia.

Infatti, la popolazione in studio, si è rivelata a questo scopo un ottimo punto di partenza, in quanto, come è stato descritto inizialmente, gli individui si trovano in ambienti eterogenei che possono aver altamente influenzato il fenotipo delle piante stesse.

Per incrementare la condizione di eterogeneità e per le condizioni della presente ricerca, i dati morfologici sono stati reperiti in momenti diversi (anni diversi) e non è stata prevista alcuna replica dei dati.

Quindi l'impostazione della prova per la creazione di un modello capace di discriminare le cultivar in base ai caratteri morfologici ha avuto come prerogativa la non omogeneità dell'ambiente.

Tenendo conto di questo, e soprattutto, facendo riferimento ai risultati delle analisi molecolari precedentemente ottenuti (dati certi dipendenti solo dal genoma), si è proceduto all'analisi delle variabili, cercando di identificare la giusta combinazione capace di discriminare le cultivar con un potere discriminante alto e paragonabile ai risultati dei marcatori molecolari affidabili, quali gli SSR (molti Autori, infatti, considerano i microsatelliti marcatori ideali per la caratterizzazione varietale).

Lo studio ha previsto l'analisi di 51 olivi (Tab 16) reperiti nelle province di Parma e di Reggio Emilia.

Queste piante hanno la caratteristica di essere presenti ad altitudini diverse (tra i 100 e i 600 m s.l.m.), di essere in versanti con esposizione sud-est, sud, sud-ovest. Inoltre, le piante si trovano in condizioni di coperture vegetali diverse, alcune si trovano in campi coltivati, quindi in condizione fortemente antropizzata, mentre altre si trovano in ambienti boschivi, più o meno coperte da vegetazione.

Tab 16 Germoplasma sottoposto a caratterizzazione morfologica

GERMOPLASMA	ID	GERMOPLASMA	ID	GERMOPLASMA	ID
PARMA		PARMA		PARMA	
<i>Fornovo di Taro</i>	1	<i>Medesano</i>	100	<i>Rubbiano 2</i>	124
<i>Salsomaggiore</i>	2	<i>Medesano</i>	101	<i>Rubbiano 3</i>	125
<i>Terme</i>					
<i>Lesignano de' Bagni</i>	3	<i>Medesano</i>	102	<i>Rubbi.Alto 2</i>	126
<i>Langhirano</i>	4	<i>Medesano</i>	103	<i>Rubbi.Alto 5</i>	127
<i>Langhirano</i>	5	<i>Medesano</i>	104	<i>Medesano</i>	128
<i>Medesano</i>	6	<i>Medesano</i>	105	<i>Medesano</i>	129
<i>Fornovo di Taro</i>	7	<i>Medesano</i>	106	<i>Contignaco 1</i>	130
<i>Varano Marchesi</i>	8	<i>Varano De'Melegari</i>	107	<i>Contignaco 2</i>	131
<i>Varano Marchesi</i>	9	<i>Medesano</i>	108		
<i>Neviano degli</i>	88	<i>Medesano</i>	109		
<i>Arduini</i>					
<i>Medesano</i>	89	<i>Medesano</i>	110	GERMOPLASMA	ID
<i>Medesano</i>	90	<i>Medesano</i>	111	REGGIO EMILIA	
<i>Medesano</i>	91	<i>Collecchio</i>	112	<i>Quattro Castella</i>	10
<i>Medesano</i>	92	<i>Collecchio</i>	113	<i>Albinea</i>	11
<i>Medesano</i>	93	<i>Collecchio</i>	114	<i>Albinea</i>	12
<i>Medesano</i>	94	<i>Collecchio</i>	115	<i>Albinea</i>	13
<i>Medesano</i>	95	<i>Collecchio</i>	116	<i>Albinea</i>	14
<i>Medesano</i>	96	<i>Collecchio</i>	117	<i>Quattro Castella</i>	15
<i>Medesano</i>	97	<i>Collecchio</i>	118	<i>Quattro Castella</i>	21
<i>Medesano</i>	98	<i>Collecchio</i>	119	<i>Quattro Castella</i>	23
<i>Medesano</i>	99	<i>Rubbiano 1</i>	123		

Per ciascuna di queste piante sono stati prelevati campioni di foglie e frutti, seguendo la metodica COI per tutti i caratteri della pianta (Tab 9 e 10). Solo per alcuni caratteri, per esempio i caratteri descrittivi della foglia, la metodica COI è stata integrata con la metodologia proposta da Cristoferi et al. (1997), mentre per i caratteri “Rapporto Polpa/Endocarpo” e “Invaiatura” è stata adottata la metodologia proposta da Caruso et al. (2007).

4.2. Elaborazioni dati

Sull'insieme dei dati raccolti, sono state applicate tecniche statistiche multivariate.

Le variabili morfologiche utilizzate nell'analisi sono descritte in Tab. 9 e 10 e ad ogni variabile è stato assegnato un descrittore numerico, e mediante software statistico XLSTAT 2008 (AddinsoftTM 1995-2008) sono stati generati dei dendrogrammi mediante cluster analysis (UPGMA) e distanza di legame euclidea.

Successivamente per determinare il peso di ogni variabile ed eliminare eventuali ridondanze causate da correlazioni tra variabili, i dati sono stati analizzati mediante l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) con il software XLSTAT 2008 (AddinsoftTM 1995-2008).

1. Descrizione morfologica

1.1. Schede elaiografiche

61 accessioni reperite sul territorio di Parma e Reggio Emilia (Tab 7) sono state catalogate seguendo la metodologia del C.O.I. (Barranco et al., 2000a), inoltre ogni pianta è stata georeferenziata ed è stata costruita una mappa con la distribuzione delle piante sul territorio.

Per la descrizione morfologica sono stati utilizzati descrittori primari relativi alle caratteristiche della foglia, del frutto e dell'endocarpo, caratteri ritenuti dal C.O.I. indispensabili per l'identificazione delle piante; inoltre le schede relative ad ogni accessione sono state corredate di una serie di illustrazioni relative alla pianta, alla ceppaia, alle foglie, al frutto e all'endocarpo. I dati biometrici sono stati analizzati statisticamente per ottenere le informazioni necessarie per la descrizione delle caratteristiche della foglia, del frutto e dell'endocarpo e per la stesura delle scheda elaiografica.

Di seguito viene riportato un esempio di scheda elaiografica, ma le schede complete sono visibili nel sito www.crpv.it in cui è presente la mappa di Parma e Reggio Emilia con i punti relativi alle zone dove sono state reperite le piante. Ogni punto rappresenta una zona con la descrizione di una o più accessioni di olivo.

PARDELLA 3



Dati del passaporto:

Nome dell'accessione:	Pardella 3
Zona di recupero:	Medesano (PR)
Esposizione:	Sud/Sud - Ovest
Cure colturali:	Nessuna

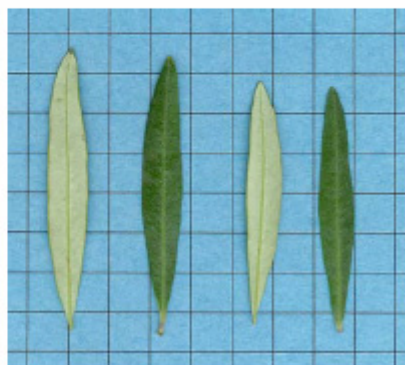


Caratteri della pianta:

Diametro della ceppaia	1.20 m
Conformazione della ceppaia	3 grossi polloni

Caratteri della foglia:

Peso	(0.20 g)
Forma	lanceolata (L/l 6.17)
Lunghezza	media (6.38 cm)
Larghezza	media (1.06 cm)
Posizione della larghezza massima	centrale
Curvatura longitudinale della lamina	piana
Superficie della lamina fogliare	piatta
Dimensione	media (4.66 cm ²)
Angolo apicale	aperto
Angolo basale	aperto



Caratteri del frutto:

Peso	Elevato (5.99 g)
Forma	Ellittica (1.33)
Lunghezza	2.67 cm
Larghezza	2.01 cm
Simmetria	Simmetrico
Posizione diametro trasversale massimo	Centrale
Apice	Appuntito
Base	Troncata
Umbone	Assente
Presenza lenticelle	Numerose
Dimensioni lenticelle	Grandi
Invaiaura	Laterale



Caratteri dell'endocarpo:

Peso	Elevato (0.89 g)
Forma	Ellittica (2.06)
Lunghezza	1.83 cm
Larghezza	0.89 cm
Simmetria	Simmetrico
Posizione diametro trasversale massimo	Centrale
Apice	Appuntito
Base	Appuntita
Superficie	Scabra
Numero solchi fibro – vascolari	10.13
Terminazione dell'apice	Mucronata



Scheda 1 - Scheda elaiografica Olea europaea L. del genotipo Medesano 111

2. Caratterizzazione molecolare

2.1. Caratterizzazione del germoplasma emiliano e relazioni genetiche con cultivar nazionali ed internazionali

Gli 11 oligonucleotidi appartenenti alla serie ssrOeUA-DCA, UDO e GAPU hanno prodotto frammenti di amplificazione polimorfici e riproducibili.

Il polimorfismo allelico ha permesso di discriminare i 284 individui analizzati producendo un totale di 114 alleli. Il numero di alleli a ciascun locus varia tra 4 per il marcatore GAPU 59 e 15 per i marcatori DCA9 e GAPU103, con un numero medio, per i loci indagati, pari a 10,36 (Tab. 17a). Le frequenze alleliche, riportate nella medesima tabella, variano tra 0,002 e 0,563 all'interno della popolazione analizzata.

Relativamente alle accessioni emiliane e alle accessioni di Forlì-Cesena (221 accessioni), gli alleli prodotti sono 89. Il numero di alleli a ciascun locus varia tra 4 per il marcatore GAPU59 e 13 per i marcatori DCA9 e GAPU103, con un numero medio, per i loci indagati, pari a 8,10 (Tab. 17b). Le frequenze alleliche, riportate nella medesima tabella, variano tra 0,002 e 0,547.

La variabilità genetica all'interno della popolazione totale in esame risulta elevata come evidenziano gli indici di eterozigosità osservata ed attesa che si attestano generalmente su valori molto elevati.

Le relazioni tra varietà sono state studiate mediante cluster analysis (UPGMA) e attraverso l'analisi statistica è stato generato un dendrogramma da cui sono emerse delle differenze all'interno della popolazione in esame (Allegato1). Delle 284 accessioni esaminate i marcatori SSR hanno identificato 114 genotipi diversi e 6 casi di sinonimia (Tab.18).

L'analisi del dendrogramma (Allegato 1) evidenzia la classificazione dei genotipi in due "gruppi" principali, di cui uno (**cluster I**) costituito da un gruppo ristretto di individui, l'altro (**cluster II**) costituito dalla maggior parte delle accessioni studiate; tali cluster si separano ad un livello di similarità pari a 0,27.

Il **cluster I**, comprende solo 14 accessioni (per la maggior parte modenesi); queste si dividono in due raggruppamenti che presentano indice di similarità pari ad 1, e 3 genotipi isolati e diversi geneticamente.

Il primo raggruppamento è costituito da due accessioni modenesi (222-223), il secondo, che presenta un caso di **sinonimia** con la "**cultivar Grappuda**" e un caso di **confusione varietale**

riguardante la “**cultivar Arnasca**”, comprende le piante 214, 215, 216, 224, BD, BF, Arnasca, Grappuda; infine, i 3 genotipi isolati sono le piante modenesi 221, 188, 212.

I diversi genotipi del cluster I, inoltre, si trovano tra loro ad un indice di similarità che va da 0,93 a 0,97.

Il **cluster II** è diviso in due principali “sottogruppi”, A e B, questi a loro volta sono costituiti da diversi cluster di ordine via via inferiore; questi raggruppamenti, per semplicità, sono stati definiti “insiemi”.

Il **sottogruppo “A”** è costituito dagli insiemi A1 e A2:

L’**insieme A1** presenta a un livello di similarità di 0,35 un solo genotipo, la cultivar greca Koroneiki.

L’**insieme A2** presenta, tra i genotipi singoli, molte cultivar di origine toscana e romagnola: ad eccezione della cultivar spagnola Arbequina, che si separa dagli altri genotipi appartenenti a questo gruppo per un indice di similarità di circa 0,50, si possono distinguere: le cultivar Moraiolo FI, Tondello, Moraiolo istea28, Corniolo, Pignola (**caso di confusione varietale**), Arancino, Carboncella Pescia, Carboncella Cella, Moraiolo PG, Carbuncion, Rossina CS, Moraiolo CS e le accessioni 130 e 159; il livello di similarità di questi genotipi varia tra 0,73 (livello al quale si distinguono le cultivar romagnole dalle cultivar toscane) e 0,97.

Sono presenti, inoltre, più gruppi a indice di similarità pari a 1:

- il primo gruppo presenta prevalentemente accessioni piacentine (77, 76, 73, 72), una accessione reggiana (154) e una modenese (192) e si trova a una similarità genetica di circa 0,95 da Moraiolo istea 28;
- il secondo comprende due accessioni modenesi (193-196);
- il terzo comprende le accessioni 199, 191, 160, 78, 75, 64 (rispettivamente le prime due appartenenti al germoplasma di Modena, la terza a quello di Parma e le ultime tre a quello di Piacenza);
- infine l’ultimo gruppo, costituito da Selvatico CS, Rossina BO, Selvatico BO, presenta un caso di **sinonimia** tra “**cultivar Selvatico**” e “**cultivar Rossina**” tra le cultivar le due cultivar nazionali prese come confronto varietale.

Il **sottogruppo “B”** è costituito, a sua volta, da un insieme B1 e un insieme B2.

L'**insieme B1**, è costituito da tre individui isolati e diversi geneticamente: la cultivar francese Picholine, l'accessione 157 proveniente dalla provincia di Reggio Emilia e la cultivar spagnola Picual.

Per quanto riguarda l'**insieme B2**, analizzando in dettaglio, è possibile estrapolare due sottoinsiemi: il **sottoinsieme B2.a** e il **sottoinsieme B2.b**; tali sottoinsiemi, a loro volta, sono costituiti da insiemi di ordine inferiore (sottoinsieme B2.a.1, sottoinsieme B2.a.2, sottoinsieme B2.b.1, sottoinsieme B2.b.2).

Sottoinsieme B2.a:

Sottoinsieme B2.a.1:

Questo sottoinsieme è costituito esclusivamente da germoplasma reggiano e non si riscontrano sinonimie con cultivar note messe in esame.

Più in dettaglio troviamo un individuo isolato (149) a indice di similarità di 0,60 e due gruppi a indice di similarità 1; al primo appartengono le piante 13, 12, 11, al secondo le piante 158, 156, 53, 152, 150, 147, 137, 136, 135, 10); i due gruppi si trovano tra loro a un indice di similarità piuttosto elevato, circa 0,93.

Sottoinsieme B2.a.2:

Tale sottoinsieme è composto da altri tre ulteriori raggruppamenti inferiori: sottoinsieme B2.a.2,1, e sottoinsieme B2.a.2,2.

Sottoinsieme B2.a.2,1: presenta solo 2 cultivar : Manzanilla (spagnola) e Olivo delle Alpi (ligure).

Sottoinsieme B2.a.2,2: ad esso appartengono 29 genotipi diversi: 8, 14, 32, 51, 66, 71, 79, 94, 105, 113, 122, 161, 175, 184, 185, AY, BB, BC, Gordal Sevillana, Santa Caterina (vivaio), Orfana, Capolga, Cucca, Feglina, Carolea, Ghiacciolo.

Si distinguono, inoltre 8 gruppi di individui che mostrano identità genetica:

- primo gruppo (**caso di sinonimia** con la **cultivar Santa Caterina**): formato da 23 individui interamente provenienti dalla provincia di Parma, (1, 2, 6, 7, 92, 93, 103, 104, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 132);
- secondo gruppo: costituito da accessione 89 e 90, entrambi parmensi;
- terzo gruppo: formato da accessione 36 e 180 entrambi modenesi;

- quarto gruppo: costituito da ben 29 accessioni tutte provenienti dalla provincia di Modena (30, 35, 37, 38, 52, 53, 54, 55, 56, 162, 163, 164, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 176, 177, 178, 179, 181, 182, 183, 187) ;
- quinto gruppo: comprendente BE-BG, accessioni provenienti da Forlì-Cesena.
- sesto gruppo (**caso di sinonimia** con la **cultivar Nostrana di Brisighella**): identità genetica tra le cultivar “Nostrana di Brisighella” provenienti dal campo collezione di Salsomaggiore e dal CNR IBIMET di Bologna; a queste si aggiunge l’accessione BA (provincia di Forlì-Cesena).
- settimo gruppo (**caso di sinonimia** con la **cultivar Ascolana Tenera e Oliva Grossa**): a indice di similarità uguale a 1 si trovano l’accessione piacentina 68, la cultivar Ascolana Tenera PR, la cultivar Oliva Grossa e l’accessione parmense 96.
- ottavo gruppo: costituito da 4 accessioni modenesi: 189, 59, 58, 57.

Nel sottoinsieme descritto, non sono state individuate accessioni reggiane.

Sottoinsieme B2.a.2,3: ad esso appartengono solo due individui geneticamente diversi: la cultivar Emilia e la cultivar Cassanese.

Sottoinsieme B2.b: anche questo sottoinsieme risulta formato da più sottoinsiemi di ordine inferiore, **B2.b.1** (diviso a sua volta in sottoinsieme B2.b1,1 e B2.b1,2) e **B2. b.2.**

Il **Sottoinsieme B2.b.1,1** si discosta dal **sottoinsieme B2.b.1,2** a un indice di similarità di 0,40 ed è costituito dalla sola cultivar Canino.

Nel **Sottoinsieme B2.b1,2** (considerando unitamente, per sola semplicità di descrizione, i vari sottoinsiemi che man mano si evidenziano procedendo nell’osservazione) troviamo 26 individui geneticamente isolati, a un livello di similarità che varia tra 0,45 e 0,97, (Coratina, Kalamata, 148, 133, 100, 95, 213, Negrera, 46, 42, Gremignolo di Bolgheri, Colombina CS, Colombina ER, 49, Leccio del Corno, Spagnola di Missano, Lavagnina, 70, Razzola, Taggiasca, 138, 203, Ottobrina, 31, 66, 131) e 12 gruppi ognuno a livello di similarità genetica pari a 1:

- primo gruppo: costituito da accessioni provenienti dalle colline di Reggio Emilia: (155, 151, 134, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27);
- secondo gruppo: (**caso di sinonimia** con la **cultivar Maurino**) è formato da tre individui, Maurino, 99, 100 (accessioni parmensi);

- terzo gruppo: accessioni 123, 124, 125, 126, 127, che provengono tutte dal comune di Solignano in Provincia di Parma;
- quarto gruppo: formato dalle accessioni modenesi 210 e 211;
- quinto gruppo: (**caso di sinonimia con la cultivar Leccino e un caso di confusione varietale** riguardante la “**cultivar Gremignolo**”) presenta germoplasma misto (Leccino BO, Leccino CS, 39, 40, 41, 44, 47, 48, 50, 63, 65, Gremignolo);
- sesto gruppo: gruppo che si trova ad un indice di similarità elevata (pari allo 0,95) col precedente; è costituito dalle piante 28, 43, 45;
- settimo gruppo e ottavo gruppo: costituiti da accessioni modenesi (217-218) e (209-208-207) tali gruppi si trovano tra loro a un indice di similarità pari a circa 0,95;
- nono e decimo gruppo: il primo costituito germoplasma misto (201, 200, 146, 145, 88, 29) e il secondo, costituito da quattro accessioni reggiane ed una parmense (197, 144, 143, 142, 141);
- undicesimo gruppo (**caso di sinonimia con la cultivar Frantoio-Correggiolo**): formato da 28 accessioni con germoplasma misto proveniente da tutte e quattro le province in esame (Correggiolo MG BO, Correggiolo VV BO, Frantoio VV BO, Frantoio CS, AX, 3, 9, 61, 62, 67, 69, 74, 91, 97, 98, 102, 107, 128, 129, 139, 140, 190, 195, 198, 205, 206, 219, 220);
- dodicesimo e tredicesimo gruppo, rispettivamente costituiti dalle accessioni 186, 194 e 165, 4, 5.

Sottinsieme B2.b2: ad esso appartengono solo due individui geneticamente diversi: l'accessione 202 e la cultivar Carbuncion di Carpineta.

Tab. 17a – Dimensione degli alleli (bp) individuati nell'analisi della popolazione, numero di alleli amplificati per locus (n), frequenza allelica

(f), eterozigosi osservata (H_0) e attesa (H_E). Le lettere indicano gli alleli per ogni locus.

Allele	Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus		Locus					
	DCA3	f	DCA4	f	DCA9	f	DCA16	f	DCA18	f	UDO24	f	UDO39	f	UDO43	f	GAPU59	f	GAPU101	f	GAPU103	f
<i>a</i>	227	0,002	132	0,408	163	0,225	125	0,009	163	0,002	168	0,058	141	0,003	171	0,005	209	0,352	186	0,153	138	0,100
<i>b</i>	232	0,194	134	0,255	173	0,062	127	0,171	167	0,002	174	0,127	167	0,002	175	0,023	213	0,563	191	0,162	152	0,123
<i>c</i>	237	0,158	142	0,030	181	0,003	148	0,090	169	0,002	180	0,109	170	0,002	177	0,102	219	0,005	193	0,090	159	0,002
<i>d</i>	239	0,047	153	0,005	183	0,148	151	0,338	171	0,005	182	0,158	173	0,317	179	0,377	223	0,079	198	0,018	162	0,137
<i>e</i>	243	0,46	156	0,002	185	0,060	155	0,132	173	0,106	184	0,009	177	0,044	183	0,002			200	0,211	164	0,146
<i>f</i>	245	0,030	163	0,011	187	0,026	157	0,127	175	0,005	186	0,003	180	0,542	187	0,003			202	0,204	166	0,005
<i>g</i>	249	0,113	166	0,227	193	0,003	166	0,005	177	0,437	188	0,528	183	0,007	189	0,002			207	0,056	168	0,003
<i>h</i>	253	0,209	186	0,007	195	0,097	173	0,012	179	0,225	191	0,003	191	0,077	191	0,032			209	0,002	174	0,044
<i>i</i>			189	0,055	197	0,002	176	0,125	181	0,044	204	0,003	193	0,003	203	0,003			219	0,102	176	0,232
<i>l</i>					199	0,005			183	0,003					212	0,005			221	0,002	179	0,012
<i>m</i>					201	0,003			185	0,169					214	0,097					181	0,002
<i>n</i>					205	0,023									216	0,139					185	0,002
<i>o</i>					207	0,313									218	0,150					187	0,005
<i>p</i>					209	0,002									220	0,049					189	0,180
<i>q</i>					211	0,007									223	0,011					193	0,005
<i>r</i>																						
n	8		9		15		9		11		9		9		15		4		10		15	
H_E		0,989		0,712				0,801		0,717		0,664		0,597		0,792		0,552		0,842		0,846
H₀		0,817		0,799				0,937		0,757		0,535		0,275		0,937		0,746		0,996		0,795

Tab. 17b – Dimensione degli alleli (bp) individuati nell'analisi della popolazione relativa all'Emilia e ai campioni di Forlì-Cesena, numero di alleli amplificati per locus (n), frequenza allelica (f), eterozigosi osservata (H_0) e attesa (H_E). Le lettere indicano gli alleli per ogni locus.

Allele	Locus			Locus			Locus			Locus			Locus			Locus			Locus														
	DCA3	f		DCA4	f		DCA9	f		DCA16	f		DCA18	f		UDO24	f		UDO39	f		UDO43	f		GAPU59	f		GAPU101	f		GAPU103	f	
<i>a</i>	232	0,184		132	0,424		163	0,247		125	0,004		163	0,002		168	0,052		173	0,336		171	0,0067		209	0,379		186	0,161		138	0,092	
<i>b</i>	237	0,168		134	0,247		173	0,056		127	0,195		173	0,106		174	0,146		177	0,036		175	0,018		213	0,555		191	0,188		152	0,076	
<i>c</i>	239	0,038		142	0,030		183	0,155		148	0,054		177	0,437		180	0,081		180	0,540		177	0,112		219	0,002		193	0,065		162	0,155	
<i>d</i>	243	0,240		153	0,004		185	0,036		151	0,345		179	0,225		182	0,161		183	0,004		179	0,377		223	0,065		198	0,018		164	0,159	
<i>e</i>	245	0,025		163	0,002		187	0,025		155	0,141		181	0,044		184	0,011		191	0,083		191	0,027					200	0,213		166	0,005	
<i>f</i>	249	0,121		166	0,253		195	0,094		157	0,132		185	0,169		188	0,547					212	0,002					202	0,211		168	0,005	
<i>g</i>	253	0,224		189	0,040		197	0,002		173	0,007					191	0,002					214	0,096					207	0,034		174	0,056	
<i>h</i>							199	0,002		176	0,121											216	0,159					219	0,110		176	0,235	
<i>i</i>							201	0,002														218	0,155							179	0,016		
<i>l</i>							205	0,022														220	0,038							185	0,002		
<i>m</i>							207	0,327														223	0,009							187	0,007		
<i>n</i>							209	0,002																						189	0,188		
<i>o</i>							211	0,009																						193	0,004		
n	7			7			13			8			6			7			5			11			4			8			13		
H_E		0,813			0,693			0,793			0,790			0,685			0,644						0,784			0,545			0,831			0,842	
H₀			0,995			0,807			0,986			0,919			0,708			0,560					0,928			0,780			0,996			0,829	

Tab. 18 – Sizing allelico dei genotipi isolati dall'analisi con marcatori SSR e per gli undici locus indagati (DCA3, GAPU e UDO)

Genotipo	DCA3				DCA4				DCA9				DCA16				DCA18				UDO24				UDO39				UDO43				GAPU59				GAPU101				GAPU103			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4								
Gruppo222-223	239	245			132	134	173	187			151	155		173	185	168	168			180	191	191	220	209	209	191	200				176	176												
	239	245			132	134	173	187			151	155		<u>177</u>	185	168	168			180	191	191	218	209	209	191	200				176	176												
	239	245			132	<u>132</u>	173	187			151	155		173	185	168	168			180	191	191	218	209	209	191	200				176	176												
	239	245			132	134	173	187			151	155		173	185	168	168			180	191	191	218	209	209	191	200				176	<u>179</u>												
Gruppo Grappuda	239	245			132	134	173	187			151	155		173	185	168	168			180	191	191	218	209	209	191	200				176	176												
Koroneki	239	239			134	156	183	207			148	151		173	175	188	191			193	193	175	218	213	213	193	207				152	162												
Arbequina	232	243			134	163	185	207			125	148		169	179	204	204			177	177	179	179	213	213	186	207				152	162												
Moraiolo FI	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	<u>177</u>	216	<u>209</u>	223	193	<u>207</u>				152	152												
Tondello	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	<u>182</u>	<u>182</u>			180	180	179	216	<u>209</u>	<u>213</u>	193	<u>207</u>				152	152												
Moraiolo ER	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>223</u>	213	223	193	<u>207</u>				152	152												
Gruppo 192	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	216	213	223	193	<u>207</u>				152	152												
Gruppo 193-196	232	243			132	189	185	205			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>220</u>	213	223	193	<u>207</u>				152	152												
130	232	243			132	189	195	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>220</u>	213	223	193	<u>207</u>				152	152												
Corniolo	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			<u>173</u>	180	179	<u>220</u>	213	213	193	<u>207</u>				152	152												
Pignola	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>220</u>	213	<u>213</u>	193	<u>207</u>				152	152												
Gruppo 199	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>220</u>	213	223	193	<u>207</u>				152	152												
Arancino	232	243			132	<u>186</u>	185	207			148	151		179	185	<u>182</u>	<u>182</u>			180	180	179	<u>220</u>	213	223	193	<u>207</u>				152	152												
Moraiolo CS	232	243			132	<u>186</u>	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>220</u>	<u>209</u>	<u>213</u>	193	<u>207</u>				152	152												
Carboncella Pescia	232	243			132	<u>186</u>	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>220</u>	213	223	193	<u>207</u>				152	152												
Carboncella Cella	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	<u>220</u>	<u>209</u>	<u>213</u>	193	202				152	152												
159	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	216	213	223	<u>186</u>	202				152	152												
Moraiolo PG	232	243			132	189	185	207			148	151		179	185	180	180			180	180	179	216	213	223	193	202				152	152												
Carbuncion	232	243			132	189	173	185			148	151		173	185	180	180			173	180	179	220	209	223	193	207				152	152												
Rossina CS	232	243			142	189	173	185			148	151		173	185	180	180			<u>170</u>	191	179	191	213	223	193	207				152	152												
Rossina-Selvatico	232	243			142	189	173	185			148	151		173	185	180	180			180	191	179	191	213	223	193	207				152	152												
Picholine	232	253			163	163	193	195			148	176		171	181	188	188			173	180	212	220	213	213	202	207				152	193												

157	249	249	189	189	173	195	125	151	177	177	168	188	173	173	212	216	213	200	202	189	193										
Piquel	237	249	134	134	185	193	127	155	171	177	188	188	173	173	212	216	209	213	193	219	138	138									
149	243	249	132	166	163	183	151	151	179	185	188	188	173	173	179	216	213	200	219	174	176										
Genotipo	1	2	3	4	1	2	1	2	3	1	2	1	2	3	1	2	1	2	3	4	1	2	3	4							
Gr. 13	243	249	142	166	163	173	127	151	181	185	188	188	191	191	171	214	213	223	193	219	174	176	174	176							
Gr. 158	243	249	142	166	163	173	127	151	181	185	188	188	191	191	179	214	213	223	193	219	174	174	174	174							
Manzanilla	245	253	134	134	163	207	155	176	173	181	168	188	180	180	214	214	213	223	200	221	138	152	138	152							
Olivo delle Alpi	245	253	134	166	163	207	125	176	173	179	168	188	180	180	179	220	213	213	193	202	189	189	189	189							
Gordal Sivillana	249	253	163	163	163	195	127	176	177	185	188	188	177	177	177	214	213	223	202	219	138	189	138	189							
S. Caterina vivaio	249	253	166	166	163	195	127	176	179	181	188	188	183	183	177	216	213	213	202	219	211	138	189	138	189						
105	249	253	166	166	163	195	127	176	177	185	188	188	180	180	179	216	213	213	202	219	138	185	138	185							
8	249	253	132	166	163	195	127	176	177	185	188	188	180	180	179	216	213	213	202	219	138	189	138	189							
Gr. S. Caterina	249	253	166	166	163	195	127	176	177	185	188	188	180	180	179	216	213	213	202	219	138	189	138	189							
Gruppo 89-90	249	253	153	166	163	195	127	176	177	185	188	188	180	180	177	214	213	213	202	219	138	189	138	189							
113	249	253	166	166	163	195	127	176	177	185	188	188	180	180	177	216	213	213	202	219	138	189	138	189							
Orfana	249	253	166	166	163	195	127	176	177	185	188	188	180	180	177	203	213	213	202	219	138	189	138	189							
94	239	249	132	132	195	207	151	176	177	185	188	188	180	180	179	214	209	213	200	202	162	189	162	189							
122	239	253	134	134	195	205	155	176	177	177	188	188	180	180	179	214	209	213	191	202	162	189	162	189							
161	239	253	134	134	195	205	155	176	177	177	180	180	180	180	179	214	209	213	191	202	162	189	162	189							
79	239	243	132	134	205	207	151	155	173	177	174	188	180	180	179	216	209	209	191	200	162	168	162	168							
Capolga	232	239	132	134	205	207	151	157	173	177	174	188	180	180	179	216	209	213	191	200	162	176	162	176							
Cucca	237	253	134	166	163	181	151	166	175	183	174	188	141	180	179	187	209	213	186	202	162	189	162	189							
Feglina	237	253	134	166	163	181	151	166	173	183	174	188	141	180	179	187	209	213	186	202	162	189	162	189							
32	237	253	232	243	132	134	163	207	183	127	151	157	177	177	174	188	182	173	180	179	218	209	213	191	202	186	200	162	189	164	176
185	232	253	132	166	163	195	127	151	177	177	174	188	180	180	177	179	209	213	191	202	162	176	162	176							
51	232	253	132	166	163	211	127	151	177	177	174	188	180	180	177	179	209	213	191	202	162	189	162	189							
36-180	232	253	132	166	163	211	127	151	177	177	174	188	180	180	177	179	209	213	191	202	162	179	162	179							
14	237	253	232	243	132	166	163	207	183	127	151	157	177	177	174	188	182	173	180	177	179	209	213	191	202	186	200	162	189	176	
184	232	253	132	166	163	199	127	151	177	177	174	188	180	180	177	179	209	213	191	202	162	189	162	189							
175	232	253	132	166	163	207	127	151	177	177	174	188	180	180	177	179	209	213	191	202	174	189	174	189							
Gr. 187	232	253	132	166	163	207	127	151	177	177	174	188	180	180	177	179	209	213	191	202	162	189	162	189							
BE-BG	232	253	132	166	195	207	127	155	173	181	188	188	180	183	177	179	209	213	191	219	138	162	138	162							
BC	232	253	132	163	195	201	155	176	173	177	174	188	180	180	177	179	213	213	191	202	138	162	138	162							

BB	232	253	132	166	195	209	155	176	173	177	174	188	180	180	177	179	213	213	191	202	138	162											
Gr Nostrana																																	
Brisighella	232	253	132	166	195	207	155	176	173	177	174	188	180	180	177	179	213	213	191	202	138	162											
Carolea	232	253	132	166	163	199	127	155	179	181	186	188	180	180	177	179	213	219	193	219	138	176											
Genotipo	DCA3			DCA4			DCA9			DCA16			DCA18			UDO24			UDO39			UDO43			GAPU59			GAPU101			GAPU103		
	1	2	3	4	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
Gr. Ascolana T./																																	
Oliva Grossa	232	249	134	166	195	209	127	155	173	177	174	188	180	180	179	214	213	213	200	202	138	176											
AY	239	249	134	134	195	205	127	155	173	181	188	188	180	180	179	214	213	213	200	219	138	176											
Ghiacciolo	239	249	134	134	195	205	127	155	173	181	188	188	180	180	179	214	213	213	200	209	219	138	176										
gruppo189	232	249	132	132	163	207	155	176	173	185	174	188	180	180	177	179	209	213	200	219	138	176											
66	232	249	132	166	163	205	155	176	173	177	188	188	180	180	177	216	209	213	200	202	179	189											
71	232	249	132	166	163	205	155	176	173	177	188	188	180	180	177	214	209	213	200	202	179	189											
Emilia	232	245	132	189	183	187	155	176	177	185	168	188	180	180	179	183	209	213	186	193	152	162											
Cassanese	232	249	134	134	163	187	148	176	175	177	168	188	180	180	177	179	213	213	193	219	138	159											
Canino CS	227	239	134	153	173	185	151	166	167	179	182	188	180	180	179	189	213	223	186	200	162	176											
Coratina	239	243	132	166	183	195	151	173	177	181	168	188	173	180	179	203	209	223	193	219	138	164											
Kalamata	239	243	132	166	183	195	151	173	177	181	168	188	173	180	179	220	209	213	200	219	138	164											
148	232	237	132	166	183	207	127	155	173	179	174	182	173	180	214	218	209	213	186	191	162	164											
Gruppo 155	232	237	132	134	183	207	155	155	173	179	174	182	173	180	216	216	209	213	186	191	162	164											
Craputea	232	243	132	132	163	183	148	151	177	179	182	188	173	180	179	214	213	213	191	198	164	189											
133	237	239	132	134	205	207	155	155	177	177	182	188	173	180	179	214	209	213	191	200	138	189											
100	237	253	243	232	134	163	207	151	173	173	177	182	191	180	180	179	214	209	213	191	198	176											
Gr Maurino	237	253	132	134	205	207	151	173	177	177	182	182	180	180	179	214	209	213	191	198	164	189											
Gruppo 127	243	253	132	132	163	207	148	157	179	179	188	188	173	180	175	179	209	213	191	198	162	176											
Gruppo 210-211	243	253	132	134	163	207	127	157	177	177	182	188	180	180	179	218	209	213	186	191	162	164											
95	243	253	132	132	207	207	148	151	177	179	180	188	173	177	175	218	213	213	186	202	176	189											
213	243	253	132	132	163	207	148	151	177	177	180	188	173	177	175	218	209	213	200	202	164	189											
Negrera	243	253	132	132	163	207	151	173	177	179	182	188	173	177	214	218	213	223	200	202	176	189											
46	243	253	132	134	163	209	151	176	177	177	188	188	173	177	214	218	209	213	200	202	176	189											
Gruppo Leccino	243	253	132	134	163	207	151	176	177	177	188	188	173	177	214	218	209	213	200	202	176	189											
42	243	253	132	134	163	207	151	176	177	177	188	188	173	177	214	218	209	213	200	202	176	193											
Gruppo 45	243	253	132	134	163	207	151	176	177	177	188	188	173	177	214	218	209	213	200	202	176	187											
Gremignolo di	237	253	132	132	163	207	157	176	177	179	188	188	173	177	175	218	209	209	186	202	164	189											

Bolgheri																									
Colombina CS	232	243	132	134	163	207	157	176	177	179	188	188	180	180	175	179	209	213	200	202	176	189			
Colombina ER	232	243	132	134	163	207	157	176	177	179	188	188	173	180	175	179	209	213	200	202	176	189			
49	237	253	132	166	163	207	183	148	157	177	179	182	188	180	180	175	218	209	213	200	202	176	189		
Leccio del Corno	237	253	132	132	183	207	148	157	177	179	182	188	180	180	175	218	209	213	200	202	176	189			
Spagnola di Missano	237	249	134	134	183	195	127	157	179	181	188	188	173	180	179	220	213	213	186	200	164	176			
Genotipo	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	1	2	3	4	1	2	3	4
70	232	243	132	134	205	207	127	151	177	181	188	188	173	180	179	218	209	213	200	200	164	176			
Lavagnina	237	237	132	186	173	183	148	151	177	185	182	188	167	173	179	218	213	213	186	200	176	176			
Razzola	239	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	216	209	209	186	200	164	176			
Taggiasca	237	243	132	134	183	201	151	157	177	179	182	188	173	173	179	218	213	223	186	200	164	176			
138	237	243	132	134	183	211	151	157	177	179	182	188	173	173	179	218	209	213	186	200	168	176			
203	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	223	209	213	186	200	166	176			
Ottobrino	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	218	213	213	186	200	166	176			
218-217	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	220	209	213	186	200	164	179			
31	237	243	132	134	183	197	151	157	177	179	182	188	173	173	179	220	209	213	186	200	164	176			
209-208-207	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	220	209	213	186	200	164	176			
gruppo 201	237	243	132	134	183	209	151	157	177	179	182	188	173	173	179	218	209	213	186	200	164	176			
gruppo 197	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	184	188	173	173	179	218	209	213	186	200	164	176			
Gruppo Frantoio	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	218	209	213	186	200	164	176			
60	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	218	209	213	186	200	176	176			
204	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	218	209	213	186	200	166	176			
186-194	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	216	209	213	186	200	164	176			
131	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	214	209	213	186	200	164	176			
165-4-5	237	243	132	134	183	207	151	157	177	179	182	188	173	173	179	223	209	213	186	200	164	176			
202	243	253	134	134	163	185	125	151	163	179	174	188	173	173	191	214	209	219	193	200	152	152			
Carbuncion di																									
Carpineta	243	245	132	134	173	199	125	155	171	179	186	188	173	191	179	223	213	219	191	207	152	181			

3. Caratterizzazione morfologica

3.1. Creazione di un modello per la caratterizzazione morfologica in ambienti eterogenei

Al fine di creare un modello che potesse permettere una caratterizzazione morfologica in ambienti eterogenei sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata i dati morfologici (Tab. 9 e 10) di 51 accessioni (Tab. 16) tra le più rappresentative della popolazione in studio.

A tale scopo, a partire dalle 22 variabili morfologiche (Tab. 9 e 10) inizialmente prese in esame, mediante elaborazioni statistiche di dendrogrammi successivi (con cluster analysis (UPGMA) e distanza di legame euclidea) sono state selezionate 17 variabili (Tab.19) grazie al confronto con la cluster analysis ottenuta mediante caratterizzazione molecolare (tecnica altamente affidabile, in quanto basata sullo studio del genoma e quindi non influenzata dall'ambiente).

Per lo studio condotto e per la popolazione in studio, si è ipotizzato che le variabili selezionate fossero quelle meno influenzate dall'ambiente.

Nel dendrogramma (Fig 12 a) si possono evidenziare due cluster principali: **Cluster I e Cluster II**

Il Cluster I è costituito da un gruppo di individui a distanza di legame 0, rispettivamente le accessioni 1, 2, 6, 8, 92, 93, 104, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 117, 120 e due individui isolati, l'accessione 103 e l'accessione 14.

Il Cluster II è costituito da due insiemi, **insieme A e insieme B**.

L' **insieme A** è a sua volta suddiviso in due sottoinsiemi:

Il **sottoinsieme A1**, a cui appartengono, un gruppo di accessioni a distanza di legame 0 (3, 4, 5, 9, 102, 107, 128, 129) e un individuo isolato, l'accessione 149.

Il **sottoinsieme A2** è costituito da 2 raggruppamenti di individui, al primo appartengono le accessioni 15, 21, 23, 151, al secondo le accessioni 123, 124, 125, 126, 127.

Si distinguono, inoltre, 6 accessioni distanti: 122, 130, 131, 148, 133, 154.

L'insieme B è suddiviso in due sottoinsiemi: sottoinsieme B1 e sottoinsieme B2

Al **sottoinsieme B1** osserviamo l'accessione 10 e un gruppo di individui 147, 152, 153 a distanza di legame 0.

Il **sottoinsieme B2** è costituito da un unico gruppo: le accessioni 11, 12, 13.

Tab 19 Caratteri morfologici scelti in quanto poco influenzati dall'ambiente.

Caratteri del frutto			
			indice
<i>Forma</i>	<i>sferica</i>	<i>L/l <1,25</i>	<i>1</i>
	<i>Ellittica</i>	<i>L/l 1,25-1,45</i>	<i>2</i>
	<i>allungata</i>	<i>L/l >1,45</i>	<i>3</i>
<i>Simmetria</i>	<i>simmetrico</i>		<i>1</i>
	<i>Leggermente asimmetrico</i>		<i>2</i>
	<i>asimmetrico</i>		<i>3</i>
<i>Posizione del diametro trasversale massimo</i>	<i>basale</i>		<i>1</i>
	<i>centrale</i>		<i>2</i>
	<i>apicale</i>		<i>3</i>
<i>Apice</i>	<i>appuntito</i>		<i>1</i>
	<i>rotondo</i>		<i>2</i>
<i>Base</i>	<i>troncata</i>		<i>1</i>
	<i>arrotondata</i>		<i>2</i>
<i>Umbone</i>	<i>assente</i>		<i>1</i>
	<i>presente</i>		<i>2</i>
<i>N° lenticelle</i>	<i>rare</i>		<i>1</i>
	<i>numerosa</i>		<i>2</i>
<i>Dimensione lenticelle</i>	<i>piccole</i>		<i>1</i>
	<i>grandi</i>		<i>2</i>
Caratteri endocarpo			
			indice
<i>Forma</i>	<i>sferica</i>	<i>L/l <1,4</i>	<i>1</i>
	<i>ovoidale</i>	<i>L/l 1,4-1,8</i>	<i>2</i>
	<i>ellittica</i>	<i>L/l 1,8-2,2</i>	<i>3</i>
	<i>allungata</i>	<i>L/l >2,2</i>	<i>4</i>
<i>Simmetria</i>	<i>simmetrico</i>		<i>1</i>
	<i>Leggermente asimmetrico</i>		<i>2</i>
	<i>asimmetrico</i>		<i>3</i>
<i>Posizione del diametro trasversale massimo</i>	<i>basale</i>		<i>1</i>
	<i>centrale</i>		<i>2</i>
	<i>apicale</i>		<i>3</i>
<i>Apice</i>	<i>appuntito</i>		<i>1</i>
	<i>rotondo</i>		<i>2</i>

<i>Base</i>	<i>troncata</i>		<i>1</i>
	<i>arrotondata</i>		<i>2</i>
<i>Superficie</i>	<i>liscia</i>		<i>1</i>
	<i>rugosa</i>		<i>2</i>
	<i>scabra</i>		<i>3</i>
<i>Terminazione dell'apice</i>	<i>mucronato</i>		<i>1</i>
	<i>Senza mucrone</i>		<i>2</i>
<i>Descrittori frutto-endocarpo</i>			
			<i>indice</i>
<i>Rapporto polpa nocciolo</i>	<i>Basso</i>	<i>< 3</i>	<i>1</i>
	<i>Buono</i>	<i>3-5</i>	<i>2</i>
	<i>Ottimo</i>	<i>>5</i>	<i>3</i>
<i>Inviaitura</i>	<i>dalla base</i>		<i>1</i>
	<i>uniforme</i>		<i>2</i>
	<i>dall'apice</i>		<i>3</i>

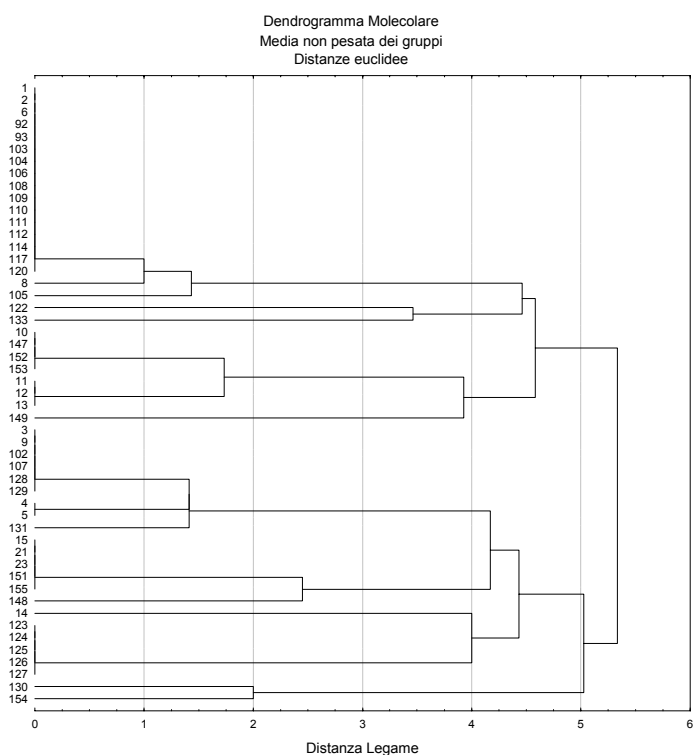
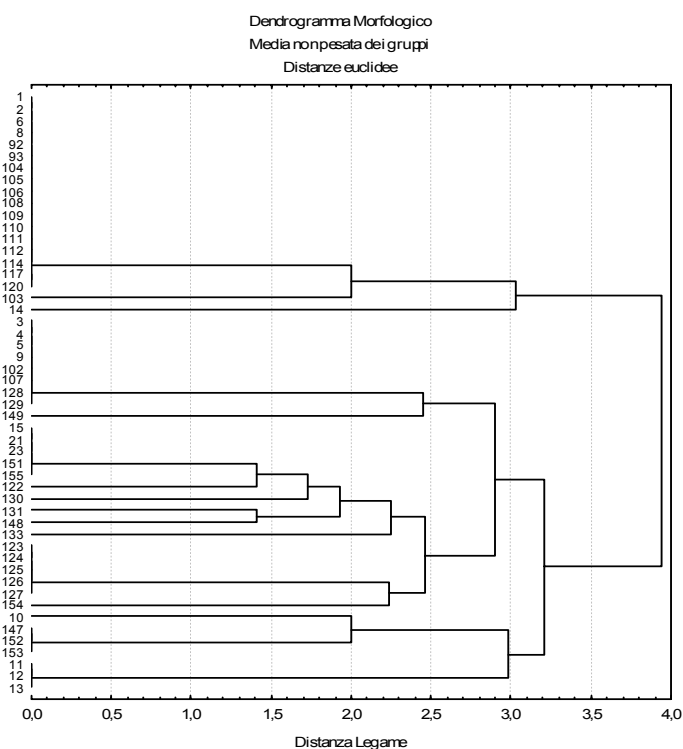


Fig 12.,a) Dendrogramma relativo alla cluster analysis (UPGMA) mediante distanza euclidea dei caratteri morfologici scelti di 51 accessioni di *Olea europaea* L; b) Dendrogramma dell'analisi molecolare (SSR) di 51 accessioni, mediante UPGMA e distanza euclidea.

Il dendrogramma derivato dalla cluster analysis, con caratteri molecolari (Fig.12 b.), presenta i seguenti gruppi:

Cluster I, diviso in insieme A1 e B1:

L'**insieme A1** è costituito da un gruppo di accessioni 1, 2, 6, 92, 93, 104, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 117, 120 a distanza di legame 0, pressoché identico al dendrogramma descritto precedentemente, ad eccezione delle accessioni 8 e 105, che si trovano nello stesso insieme ma isolate, in aggiunta ad altre due accessioni isolate: 122 e 123.

L'**insieme B1** presenta due gruppi di piante (10, 147, 152, 153) e (11, 12, 13) e l'accessione 149 distante.

Cluster II diviso in insieme A2 e B2:

L'**insieme A2** è formato da 4 gruppi (3, 9, 102, 107, 128, 129), (4, 5), (15, 21, 23, 151, 155) e, (123, 124, 125, 126, 127) e da due accessioni isolate: 131, 148, 14.

L'**insieme B2** è costituito da due accessioni isolate 130 e 15.

Per meglio comprendere la capacità discriminante delle variabili morfologiche, i dati sono stati analizzati mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA) (Hotelling, 1933).

Dai dati relativi alle 17 variabili scelte, sono risultati 14 autovettori, ottenuti dall'analisi della matrice di varianze e covarianze. Tre delle 17 variabili (Apice endocarpo, Umbone e Posizione diametro massimo endocarpo) non sono state considerate nell'analisi perché a varianza nulla.

Queste variabili sono state comunque considerate variabili importanti e discriminanti in una popolazione più ampia.

Nella tabella 20 e nella figura 13 sono riportati gli autovettori ed il loro relativo "peso"; è possibile notare come la Componente Principale 1 (CP1) spieghi il 51,80% della variabilità e come la Componente Principale 2 (CP2) spieghi il 19,47% della variabilità.

Nella tabella 21 e nella figura 14 viene riportata la matrice di correlazione: la prima componente principale è legata alla Posizione del diametro massimo del Frutto, all'Apice del Frutto, all'Apice dell'Endocarpo, alla Base del Frutto e al Numero e alla Dimensione delle Lenticelle (segno positivo), mentre è legata negativamente a Simmetria Frutto, Dimensione lenticelle, Superficie Endocarpo e Rapporto Polpa/Endocarpo (con segno negativo).

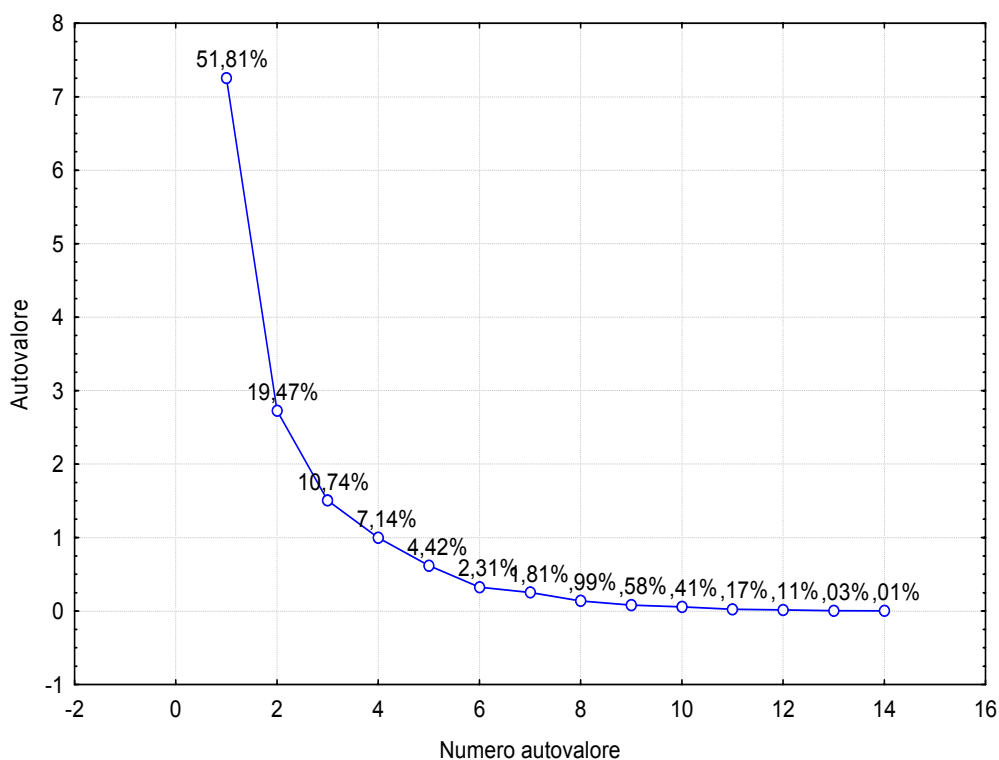
La seconda componente principale, ha un coefficiente positivo ed alto per la variabile Base endocarpo, mentre ha coefficienti alti e negativi per il rapporto L/l endocarpo e L/l Frutto. In questo caso la CP2 contrappone a variabili qualitative, variabili quantitative.

Tab 20 Autovalori matrice correlazioni e statistiche relazionate

Sole variabili attive

	Autovalore	% Totale	Cumulo	Cumulo
1	7,252891	51,80636	7,25289	51,8064
2	2,726348	19,47391	9,97924	71,2803
3	1,504237	10,74455	11,48348	82,0248
4	0,999423	7,13874	12,48290	89,1636
5	0,618655	4,41897	13,10155	93,5825
6	0,323657	2,31184	13,42521	95,8944
7	0,253273	1,80910	13,67848	97,7035
8	0,138198	0,98713	13,81668	98,6906
9	0,080847	0,57748	13,89753	99,2681
10	0,057130	0,40807	13,95466	99,6761
11	0,024106	0,17219	13,97877	99,8483
12	0,015123	0,10802	13,99389	99,9564
13	0,004193	0,02995	13,99808	99,9863
14	0,001918	0,01370	14,00000	100,0000

Fig 13 Autovalori matrice correlazioni variabili attive



Tab. 21 Coordinate fattoriali variabili, basate su correlazioni

	Fatt. 1	Fatt. 2	Fatt. 3	Fatt. 4	Fatt. 5	Fatt. 6	Fatt. 7	Fatt. 8	Fatt. 9	Fatt.10	Fatt.11	Fatt.12	Fatt.13	Fatt.14
Simmetria F	-0,953243	-0,110212	0,074649	-0,204422	0,006183	-0,061690	-0,077736	-0,055121	0,112462	0,062572	-0,006988	-0,037793	-0,000087	-0,029233
Pos Dia Max F	0,929797	-0,084959	-0,250621	0,130913	0,134623	0,067623	-0,101146	-0,037966	-0,061065	0,008285	-0,094063	-0,011593	-0,032783	-0,009334
Apice F	0,907706	0,128107	0,042363	0,343710	-0,107886	0,091805	0,070928	0,088271	0,046089	-0,030527	-0,038903	0,025121	0,035721	-0,019010
Base F	0,711684	-0,173437	0,323136	0,451536	0,207546	-0,231544	0,219528	-0,031343	0,026616	0,086040	0,023461	-0,023013	-0,008344	0,000697
N Lenticelle	0,725937	-0,095732	0,208303	-0,296508	0,516746	-0,154625	-0,198320	0,011914	-0,017852	-0,019830	0,016408	0,030082	0,015369	-0,003713
Dim Lenticelle	-0,869834	-0,115056	0,062067	0,359450	-0,091769	-0,209134	-0,161364	0,081815	0,083178	0,006836	-0,029377	0,064334	-0,014522	0,004960
Invaiaitura	0,298185	0,285044	-0,854935	0,003387	-0,033585	-0,262846	0,044567	-0,147807	0,046759	-0,050571	0,005661	0,003958	0,008352	-0,000055
L/I Endo	-0,111035	-0,659377	-0,658478	0,138875	0,215369	0,144622	0,021024	0,166692	0,027587	0,012494	0,058886	0,000860	-0,008333	-0,005587
Simmetria E	0,376402	-0,793395	0,147909	0,339363	-0,105541	0,069771	-0,223586	-0,129625	0,050857	-0,066756	0,020880	-0,037189	0,009318	0,007270
Apice E	0,895856	0,307886	0,215952	-0,081795	-0,116363	0,115637	0,018502	-0,077388	0,080442	-0,047418	0,066749	0,043240	-0,030242	-0,010993
Base E	0,532934	0,782718	-0,146038	0,036749	0,096387	0,146811	-0,142631	0,030656	0,135644	0,097089	-0,003097	-0,020782	0,004809	0,015471
Superficie E	-0,855713	0,141002	0,129588	0,074728	0,395402	0,121873	0,163619	-0,037785	0,100469	-0,120201	-0,038325	-0,006792	-0,004270	0,005233
Polpa/E	-0,831095	0,238450	-0,092887	0,360383	0,176431	0,180513	-0,038029	-0,183518	-0,089275	0,070033	0,022009	0,039952	0,009871	-0,005275
L/I Frutto	0,336476	-0,841667	-0,051311	-0,351266	-0,037133	0,091415	0,130712	-0,098173	0,077020	0,078575	-0,040743	0,044863	0,006778	0,008731

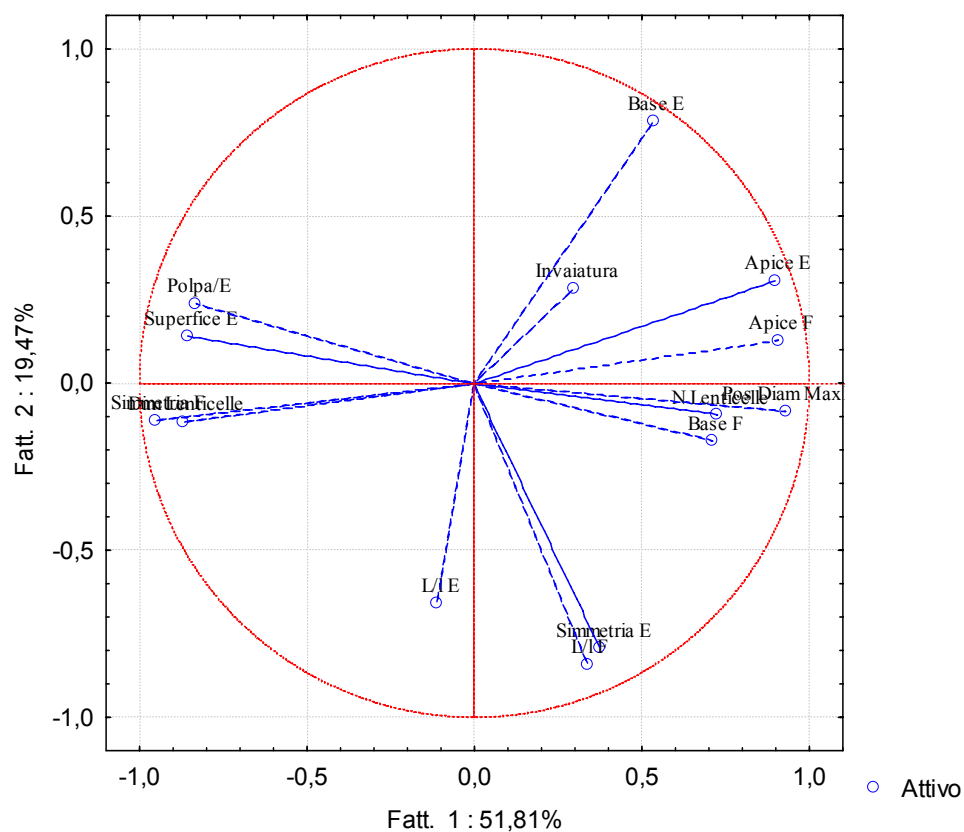


Fig 14 Proiezione delle variabili sul piano fattoriale 1x2

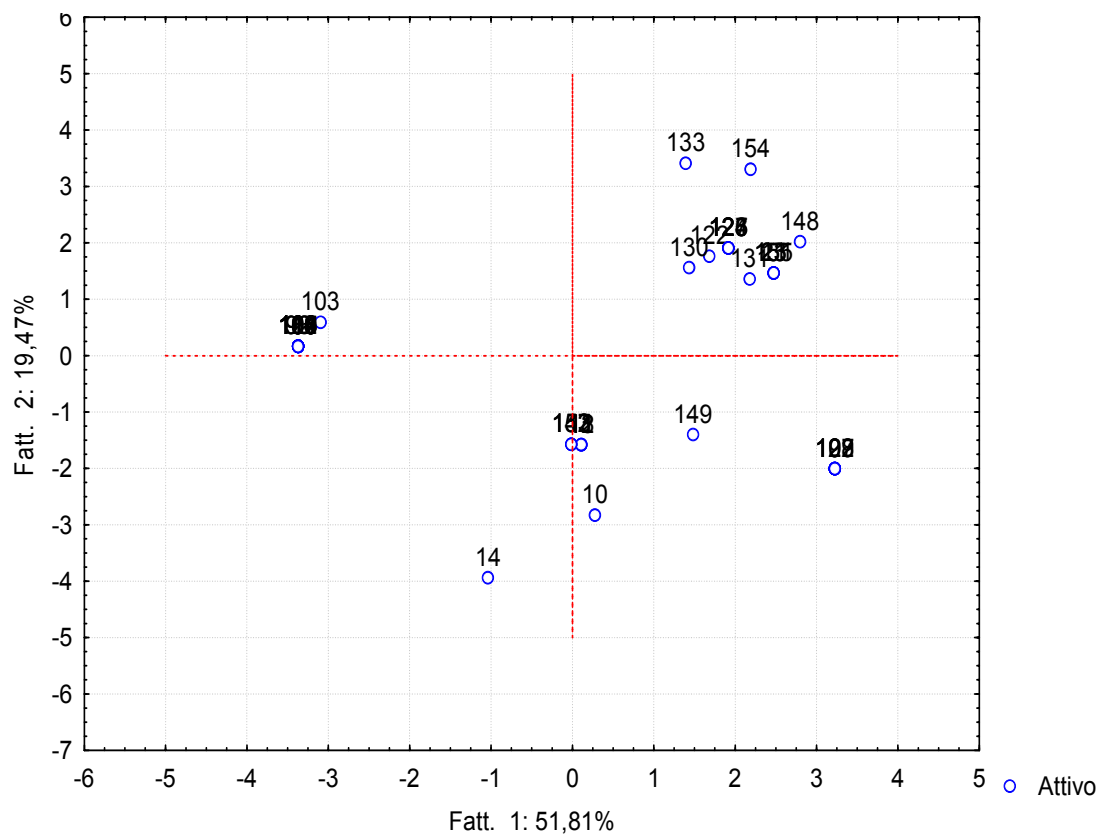


Fig 15 Proiezione dei casi sul piano fattoriale (1x2) Casi con somma quadrati coseni $\geq 0,00$

In figura 15 viene riportata la capacità discriminante data dall'uso dei soli due autovettori più importanti (1 e 2); già con l'uso di questi autovalori si riescono a discriminare gli individui della popolazione, questo evidenzia il potere del modello nella popolazione in studio.

Al fine di giustificare la scelta delle variabili, i dati relativi ai 22 caratteri morfologici sono stati anch'essi posti all'analisi dei componenti principali (PCA). Anche in questo caso sono state escluse le tre variabili a varianza nulla.

In tabella 22 e figura 16.a sono riportati i 22 autovettori e il loro relativo peso in termini di varianza e correlazione.

In tabella 23 e in figura 17 è riportata la matrice di correlazione e le proiezioni delle variabili su un piano orizzontale in base alle componenti principali 1 e 2.

Tali componenti spiegano da sole il 60% della variabilità (39,98% la prima e 18,15% la seconda).

La prima componente principale è correlata positivamente a Posizione del diametro massimo del Frutto, Base del Frutto, Numero delle Lenticelle, Apice Endocarpo Apice Frutto, mentre è correlata negativamente a Peso del Frutto, Simmetria del Frutto, Dimensione delle lenticelle, Superficie endocarpo, e Rapporto Polpa/Endocarpo.

La seconda componente, invece è correlata positivamente a L/l Endocarpo e L/l Frutto, Simmetria Endocarpo, Forma Foglia, mentre è correlata negativamente ad Apice Frutto e Larghezza della foglia.

In Fig 17 è riportata la proiezione dei casi sul piano fattoriale, in questo caso la capacità discriminante delle due componenti principali non è sufficiente e non si riescono a distinguere i genotipi.

Tab 22 Autovalori matrice correlazioni e statistiche relazionate (morfologia PMA Totale)

Sole variabili attive

	Autovalore	% Totale	Cumulo	Cumulo
1	8,795933	39,98151	8,79593	39,9815
2	3,993552	18,15251	12,78949	58,1340
3	2,441536	11,09789	15,23102	69,2319
4	1,473930	6,69968	16,70495	75,9316
5	1,298513	5,90233	18,00346	81,8339
6	1,231767	5,59894	19,23523	87,4329
7	0,750118	3,40963	19,98535	90,8425
8	0,455328	2,06967	20,44068	92,9122
9	0,359420	1,63373	20,80010	94,5459
10	0,292234	1,32834	21,09233	95,8742
11	0,269266	1,22394	21,36160	97,0982
12	0,178776	0,81262	21,54037	97,9108
13	0,153175	0,69625	21,69355	98,6070
14	0,123018	0,55917	21,81657	99,1662
15	0,078925	0,35875	21,89549	99,5250
16	0,034805	0,15820	21,93030	99,6832
17	0,028156	0,12798	21,95845	99,8111
18	0,023587	0,10722	21,98204	99,9184
19	0,010580	0,04809	21,99262	99,9664
20	0,005704	0,02593	21,99832	99,9924
21	0,001096	0,00498	21,99942	99,9974
22	0,000581	0,00264	22,00000	100,0000

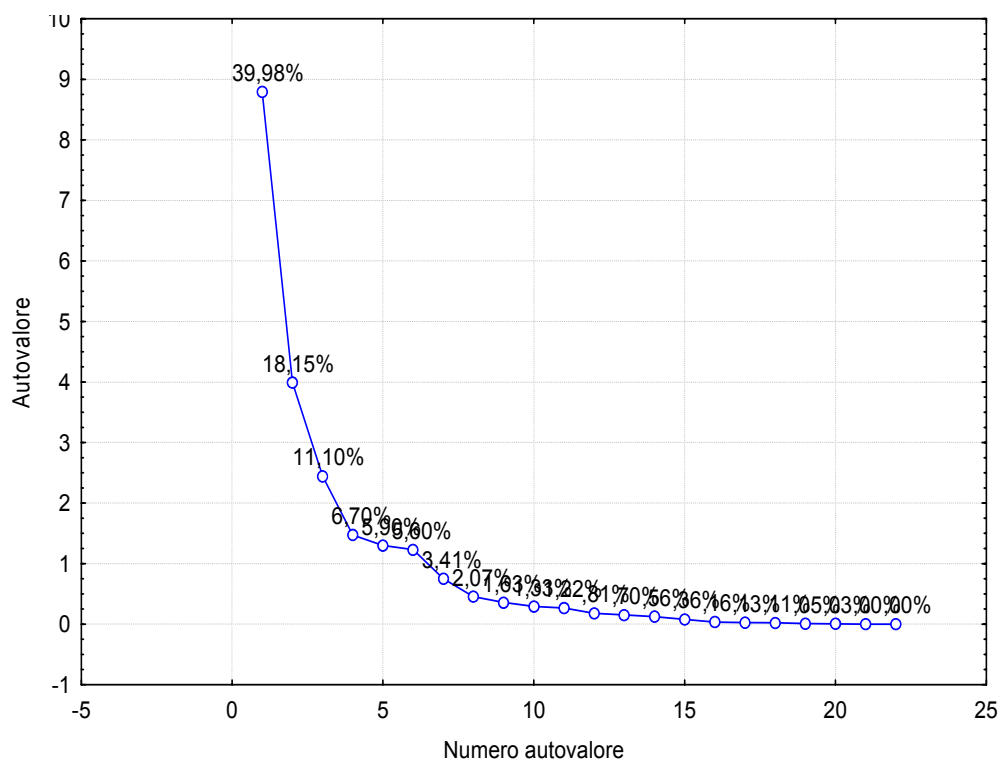


Fig 16 Autovalori matrice correlazioni sole variabili attive

Tab. 23 Coord. fattoriali variabili, basate su correlazioni (sono indicate solo le prime 17 coordinate fattoriali) (morfologia PMA Totale)

	Fatt. 1	Fatt. 2	Fatt. 3	Fatt. 4	Fatt. 5	Fatt. 6	Fatt. 7	Fatt. 8	Fatt. 9	Fatt. 10	Fatt. 11	Fatt. 12	Fatt. 13	Fatt. 14	Fatt. 15	Fatt. 16	Fatt. 17
Lunghezza	-0,2709	0,1779	-0,1125	0,3140	0,7047	-0,3904	0,2662	-0,1324	0,1291	-0,0094	-0,2149	0,0526	0,0443	-0,0809	0,0148	0,0107	-0,0094
Larghezza	0,0611	-0,7868	0,4263	0,0789	0,0202	-0,0899	0,2105	0,1695	-0,1977	0,0076	0,0800	0,0986	0,2132	-0,0511	-0,0187	0,0561	0,0203
Forma Foglia	-0,4582	0,6134	0,0041	-0,3483	0,0612	-0,0953	0,2728	-0,1316	-0,2315	0,3519	0,0515	0,0529	-0,0619	-0,0044	-0,0257	-0,0053	0,0022
Apice Foglia	0,0303	-0,7378	0,4635	-0,2779	0,0695	-0,1585	-0,1832	0,0468	0,1331	0,1313	0,0206	-0,0851	-0,1185	-0,1972	-0,0009	-0,0125	-0,0131
Base Foglia	0,2929	-0,3494	0,3054	-0,2065	-0,1650	-0,6941	-0,2506	-0,2176	-0,0155	0,0279	-0,0695	0,0051	0,0508	0,1622	0,0428	-0,0102	0,0100
Peso Frutto	-0,9341	-0,2172	0,1106	-0,0339	0,0551	-0,0734	-0,0364	0,0505	-0,0945	-0,0193	0,0509	0,0146	-0,1096	0,0262	0,1150	0,0894	-0,0680
L/I Frutto	0,2887	0,7128	0,5265	-0,1408	0,0635	0,0588	-0,1556	0,1700	-0,0899	-0,0892	-0,0840	0,1203	0,0427	-0,0179	0,0226	-0,0546	-0,0760
Simmetria F	-0,9586	0,0092	0,1620	-0,0562	0,0317	0,1533	-0,0140	0,0301	0,0362	0,0595	-0,0151	-0,0161	0,1121	0,0392	0,030483	-0,0445	-0,0425
Pos Dia Max F	0,9111	0,2986	-0,2494	0,0166	0,0178	-0,0372	-0,0076	-0,0224	-0,0855	0,0086	-0,0042	-0,0420	0,0063	-0,0242	-0,0188	0,0088	-0,0065
Apice F	0,9203	-0,1049	-0,0876	0,1529	-0,1146	-0,2523	0,1041	0,0175	-0,1045	-0,0161	0,0393	-0,0265	-0,0306	-0,0378	-0,0433	-0,0187	-0,0102
Base F	0,6893	0,1015	0,1161	0,5916	0,0492	-0,2225	-0,0326	-0,0707	0,0080	0,0093	0,2681	0,0972	-0,0771	0,0102	-0,0289	-0,0117	-0,0538
N Lenticelle	0,7083	0,1620	0,0799	0,1639	0,2337	0,4264	-0,2945	-0,2398	0,0663	0,1608	0,0818	-0,0419	0,1049	0,0045	0,0615	0,0600	-0,0026
Dim Lenticelle	-0,8582	0,014	-0,0013	0,2121	-0,2445	-0,1700	0,1599	0,0130	0,2105	0,0881	0,1402	-0,1223	0,1106	-0,0090	-0,0120	-0,0392	-0,0325
Invaiaura	0,2700	0,1407	-0,6667	-0,4755	0,2733	-0,2190	0,0655	0,1416	0,0923	-0,0747	0,2408	0,0391	0,043	-0,0038	0,114868	-0,0164	0,0153
Peso Endo	-0,4869	0,2102	0,4316	0,0757	0,6285	-0,0578	-0,1485	0,1462	-0,1334	-0,0499	0,1245	-0,1848	-0,0276	0,0916	-0,0602	-0,0179	0,0393
N solchi	-0,4064	-0,1002	-0,5588	0,4192	-0,0335	-0,1335	-0,3691	0,3353	-0,0285	0,2280	-0,0863	0,0862	-0,0160	0,0192	0,0083	-0,0055	0,0233
L/I Endo	-0,1524	0,8001	-0,1612	-0,1995	-0,1648	-0,3101	-0,3112	0,0078	-0,0675	-0,0754	0,0151	-0,0713	0,0925	-0,1373	-0,0575	0,0564	-0,0051
Simmetria E	0,3460	0,6663	0,3454	0,3496	-0,2850	-0,1298	0,1795	0,1078	-0,0348	0,0576	-0,0482	-0,1500	0,0195	-0,0340	0,1428	0,0005	0,0301
Apice E	0,9094	-0,3239	0,0619	0,0158	0,1175	0,0726	0,0665	0,0649	-0,1201	-0,0056	-0,0645	-0,0536	-0,0567	-0,0217	0,0949	-0,0313	0,0094
Base E	0,5561	-0,5418	-0,5372	-0,0836	0,1418	0,0485	-0,0187	-0,0107	-0,1649	0,0828	-0,0655	-0,1509	0,0965	0,0103	-0,0131	-0,0323	-0,0747
Superficie E	-0,8489	-0,1839	-0,0745	0,1878	-0,0198	0,0732	-0,2054	-0,2611	-0,2060	-0,0765	0,0792	0,0720	0,0309	-0,1203	0,0663	-0,0784	0,0399
Polpa/E	-0,8256	-0,1319	-0,3837	0,2144	-0,1175	-0,0492	0,0608	-0,0909	-0,1724	-0,1499	-0,0298	-0,1050	-0,058	0,00001	0,0046	0,0242	-0,0231

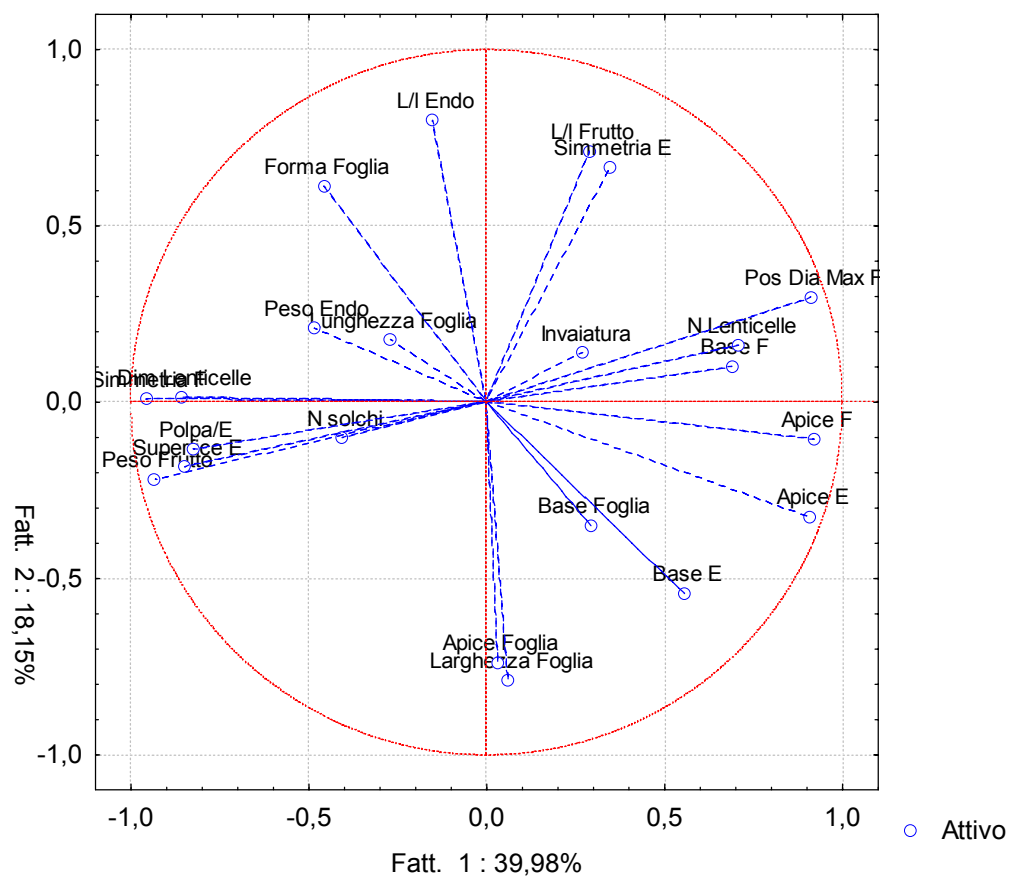


Fig 17 Proiezione delle variabili sul piano 1x2

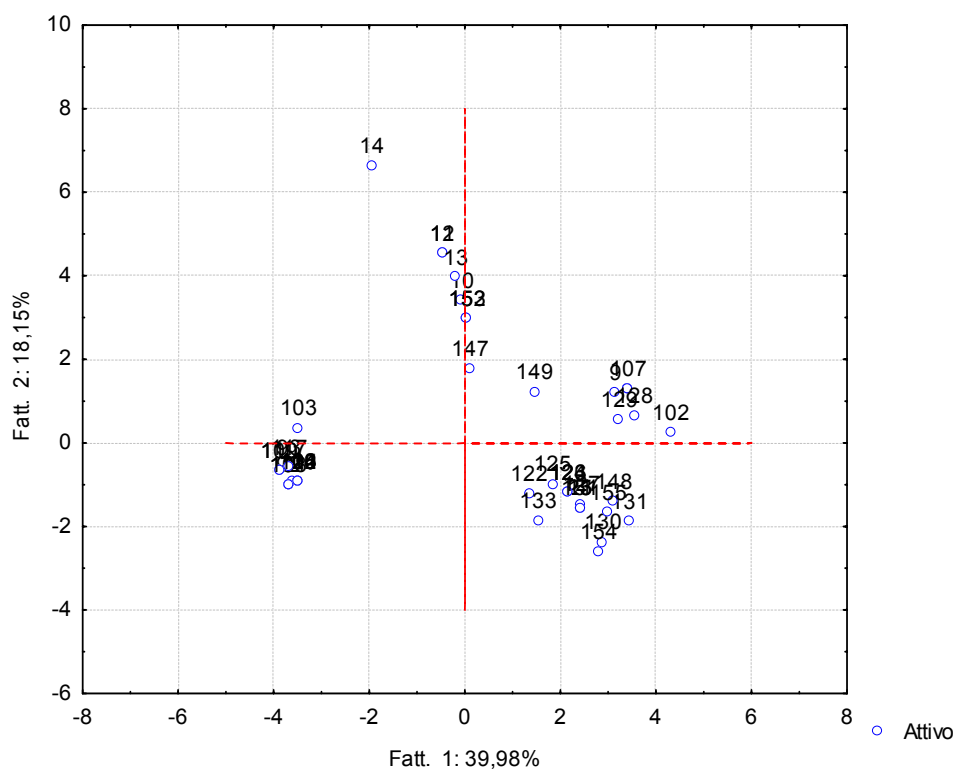


Fig. 18 Proiezione dei casi sul piano fattoriale (1x2) Casi con somma quadrati coseni $\geq 0,00$

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La caratterizzazione morfologica e molecolare dell'olivo è una necessità irrinunciabile se si vuole salvaguardare il ricco patrimonio genetico che nei millenni questa specie ha saputo esprimere.

Patrimonio particolarmente a rischio in zone come l'Emilia dove la coltivazione di questa specie è praticamente scomparsa.

Oggi esistono le condizioni per un rilancio della coltura, ed a questo scopo è fondamentale poter disporre di adeguate conoscenze del germoplasma che è sopravvissuto, presumibilmente adatto alle condizioni dell'Emilia.

In questo senso il presente lavoro è il risultato di un'attività di ricerca di genotipi autoctoni interessanti dal punto di vista genetico (salvaguardia delle biodiversità).

Seguendo le impostazioni del C.O.I. (Barranco et al., 2000a) sono state elaborate delle schede elaiografiche per la catalogazione delle accessioni in studio.

Lo studio dei caratteri morfologici delle accessioni emiliane ha portato all'acquisizione di un considerevole numero di dati, i quali si sono rivelati utili descrittori del materiale in esame. Le schede elaiografiche ambiscono a descrivere gli aspetti fenotipici degli alberi analizzati, così da ottenere una sorta di "carta d'identità".

L'analisi molecolare ha avuto lo scopo di mettere a confronto le diverse accessioni evitando che l'analisi del fenotipo venisse influenzata dall'ambiente. La tecnica del "fingerprinting" consente, quindi, di monitorare la variabilità genetica presente a livello del DNA attraverso l'utilizzo di uno o più marcatori che caratterizzano il genoma e distinguono genotipi diversi anche se molto simili.

Nel presente studio, i marcatori SSR sono stati utilizzati proprio per valutare la variabilità genetica di antiche accessioni, sopravvissute fino ai giorni nostri nelle colline emiliane, e valutare relazioni intercorrenti con varietà nazionali e di altri paesi europei.

L'analisi molecolare con microsatelliti si è rivelata un metodo altamente discriminante, infatti tutti i primer utilizzati hanno mostrato un buon grado di polimorfismo (Tab 17 a e b).

Un elevato numero di alleli ed un elevato polimorfismo sono generalmente attesi per marcatori come gli SSR, costituiti da sequenze genomiche non codificanti e a livello dei quali la pressione

selettiva non agisce (Testolin et al., 2000). I valori riportati in questo studio per parametri quali il numero degli alleli e l'eterozigosità sono risultati elevati, non solo come atteso nella popolazione totale di 284 individui (popolazione eterogenea in quanto costituita da più individui provenienti da diverse aree italiane ed europee), ma anche nella popolazione emiliano-romagnola, rilevando un' elevata variabilità genetica (Tab17 a e b).

Per valutare la bontà delle analisi si è deciso, in fase di pianificazione dello studio, di impostare dei controlli:

- il primo controllo ha previsto il prelievo dalla stessa pianta di due campioni di foglie, Fiorano Modenese (a) (61), Fiorano Modenese (b) (62), al fine di fissare il grado di affidabilità del metodo.
- il secondo controllo ha previsto l'inserimento in ogni analisi di standard interni (Carolea, Cassanese, Coratina, Frantoio, Leccino), cultivar geneticamente distanti tra di loro e scelte in accordo con altri gruppi di ricerca, al fine di permettere un controllo interno di ogni analisi e un confronto delle metodiche con altri laboratori.
- il terzo controllo, infine, ha previsto l'inserimento di cultivar nazionali provenienti da più campi collezione (per esempio il materiale della cultivar Moraiole è stato prelevato da quattro campi collezione diversi) al fine di avere nell'analisi cultivar di confronto più affidabile per distinguere eventuali cloni intra-varietali.

I controlli interni (61 e 62) inseriti nell'analisi sono risultati geneticamente identici, confermando una corretta interpretazione dei dati, mentre le cultivar utilizzate come standard interni sono risultate geneticamente distinte, come atteso (Allegato1).

Per quanto riguarda, invece, le cultivar nazionali prese come parametri di confronto, alcune hanno confermato l'identità genetica, come per esempio le cultivar Nostrana di Brisighella rispettivamente fornite dal CNR-IBIMET di Bologna e dal campo collezione di Salsomaggiore (Università di Parma) o le cultivar Leccino fornite dal campo collezione di Cosenza e dal campo collezione di Salsomaggiore, in molti altri casi, invece, non si è confermata la corrispondenza genetica, per esempio le "cultivar Rossina" fornite dal CNR-IBIMET di Bologna e dal campo collezione di Rende (CS).

Grazie agli 11 primer utilizzati è stato possibile isolare, tra le 221 accessioni locali e le 63 cultivar nazionali e internazionali, 114 diversi genotipi di cui 84 sono rappresentati da singole piante (7 cultivar internazionali, 37 cultivar nazionali e 40 accessioni locali) mentre fra i rimanenti 30 genotipi, rappresentati da raggruppamenti di accessioni locali e nazionali a indice di similarità pari a 1, sono emersi 6 casi di sinonimia con cultivar nazionali inserite nell'analisi

(Frantoio-Correggiolo, Leccino, Grappuda, Nostrana di Brisighella, Ascolana Tenera- Oliva Grossa, Santa Caterina e Maurino).

Inoltre molte accessioni antiche sono risultate a un livello di similarità genetica elevato (0,97), con cultivar nazionali poste nell'analisi, Leccio del Corno, Ghiacciolo e Moraiolo.

Dalla rappresentazione grafica (Allegato 1) si possono evidenziare più gruppi costituiti da individui che si trovano a un livello di similarità elevata; ognuno di essi merita di essere accuratamente descritto.

Nel sottoinsieme B2.b.1,2, è presente un ampio gruppo costituito da individui a identità genetica con la cultivar Frantoio, altri individui presentano un livello di similarità genetica compresa tra 0,90 e 1 con la cultivar stessa.

Dal sizing allelico (Tab 18) si possono osservare che le differenze genetiche che sussistono tra questi ultimi individui sono imputabili alla differenza di uno o due alleli appartenenti a loci differenti (DCA9, UDO24, UDO 43 e GAPU 59). Inoltre, in molti casi, principalmente ai loci UDO 24, UDO43, e DCA9, la differenza genetica tra questi individui è determinata da alleli con medesima forma (a “multi picco”, come nel caso del locus DCA9, o a picco singolo, come nel caso del locus UDO 24) e che differiscono tra loro per poche bp (Fig.19). Questa particolarità è stata considerata caratteristica di una popolazione di cloni, ricordando che si definisce popolazione di cloni “un insieme di individui geneticamente uniformi (che può essere chimerico in natura), derivato in origine da un singolo individuo per propagazione asessuata, cioè per talea, divisione, innesto, o per apomissia obbligatoria” (Roselli et al. 1974).

Per rafforzare queste considerazioni è stato effettuato un confronto morfologico tra la cultivar Frantoio descritta da Barranco et al. (2000a) e l'accessione locale 138 (l'accessione che si trova a un livello di similarità più distante), i due individui risultano simili (Fig. 20).

Un'ultima osservazione da sottolineare è il fatto che il livello di similarità tra le accessioni in esame è stato ottenuto attraverso una matrice di similarità genetica utilizzando l'indice Dice (Dice 1945). Questo indice è tra i più utilizzati per l'analisi di marcatori molecolari quali gli SSR, (Kosman et al.,2005); esso prevede l'assegnazione di valore 0 in caso di assenza di un allele e di valore 1 in caso di sua presenza. Questa caratteristica ha lo svantaggio di non tener conto dell'effettiva distanza tra alleli e quindi di non rivelare possibili informazioni che potrebbero essere importanti per la caratterizzazione intravarietale.

Si riporta in figura 21 la rappresentazione di una cluster analysis e distanza euclidea, la quale invece tiene conto delle effettive distanze tra gli alleli. Si può osservare che, grazie a tale metodo, gli individui che presentano alleli con differenze di poche paia basi si collocano tra loro ad una distanza di legame molto bassa.

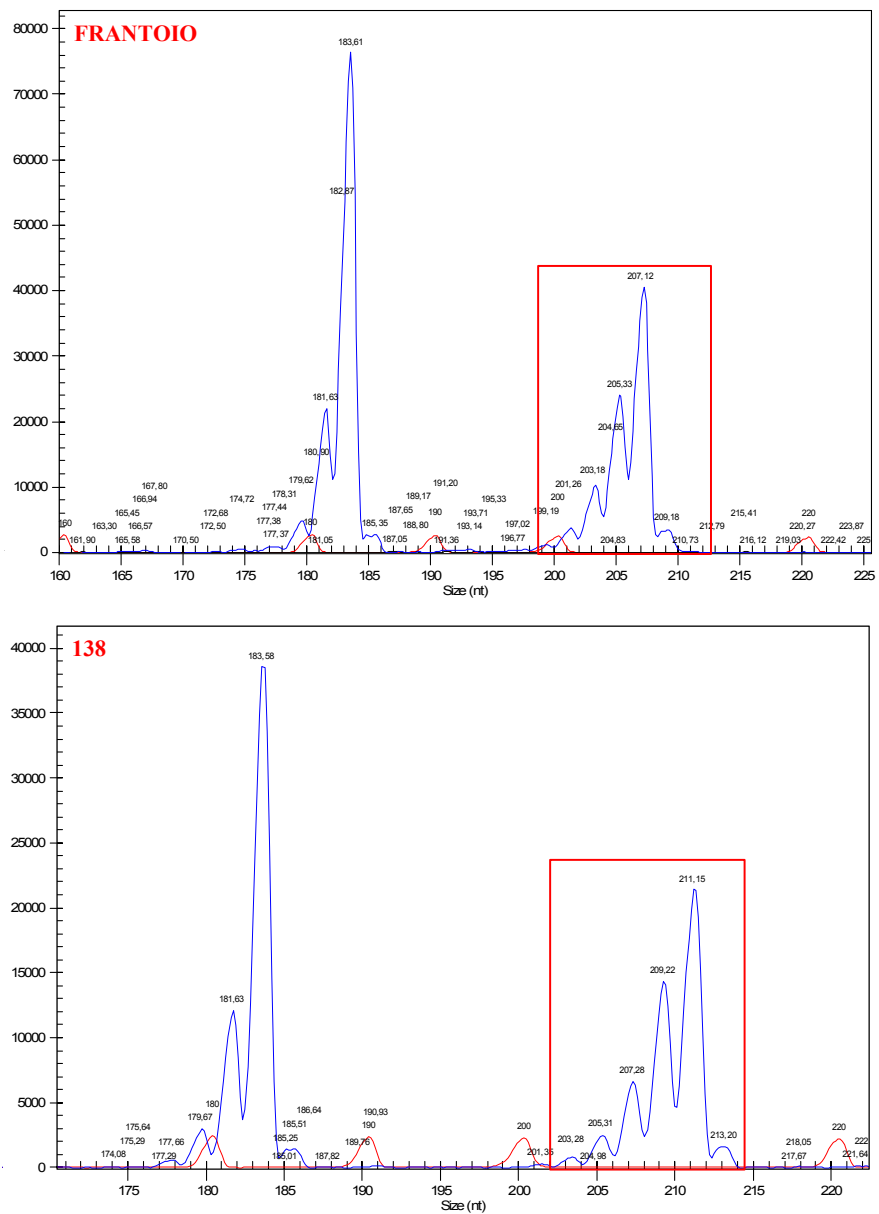


Fig. 19 – Ferogrammi della cultivar Frantoio e dell'accessione 138 che presentano l'allele con forma caratteristica e che distano di poche bp nel locus DCA9.

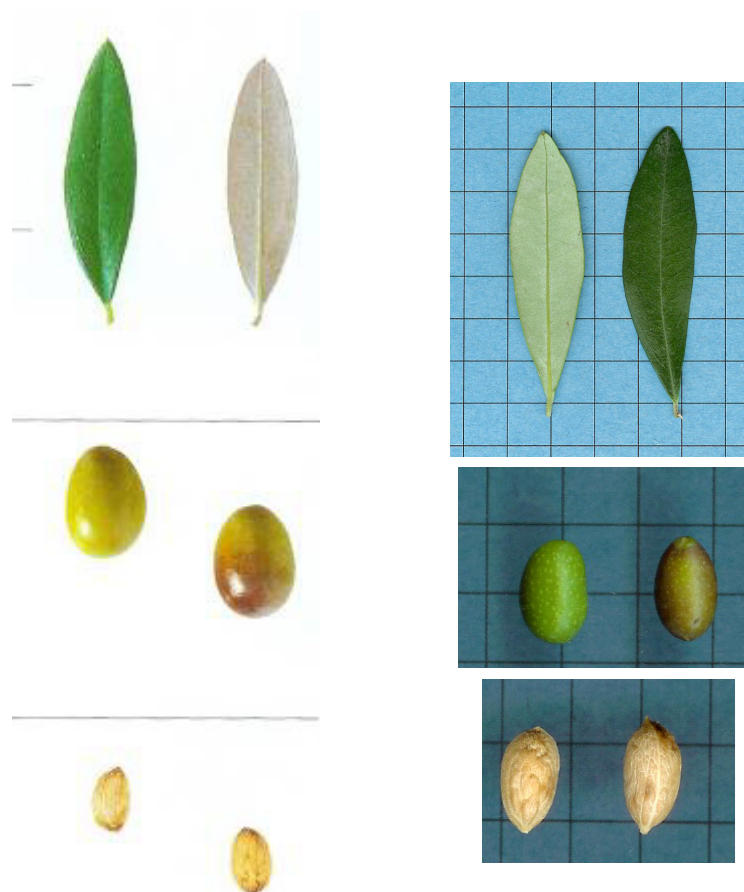


Fig. 20 – Confronto tra la cultivar Frantoio (sinistra) (Barranco et al., 2000a) e le accessione 138 (destra).

All'interno dello stesso cluster del Frantoio, si nota una certa “prossimità genetica” tra le cultivar Taggiasca, Razzola, Ottobrino e la cultivar Frantoio stessa, confermando, per le prime due, la loro vicinanza genetica con cultivar Frantoio già evidenziata in bibliografia (Fontanazza 1993, Baldoni, et al., 2003). Resta da chiarire la posizione dell'Ottobrino nel suddetto gruppo. E' da ricordare che la cultivar Ottobrino è coltivata in Liguria e, almeno da informazioni bibliografiche (database FAO), non dovrebbe essere sinonimo del Frantoio. Da questa considerazione si può ipotizzare che la cultivar reperita sia presumibilmente riferibile a un caso di confusione varietale.

Dall'analisi molecolare sono emerse, inoltre, incongruenze relative all'identità genetica delle cultivar Frantoio e Correggiolo, più precisamente le cultivar Frantoio CS, Frantoio VV BO, Correggiolo VV BO e Correggiolo MG BO, certificate dalla regione Emilia Romagna come cultivar distinte, sono risultate geneticamente uguali come affermato anche dal database del germoplasma olivicolo della FAO (Bartolini et al., 1998).

Un secondo gruppo, è invece costituito da accessioni che presentano sinonimia con la cultivar Leccino; anche in questo caso sono state identificate quali possibili cloni, anche cinque accessioni che differiscono nei loci DCA9 e GAPU 103 per un unico allele (Tab.18). Nel gruppo Leccino, si è presentato, inoltre, un caso di confusione varietale: la cultivar Gremignolo è risultata ad una similarità pari ad 1 con la cultivar Leccino, indicando un possibile errore di etichettatura della pianta nel campo collezione.

Altri casi di vicinanza genetica si possono osservare tra l'accessione 49 e la cultivar Leccio del Corno, e tra l'accessione AY e la cultivar Ghiacciolo. La differenza genetica tra i due individui, è dovuta, in entrambi i casi, alla presenza in un unico locus di tre alleli, rispettivamente al locus DCA9 dell'accessione 49 e al locus GAPU 101 della cultivar Ghiacciolo. Tale fenomeno si è verificato anche in altri individui e tra questi le piante appartenenti al gruppo della cultivar Maurino.

Per escludere eventuali cause quali inquinamento o degradazione del DNA in fase di studio, si è nuovamente estratto il DNA di tali individui, e sono state ripetute le analisi molecolari; si è tuttavia ottenuto il medesimo risultato. L'amplificazione anomala di più di due alleli a livello di un singolo locus, potrebbe essere dovuta a una poliploidia delle piante stesse, fenomeno piuttosto diffuso in una specie allogama quale l'olivo, o a una mutazione o duplicazione del locus stesso.

Nel gruppo Nostrana di Brisighella si può altresì notare la vicinanza genetica di individui non ancora identificati; tali individui (possibili cloni) si differenziano da questa cultivar per uno o due alleli nei loci DCA4 e/o DCA9.

Caso interessante riguarda la cultivar Moraiolo: le quattro piante inserite nello studio (Moraiolo PG, Moraiolo FI, Moraiolo CS e Moraiolo 83) fanno tutte parte del medesimo raggruppamento ma sono risultate geneticamente distinte; questo è spiegabile col fatto che le piante inserite nell'analisi si trovano in quattro campi collezione diversi e potrebbero far parte di una popolazione molto ampia di cloni. Allo stesso raggruppamento fanno parte cultivar quali Corniolo, Tondello, Arancino, Carboncella Pescia, Carboncella Cella, tutte note in bibliografia per essere sinonimi della cultivar Moraiolo (Cimato et al., 2004; Baldini, 1956); esse si sono

tuttavia distinte geneticamente in più loci. Questo può significare che non si è di fronte a casi di sinonimia, ma piuttosto ad una popolazione di cloni.

Inaspettatamente, all'interno del medesimo gruppo si può osservare la cultivar ligure Pignola; confrontando gli alleli di 4 loci con gli alleli della cultivar Pignola riportati nel sito della FAO (www.oleadb.eu), si è potuto osservare che non sono affatto confrontabili, dimostrando che anche in questo caso si è di fronte ad un caso di confusione varietale.

Nel “gruppo Grappuda”, costituito da accessioni a similarità genetica 1 e da altri individui che presentano una differenza genetica imputabile ad un solo allele nei loci UDO43, DCA18, DCA4, si è osservato un caso di confusione varietale per la cultivar Arnasca.

Infine, interessanti sono le osservazioni a riguardo del “gruppo Santa Caterina” al quale appartengono alcuni individui geneticamente distinti, come la “cultivar Santa Caterina” proveniente da vivaio, che nell'impostazione iniziale del lavoro è stata presa come unico individuo di confronto. Dall'analisi molecolare la cultivar Santa Caterina, reperita in vivaio, è risultata differente da un gruppo di piante che presentavano morfologia simile alla cultivar toscana Santa Caterina (Fig. 22); a tal proposito si è presentato il problema della certificazione varietale: “La cultivar Santa Caterina considerata in analisi era realmente una Santa Caterina? O la Cultivar Santa Caterina apparteneva a una popolazione molto eterogenea di cloni?”

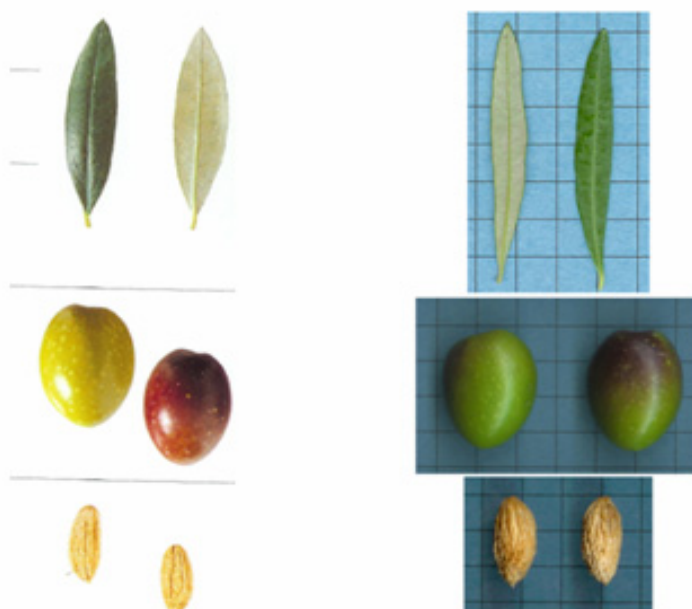


Fig. 22 – Confronto tra la cultivar Santa Caterina (sinistra) (Barranco et al., 2000a) e le accessioni del gruppo 1 (destra).

Per questo motivo si è inserita nell'analisi la cultivar Santa Caterina proveniente dal campo collezione mondiale di Rende (CS). Grazie a questo confronto, le accessioni con morfologia simile alla cultivar Santa Caterina sono state identificate come sinonimie della Cultivar Santa Caterina di Cosenza e la pianta fornita da vivaio come possibile clone appartenente ad una popolazione molto ampia. La cultivar Santa Caterina da vivaio si presenta ad un livello di similarità genetica di 0,79, tuttavia nel dendrogramma con cluster analysis a distanza euclidea, tale gruppo risulta geneticamente più omogeneo (Fig.21).

In questo caso si può constatare come la problematica della certificazione varietale in olivo è ancora lontana dall'essere risolta, infatti molti problemi di rispondenza genetica sussistono “in vivaio” e questo porta a presupporre che in un dato territorio la certezza sulla varietà è un dato aleatorio e dipendente esclusivamente dal vivaista.

Dall'analisi molecolare sono emerse, inoltre, incongruenze relative all'identità genetica delle cultivar Rossina e Selvatico. In particolare la cultivar Rossina BO e le cultivar Selvatico BO e Selvatico CS, dichiarate diverse, dai disciplinari di produzione dell'Emilia Romagna, sono invece risultate uguali in seguito ad analisi molecolare e molto simili dal punto di vista morfologico (Rotondi et al., 2004) (Fig. 22).

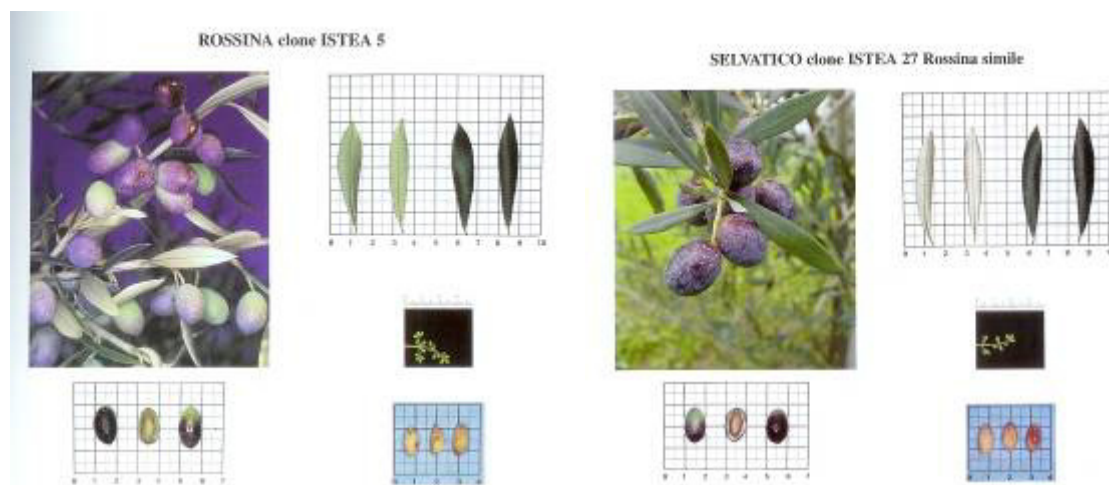


Fig. 22 – Confronto tra la cultivar Rossina clone ISTE 5 (sinistra) e la cultivar Selvatico clone ISTE 27 (destra) (Rotondi et al., 2004).

Anche per queste varietà, come per la Santa Caterina, è stata riscontrata la medesima situazione di confusione varietale. Resta però da chiarire l'origine della cultivar Rossina CS proveniente dal campo collezione di Rende (CS). Infatti questa varietà risulta diversa dall'omonima

bolognese (Rossina BO) certificata dalla regione Emilia Romagna, anche se potrebbe essere piuttosto considerata come clone. Infine si è osservato un caso di sinonimia tra la cultivar Oliva Grossa e la cultivar Ascolana Tenera, come già segnalato nel sito della FAO.

Nonostante le numerose cultivar inserite nell'analisi, molte accessioni non sono state identificate; ciononostante si sono potuti distinguere più gruppi interessanti. In particolare dal dendrogramma (Allegato 1) si distingue: un ampio gruppo costituito da accessioni modenesi (Gruppo 187 e accessioni ad alto livello di similarità), le cui accessioni sono però distribuite in più comuni; due gruppi geneticamente distinti ed isolati tra loro (gruppo 155 e gruppo 158 con relative accessioni vicine geneticamente) costituiti tutti da accessioni reggiane (l'uno costituito da accessione distribuite in più comuni e l'altro costituito da accessioni reperite nel comune di Canossa); infine altri piccoli gruppi costituiti da tre a cinque individui.

Al fine di individuare possibili sinonimie con cultivar non inserite nell'analisi, si sono confrontati i profili allelici delle accessioni non ancora identificate, con il data base molecolare presente sul sito della FAO.

Purtroppo, il confronto è stato possibile per soli quattro loci (DCA3, DCA9, DCA16, DCA18), in quanto in questo studio sono stati utilizzati SSR differenti da quelli riportati nel sito.

Nessuna delle accessioni della popolazione in studio ha però presentato vicinanza genetica con le cultivar riportate, ad eccezione del gruppo costituito da piante localizzate nel comune di Canossa (Gruppo 158) che presenta, per i loci confrontati, una similarità genetica dell'86% con la cultivar Sevillana e del "gruppo 187" che presenta una similarità del 83% con la cultivar Borgiona (originaria del centro Italia). Dato il basso numero dei loci confrontati, il confronto non può essere considerato attendibile, ma sicuramente di aiuto nel prosieguo delle analisi.

I marcatori molecolari, oltre a essere stati utilizzati per la caratterizzazione dei genotipi in esame, si sono rivelati utile strumento, grazie al confronto delle relazioni intercorrenti tra le accessioni stesse con cultivar provenienti dalle zone limitrofe, per ipotizzare l'antica provenienza di queste piante.

Grazie all'analisi molecolare e alle tecniche di georeferenziazione, si è potuto verificare la localizzazione di tutte le sinonimie presenti nella regione (Fig. 23).

In particolare le cultivar Frantoio-Correggiolo e Moraiolo sono distribuite uniformemente in tutte e quattro le province emiliane; la cultivar Santa Caterina, per contro, è molto diffusa solo nella provincia di Parma, nella stessa provincia si riscontra un caso isolato di sinonimia con la cultivar Leccio del Corno; la cultivar Leccino è distribuita prevalentemente nelle provincia di Modena e Piacenza; la cultivar Ascolana Tenera-Oliva Grossa è presente con due unici esemplari, uno in provincia di Parma ed uno in provincia di Modena; pochi esemplari della

cultivar Maurino si localizzano nelle province di Parma e di Reggio Emilia; la cultivar Grappuda è distribuita nelle province di Modena e Forlì Cesena; un unico caso di cultivar Nostrana di Brisighella e un unico caso di cultivar Ghiacciolo si sono riscontrati nella provincia di Forlì Cesena.

Le sinonimie riscontrate mediante analisi genetica riguardano quindi, cultivar sia emiliano – romagnole che di altre regioni del centro Italia. Per questo motivo è interessante sottolineare alcune delle caratteristiche varietali manifestate nell’ambiente di origine:

Ascolana Tenera: è una cultivar da tavola diffusa nelle Marche e nel centro Italia, alcune delle sue caratteristiche sono la tolleranza al freddo e l’autocompatibilità (Barranco et al., 2000a).

Frantoio: è una cultivar da olio diffusa nel centro Italia, caratterizzata da scarsa tolleranza al freddo e produzione di olio di alta qualità.

Grappuda: è una cultivar da olio diffusa in Romagna che presenta una scarsa resistenza al freddo e olio di buona qualità.

Leccino: è una cultivar coltivata in tutte le zone olivicole italiane e nei principali areali del mondo; in Emilia Romagna è presente in tutto il territorio olivicolo. E’ caratterizzata da buona resistenza al freddo e buona produttività.

Maurino: è una cultivar da olio diffusa in Toscana, rustica e tollerante al freddo.

Moraiolo: è una cultivar da olio di larga diffusione in Italia e in altri paesi del bacino del Mediterraneo. In Italia è coltivata prevalentemente in Umbria, Abruzzo, Toscana ed Emilia Romagna, molto rustica, adatta alle zone siccitose e apprezzata per la resistenza ai venti anche salsi, ma poco resistente al freddo. L’olio prodotto è di ottima qualità.

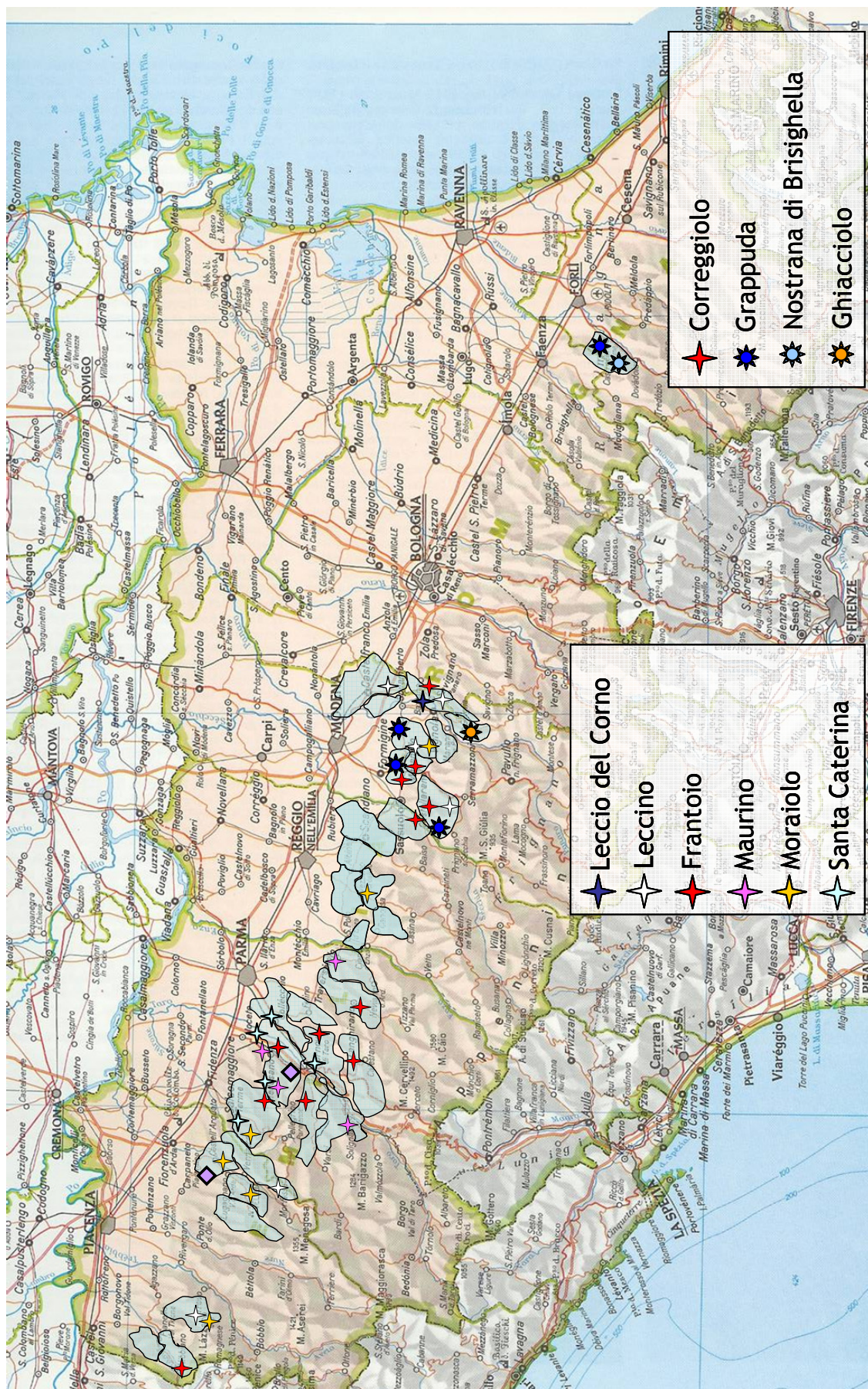
Nostrana di Brisighella: è una cultivar da olio diffusa nelle valli del Senio e del Lamone (Riminese e Ravennate), tollerante al freddo, parzialmente autocompatibile (Rotondi et al., 2004).

Santa Caterina: è una cultivar da tavola diffusa in Toscana (comprensorio fiorentino e Lucchesia), è una varietà che tollera le basse temperature invernali. La fioritura coincide con quella del *Frantoio* parzialmente autocompatibile (Barranco et al., 2000a; Cimato et al., 2001).

Leccio del Corno: è una cultivar da olio diffusa in Toscana (zona di origine San Casciano Val di Pesa, Firenze), una delle sue caratteristiche è la tolleranza al freddo (Cimato et al., 2001).

Ghiacciolo: è una cultivar da olio diffusa esclusivamente nell’areale di Brisighella, Faenza, Casola Val Senio, Modigliana, Castrocaro Terme, è dotata di buona tolleranza al freddo (Rotondi et al., 2004).

Fig 23 – Diffusione delle accessioni sul territorio emiliano (aree evidenziate in azzurro). In figura sono riportati i casi di sinonimia con cultivar diffuse in Toscana, Romagna e centro Italia). Le cultivar Frantoio e Correggiolo sono indicate con lo stesso simbolo.



◆ Ascolana Tenera

Da questa breve descrizione sembra evidente che il germoplasma emiliano che ha mostrato sinonimie, ha come caratteristiche comuni l'areale di provenienza (o zona di maggiore diffusione attuale della cultivar) e la tolleranza al freddo. Tutte le cultivar che hanno mostrato sinonimia con il germoplasma emiliano hanno come zona di maggiore diffusione il centro Italia, in particolare *Frantoio*, *Leccino*, *Leccio del Corno*, *Moraiolo*, *Maurino* e *Santa Caterina*, sono varietà che hanno come zona di origine il nord della Toscana; l'*Ascolana Tenera* è largamente diffusa nel centro Italia, mentre le cultivar *Nostrana di Brisighella*, *Grappuda*, *Ghiacciolo*, sembrano essere presenti solo in Romagna. A questo punto diventa semplice ipotizzare che la diffusione dell'olivo in Emilia sia avvenuta dal nord della Toscana e dalla Romagna, almeno per i genotipi che sono stati identificati in questo lavoro.

Per quanto riguarda la tolleranza al freddo, tutte le cultivar ad oggi identificate hanno come carattere comune la tolleranza alle basse temperature ad eccezione del *Frantoio* e del *Moraiolo* che rappresentano però impollinatori principali per i genotipi in esame; anche la cultivar *Grappuda* è poco tollerante al freddo, però le accessioni identificate si trovano nelle province di Modena e di Forlì-Cesena, quindi in zone nelle quali le temperature sono mediamente più elevate rispetto alla zona occidentale della regione.

Concludendo, i risultati ottenuti seguono la mappa della diffusione dell'olivo proposta da Ciferri (1946) (Fig.24) e confermano, in parte, la diffusione dell'olivo in Emilia dal nord della Toscana, per le province di Parma e Reggio Emilia, e dalla Romagna per la provincia di Modena.

Per quanto riguarda l'influenza della Liguria nel germoplasma emiliano, non sono state riscontrate sinonimie con cultivar liguri sottoposte ad analisi, ma questo potrebbe essere dovuto al fatto che molte di queste cultivar reperite dal campo collezione di Rende (CS) hanno presentato problemi di confusione varietale (come riscontrato anche per alcune cultivar minori Toscane); per questo occorrerà inserire nelle analisi successive cultivar certificate in sostituzione di quelle piante che hanno presentato queste problematiche.



Fig. 24 Migrazione di Olea europaea L. in Italia, ottenute attraverso analisi morfo-ecologiche (Ciferri 1946)

Un altro problema che questa ricerca ha voluto affrontare è stato quello della caratterizzazione morfologica; esistono infatti dei grossi limiti nei sistemi di identificazione che utilizzano marcatori morfologici (influenza di fattori esterni che possono alterare il fenotipo e i lunghi tempi necessari per la raccolta dei dati). Per questo si è pensato di creare un modello che potesse permettere una caratterizzazione morfologica in ambienti eterogenei

I dati morfologici sono stati elaborati statisticamente allo scopo di individuare la combinazione di variabili ad elevato potere discriminante. Per questo motivo è stato valutato il risultato ottenuto dall'analisi molecolare di 51 accessioni, e tramite questo è stato generato un dendrogramma con le sole variabili morfologiche stabili in ambienti eterogenei (è il caso delle piante secolari presenti nelle province emiliane). I dati morfologici scelti (Tab. 19), una volta elaborati statisticamente, hanno evidenziato il buon potere discriminante dell'analisi morfologica, tenendo soprattutto in considerazione caratteri di tipo qualitativo.

I caratteri scelti, inoltre, hanno la caratteristica di essere oggettivi, e quindi replicabili da tutti gli studiosi del settore. Altra caratteristica peculiare di questo modello è la possibilità di discriminare le cultivar utilizzando dati relativi ad un'unica stagione vegetativa.

Purtroppo non è stato possibile discriminare, nella popolazione in studio, i cloni (Fig. 12 a e b); e soprattutto si sono riscontrate due differenze rispetto al dendrogramma molecolare: l'errato posizionamento delle accessioni 10 e 103. In questo caso l'errore può essere giustificato dal

fatto che le analisi sono state condotte su piante secolari e isolate; per esempio nel caso dell'accessione 103, un carattere particolarmente discriminante è stato il punto di inizio dell'invaiaitura (apicale anziché basale), tale caratteristica, però, è stata valutata solo su pochi frutti (scarsa fruttificazione), i quali mostravano un'alta percentuale di attacco di mosca (*Bactrocera oleae* GMELIN) con conseguente annerimento del frutto. Proprio per questo motivo è possibile che vi sia stato un errore nella valutazione del carattere.

A parte queste incongruenze, il modello sembra aver discriminato gli individui analizzati.

Per poterne ricavare dei risultati scientificamente validi, a partire dallo studio per la costruzione di un modello per la caratterizzazione mediante caratteri morfologici, si è dovuto partire dalla valutazione delle variabili scelte per passare poi alle variabili *in toto*, in modo da evidenziare quanto i caratteri esclusi influenzassero negativamente il peso delle variabili, e quindi della reale capacità discriminante delle stesse.

Il metodo per valutare i dati morfologici, e per giustificare e capire le correlazioni, è stato quello di riunirli in un'unica formula mediante l'utilizzo di analisi multivariate (Analisi delle Componenti Principali, PCA). In questo tipo di analisi discriminante, le variabili vengono analizzate nell'insieme in modo da rilevarne le relazioni che intercorrono tra di loro (Hotelling, 1933). Con questa analisi statistica è stato possibile individuare, all'interno del set di dati delle singole accessioni, le variabili che concorrono a mascherare il reale potere discriminante in una caratterizzazione morfologica (Tab. 24). Certamente i caratteri relativi alla foglia (Tab. 9 e 10), e soprattutto le variabili quantitative (biometriche), sono stati quelli che hanno, da un lato, aumentato la variabilità, ma dall'altro hanno contribuito ad aumentare la confusione nella popolazione in studio (Fig. 18). Infatti la foglia, per esempio, è un carattere che dipende molto dall'ambiente, e soprattutto dalla luminosità (per esempio presenza/assenza di coperture vegetali). Altri caratteri che sono risultati responsabili della confusione nella discriminazione della popolazione di olivi secolari, perché legati alle condizioni ambientali (per esempio alla disponibilità idrica), sono stati il "peso del frutto" e il "peso dell'endocarpo", i quali influenzano molto negativamente la componente principale 2 dell'analisi totale delle variabili (Fig. 17); questo si è tradotto in una esclusione di questi caratteri.

Dai risultati dello studio morfologico si è potuto, quindi, costruire un modello per la caratterizzazione morfologica, selezionando 17 variabili di facile misura (Tab. 19).

Tab 24. Descrittori primari eliminati dall'analisi morfologica in quanto considerati fortemente dipendenti dall'ambiente o soggettivi

Caratteri della foglia			
			indice
<i>Lunghezza</i>	<i>ridotta</i>	<i><5 cm</i>	<i>1</i>
	<i>media</i>	<i>5-7 cm</i>	<i>2</i>
	<i>elevata</i>	<i>>7 cm</i>	<i>3</i>
<i>Larghezza</i>	<i>ridotta</i>	<i><1 cm</i>	<i>1</i>
	<i>media</i>	<i>1-1,5 cm</i>	<i>2</i>
	<i>elevata</i>	<i>>1,5 cm</i>	<i>3</i>
<i>Forma</i>	<i>ellittica</i>	<i>L/l <4</i>	<i>1</i>
	<i>Ellittica</i>	<i>L/l 4-6</i>	<i>2</i>
	<i>lanceolata</i>		
	<i>lanceolata</i>	<i>L/l >6</i>	<i>3</i>
<i>Angolo basale</i>	<i>Molto acuto</i>		<i>1</i>
	<i>acuto</i>		<i>2</i>
	<i>aperto</i>		<i>3</i>
<i>Angolo apicale</i>	<i>Molto acuto</i>		<i>1</i>
	<i>acuto</i>		<i>2</i>
	<i>aperto</i>		<i>3</i>
<i>Posizione Larghezza massima</i>	<i>Centro-apicale</i>		<i>1</i>
	<i>centrale</i>		<i>2</i>
	<i>Centro basale</i>		<i>3</i>

Caratteri del frutto			
			indice
<i>Peso</i>	<i>Basso</i>	<i><2 g</i>	<i>1</i>
	<i>Medio</i>	<i>da 2 a < 4 g</i>	<i>2</i>
	<i>Elevato</i>	<i>da 4 a 6 g</i>	<i>3</i>
	<i>Molto elevato</i>	<i>>6 g</i>	<i>4</i>
<i>Forma</i>	<i>sferica</i>	<i>L/l <1,25</i>	<i>1</i>
	<i>Ellittica</i>	<i>L/l 1,25-1,45</i>	<i>2</i>
	<i>allungata</i>	<i>L/l >1,45</i>	<i>3</i>

Caratteri endocarpo			
			indice
<i>Peso</i>	<i>basso</i>	<i><0,3 g</i>	<i>1</i>
	<i>medio</i>	<i>0,3-0,45 g</i>	<i>2</i>
	<i>elevato</i>	<i>>0,45 g</i>	<i>3</i>
<i>N°di solchi fibrovascolari</i>	<i>ridotto</i>	<i><7</i>	<i>1</i>
	<i>medio</i>	<i>7-10</i>	<i>2</i>
	<i>elevato</i>	<i>>10</i>	<i>3</i>
<i>Terminazione dell'apice</i>	<i>mucronato</i>		<i>1</i>
	<i>Senza mucrone</i>		<i>2</i>

I caratteri considerati discriminanti, ma soprattutto stabili in ambienti diversi hanno la caratteristica di essere sia di tipo qualitativo (per esempio presenza/assenza dell'umbone, forma dell'apice del frutto, ecc.), ma anche di tipo quantitativo soprattutto utilizzati come rapporti tra le variabili (per esempio rapporto polpa/nocciolo, forma del frutto espressa come rapporto tra il diametro longitudinale e il diametro trasversale, ecc.)(Tab. 19). Nella popolazione in studio, tre caratteri avevano varianza pari a zero (presenza/assenza dell'umbone, presenza/assenza del mucrone e posizione del diametro massimo dell'endocarpo), ma nonostante ciò si è ritenuto opportuno inserirli tra le variabili scelte in quanto in una popolazione più grande possono contribuire notevolmente per la caratterizzazione di alcune cultivar. Inoltre questi caratteri sono di facile descrizione e soprattutto di tipo oggettivo.

Resta ora da valutare se un modello così costruito possa, come sperato, classificare e identificare cultivar presenti in ambienti omogenei (campi collezione).

Concludendo, i risultati ottenuti dallo studio morfologico e molecolare presentati in questa ricerca ci permettono di trarre alcune conclusioni riguardo al germoplasma olivicolo presente in Emilia:

- Sono state individuate e georeferenziate 213 antiche ceppaie di olivo su tutta la fascia pedemontana dell'Emilia. Per una parte di queste accessioni (61, reperite nel parmense e reggiano) sono state costituite schede elaiografiche di facile consultazione, su cui sono riportati i caratteri della pianta, della foglia, del frutto e dell'endocarpo (tab.8 e Scheda 1).
- I microsatelliti utilizzati per l'analisi molecolare si sono rivelati un ottimo metodo di analisi; dei 284 individui esaminati (220 individui emiliano-romagnoli e 63 individui appartenenti a cultivar nazionali e internazionali), sono stati identificati, considerando i possibili "gruppi clonali" 54 genotipi e casi di sinonimia. Dei genotipi totali, 23 sono rappresentati da cultivar nazionali e internazionali singole e 31 sono genotipi emiliani; in essi sono state riscontrate 9 sinonimie, mentre i restanti 20 rimangono in attesa di identificazione.
- all'interno del germoplasma emiliano-romagnolo sono state individuate popolazioni di cloni delle cultivar Ascolana Tenera-Oliva Grossa, Frantoio-Correggiolo, Leccino, Maurino, Moraiolo, Leccio del Corno, Grappuda, Ghiacciolo, Nostrana di Brisighella:

- il germoplasma piacentino presenta sinonimie con le cultivar Moraiolo, Leccino, Frantoio-Correggiolo, Ascolana Tenera-Oliva Grossa;
 - il germoplasma parmense presenta sinonimie con le cultivar Santa Caterina, Maurino, Frantoio-Correggiolo, Ascolana Tenera-Oliva Grossa;
 - il germoplasma reggiano presenta sinonimie con le cultivar Frantoio-Correggiolo, Leccino, Moraiolo, Grappuda.
 - le cultivar modenesi presentano sinonimie con le cultivar Frantoio-Correggiolo, Moraiolo, Grappuda, Leccino, Leccio del Corno;
 - infine, il germoplasma proveniente da Castrocara Terme (Forlì-Cesena) presenta sinonimie con le cultivar Nostrana di Brisighella, Ghiacciolo, Grappuda, Frantoio Correggiolo.
- Delle nove cultivar che hanno mostrato sinonimia con il germoplasma emiliano cinque hanno la caratteristica di avere come zona di maggiore diffusione il centro Italia , in particolare Ascolana Tenera-Oliva Grossa, Frantoio-Correggiolo, Leccino, Leccio del Corno, Maurino e Moraiolo mentre tre, Grappuda, Nostrana di Brisighella e Ghiacciolo sono diffuse soprattutto in Romagna. Dai risultati è emerso che le cultivar Frantoio, Leccino e Moraiolo sono uniformemente distribuite in tutto il territorio emiliano. le cultivar Frantoio - Correggiolo, e Ascolana Tenera- Oliva Grossa , sono risultate essere sinonimie in accordo con il database della FAO (www.oleadb.eu).
 - Alcuni gruppi non presentano sinonimie con le cultivar utilizzate in analisi .
 - Grazie agli SSR è stato possibile confrontare i dati di laboratorio con quelli di altri laboratori di ricerca che utilizzano la stessa tecnica. In questo modo, si sono potute ipotizzare probabili similarità con cultivar non inserite nell'analisi e individuare incongruenze tra alcuni individui appartenenti a cultivar nazionali inserite nell'analisi.
 - Dall'analisi dei dati si può dimostrare che l'introduzione di piante di olivo sia avvenuta dalla Toscana settentrionale e dalla Romagna (infatti, in passato esistevano canali principali di comunicazione che congiungevano questi territori, i passi appenninici storici). Resta da accertare, per quelle accessioni ancora ignote, quali altri genotipi siano stati importati e se qualche pianta possa provenire da altre zone limitrofe (Fig. 23).
 - Infine dai risultati dello studio morfologico si è potuto, costruire un modello per la caratterizzazione morfologica in ambienti eterogenei selezionando 17 variabili ad elevato potere discriminante e di facile misura.

Parallelamente all'indagine e all'identificazione del materiale genetico, il progetto prevede di moltiplicare i genotipi ritrovati, costituire ed aggiornare i campi collezione, allo scopo di scongiurare l'eventuale perdita di questo importante materiale di valore scientifico e storico-culturale. Questo, permetterà, inoltre, la realizzazione di rilievi morfologici in ambiente omogeneo rendendo così più esaustive le schede elaiografiche.

Un'analisi così condotta permetterebbe di individuare, tra le varietà locali, quelle di maggiore potenzialità produttiva, di elevata tolleranza agli stress ambientali e atte a fornire oli di spiccata tipicità.

Un'ulteriore indagine si impone, trattandosi di piante secolari, all'interno di quei gruppi a distanza di legame zero: sono realmente piante con lo stesso patrimonio genetico delle cultivar di origine? Col passare dei secoli hanno subito qualche mutazione? Queste sono le domande che ci poniamo alla luce di questi risultati.

Certamente il prossimo passo sarà quello di analizzare altri loci con alto potere discriminante e di ottimizzare le metodiche di analisi al fine di confrontare al meglio i risultati ottenuti con altri laboratori di ricerca.

Altrettanto interessante è anche l'indagine dei siti microsatellite già noti là dove venga evidenziata un'anomalia nella lettura dei frammenti al sequenziatore (per esempio la poliploidia) (Fig. 25).

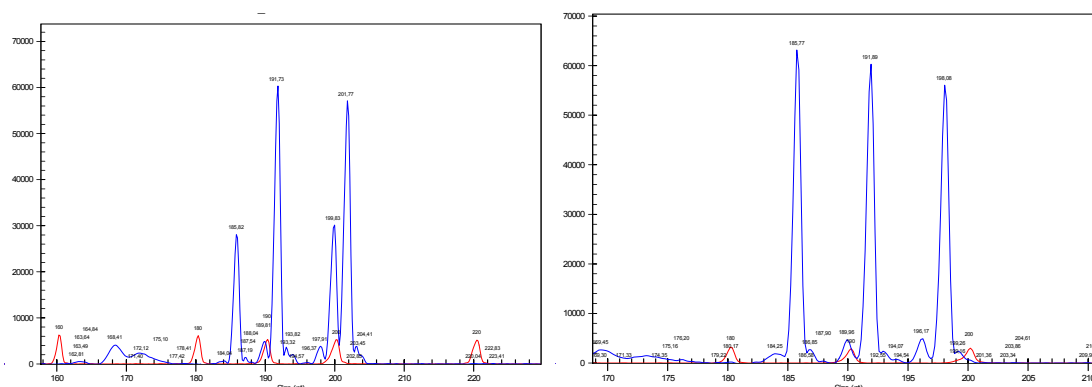


Fig. 25 – Ferogrammi relativi alle accessioni di genotipi locali che presentavano picchi multipli

Di pari passo con queste analisi, verrà approntato un database referenziale, che racchiuda il sizing allelico della maggior parte delle cultivar italiane più diffuse e di genotipi locali, questo servirà sia per il confronto con la rimanente parte del germoplasma emiliano, sia per il confronto di dati tra laboratori di ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- Acerbo G., 1937. La marcia storica dell'olivo nel Mediterraneo. Atti della Società per il Progresso delle Scienze, Riun. XXV, Vol. I, Fasc. 2: 1-22.
- Aguilera Martín A., Berni Millet P., Blázquez Martínez M., Burragato F., Carreras Manfort C., Casulleras Calvo F.J., Conti L., Di Filippo M., Di Russo P.L., García Brosa G., García Morcillo M., Genova N., Grubessi O., Marelli L., Martini M., Meloni S., Morreta S., Remesal Rodríguez J., Revilla Calvo V., Rovira Guardiola R., Sibilía E., Spinolo G., Toro B., 1999. Estudios sobre el Monte Testaccio (Roma) I. Universitat de Barcelona. Barcelona.
- Ambrosino O., Manzo M., Pugliano G., Monti L.M., Rao R., 2004. Identificazione di sinonimi ed omonimi di varietà di olivo incluse nei disciplinari DOP Campani mediante marcatori AFLP. Atti Conv. "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio". Perugia, 5 Dicembre 2003.
- Angiolillo A., Baldoni L., Bandino G., Mulas M., 1998b. Analisi molecolare con marcatori AFLP delle risorse genetiche di olivo della Sardegna. Atti IV Convegno Nazionale Biodiversità. Alghero, 8-11 settembre: 413-416.
- Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L., 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified length polymorphisms. *Theor Appl Genet.* 98:411 – 421.
- Angiolillo A., Pellegrini M., Mencuccini M., Baldoni L., 1998a. La variabilità genetica delle cultivar di olivo evidenziata con marcatori AFLP. Atti IV Giornate Scientifiche SOI. Sanremo, 1-3 aprile: 509-510.
- Angiolillo A., Reale S., Pilla F., Baldoni L., 2006. Molecular analysis of olive cultivars in the Molise region of Italy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53:289-295.
- Anonimo, 2003. Gli Ulivi dei Colli Piacentini: coltivare, raccogliere, conservare. Ed. Kiss, pp. 55. Piacenza.
- Arnheim N., White T., Rainey W.E., 1990. Application of PCR: organismal and population biology. *Bioscience*. Vol. 40(3), pp. 174 –182.
- Balbini, E., 1956. Contributo allo studio delle razze di olivo coltivate in Toscana. III- Indagini condotte in provincia di Pistoia. *Ann.Sper.Agr.*, 10: 1-52.
- Baldini E., 1956. Contributo allo studio delle razze di olivo coltivate in Toscana. III – Indagini condotte in provincia di Pistoia. *Ann. Sper. Agr.*, 10:1-52.
- Baldini E., 2003. Notizie sull'olivicoltura Bolognese. Ed. Accademia nazionale di agricoltura. Bologna.
- Baldini E., Scaramuzzi F., 1952. Sul valore dei dati biometrici nella descrizione e classificazione delle razze di olivo in coltura. *Ann. Sper. Agr.*, 6:1597-1636.

- Baldini E., Scaramuzzi F., 1955. Ulteriori indagini sulla validità del metodo bio-statistico nella descrizione e classificazi-one delle cultivar di olivo. *Ann. Sper. Agr.*, 9:171-186.
- Baldoni L., Alfei B., Santinelli A., Angiolillo A., Pannelli G., 2002b. Esame dei principali casi di sinonimia ed omonimia in varietà di olivo marchigiane mediante analisi AFLP. *Atti VI Convegno Nazionale Biodiversità. Valenzano (Bari), 6-7 settembre 2001.*
- Baldoni L., Pannelli G., Alfei B., Bandino G., 2002a. Relazioni genetiche tra le varietà di olivo Bosana, Coroncina e Peranzana. *Atti Conv. Int. Olivicoltura, Spoleto.*
- Baldoni L., Ricciolini C. Di Marco L., Germanà M.A., 2003a. Variabilità e relazioni genetiche tra le varietà di olivo della Sicilia. *Atti Conv. "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio". Perugia, 5 Dicembre.*
- Baldoni L., Ricciolini C., Munari C., Pannelli G., Arcioni S., 2003b. Caratterizzazione del DNA di varietà ed ecotipi di olivo dell'Umbria. *Atti Conv. "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio". Perugia, 5 Dicembre.*
- Baldoni L., Ricciolini C., Munari C., Pannelli G., Arcioni S., 2003. Caratterizzazione del DNA di varietà ed ecotipi di olivo dell'Umbria. *Atti convegno "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio". Perugia, 5 dicembre: 312-315.*
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B., 2002. DAN fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (3): 185-190.
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B., 2004 Assessment of ganetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers . *Euphytica* 136: 93-102.
- Barone E., Caruso T., Marra F.P., Motisi A., 1995. Caratteristiche biometriche di 25 cultivar di olivo del germoplasma siciliano. *Atti Conv. "Tecniche, norme e qualità in olivicoltura". Potenza, 15-17 dicembre 1993, pp. 623-630.*
- Barone E., Di Marco L., Motisi A., T. Caruso, 1994. The Sicilian olive germplasm and its characterization by using statistical methods. *Acta Hort.*, 356:66-69.
- Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castaneda C., Serafin F. and Trujillo I., 2000a. World catalogue of olive varieties. Consejo Oleicola Internacional, Madrid.
- Barranco D., Trujillo I., Rallo P., 2000b. Are "Oblonga" and "Frantoio" olives the same cultivar? *Hort. Sci.* 35:1323-1325.
- Bartolini G. e Petruccelli R., 1994. Metodi biochimici e molecolari per l'identificazione delle specie coltivate. *Riv. Sementi Elette*, 5:V/45 – V/56.
- Bartolini G., Baroncelli S., Petruccelli R., Pugliesi C., 1992. La caratterizzazione varietale dell'olivo e relative problematiche. *Atti Congr. "Salvaguardia e valorizzazione delle risorse genetiche". Alghero 21-23 settembre.*

- Bartolini G., Petruccelli R., 2002. *Classification, origin, diffusion and history of the olive*. FAO. Roma.
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G., 1998. Olive germoplasm: cultivars and word – wide collections. Ed. Seed and Plant Genetic Resources Service, F.A.O., pp. 459. Roma.
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G., 2005. OLIVE GERMPLASM: cultivars and world-wide collections. *Web site FAO*: <http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp>
- Basenghi I., Pellini U., 2003. *Alberi a Scandiano*. Reggio Emilia. 276 pp.
- Bassi D., 2003. Il germoplasma dell'olivo in Lombardia. Ed. Regione Lombardia-Università degli Studi, Milano.
- Bassi D., Tura D., Geuna F., Failla O., Pedò S., 2002. Characterisation of local olive (*Olea europaea* L.) accessions by oil composition, morphological and molecular markers methods. *Acta Hort.* 586:57-60.
- Battigelli F., 2002. Ai limiti dell'areale. L'olivo in Friuli tra passato e presente. In: G. Longo e P. Scarpi (Ed.), "Tutte le sfumature del verde. Qualità dell'olio e purezza del paesaggio". Padova.
- Beckmann J.S., Soller M., 1986. Restriction Fragment Length Polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica*. Vol. 35, pp. 111 – 124.
- Belaj A., Caballero J.M., Barranco D., Rallo L., Trujillo I., 2003a. Genetic characterization and identification of new accessions from Syria in an olive germplasm bank by means of RAPD markers. *Euphytica*. vol. 134(3), pp. 261-268.
- Belaj A., Cipriani G., Testolin R., Rallo L., Trujillo I., 2004b . Characterization and identification of the main spanish and italian olive cultivars by simple –sequence-repeat markers. *HortScience* vol.39 (7): 1557-1561.
- Belaj A., De la Rosa R., Rallo P., Angeles Ojeda M., Diaz A., Muñoz C., Trujillo I., Baldoni L., Martin A., Barranco D., Rallo L., 2005b. Molecular markers in olive: an integrated approach. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (*IN PRESS*).
- Belaj A., Diez C., Satovic Z., Baldoni L., Barranco D., 2005a. Collection and study of wild olive populations in Spain by means of SSR markers. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (*IN PRESS*).
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L. and Trujillo I., 2003b. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor. and Appl. Genet.* 107: 736-744.
- Belaj A., Satovic Z., Rallo J., Trujillo I., 2004a. Optimal use of RAPD markers for identifying varieties in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129(2): 266-270.

- Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I., 2002. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections es determined by randomly amplified polymorphic DNA. Theor Appl Genet. Vol. 105, pp. 638 – 644.
- Belaj A., Trujillo I., Rosa R.D.L., Rallo L., 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126(1):64-71.
- Besnard G., Baradat P., Chevalier D., Tagmount A., Bervillé A., 2001. Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. Genet. Res. and Crop evolution, 48:165-182.
- Besnard G., Khadari B., Baradat P., Bervillé A., 2002. *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. Theor. Appl. Genet., 104:1353-1361.
- Bianchedi C., 1880. L'Olivo sulle colline parmensi. Parma.
- Boardman J., 1977 - The olive in the Mediterranean: its culture and use. Phil Trans. R. Soc. Lond. B. 275: 187-196 (1976).
- Bogani P., Petruccelli R., Polsinelli L., Roselli G., 1994. Identification olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA. Acta Horticulturae. Vol. 356, pp. 98 – 101.
- Bortolotti G., 1958. *Le neviccate del 1829 – 30 a Bologna nelle cronache del Rangone e nelle illustrazioni del tempo*. Ed. La Mercanzia. Bologna.
- Bottari V., Spina P., 1953. Le varietà di olivo coltivate in Sicilia. Ann. Sper. Agr., 7:937-1004.
- Bracci F., 1937. Le varietà di olivo coltivate in Toscana. In *Le varietà di olivo coltivate in Italia*. Ed. REDA, Roma, 3-15.
- Bracci T., Busconi M., Fogher C., Sebastiani L., 2005. Evaluation of genetic diversity in Liguria region olive (*Olea europaea* L.) germplasm by SSR markers. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (IN PRESS).
- Breviglieri N., Battaglia E., (1954). Ricerche cariologiche in *Olea europaea* L. Caryologia, 2-3: 271-283.
- Bronzini de Caraffa V., Giannettini J., Gambetti C., Maury J., 2002. Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. Euphytica 123: 263-271.
- Brunetti M., 2001. Tre secoli di meteorologia a Bologna Milano. <http://www.meteogiornale.it/news/read.php?id=8561>
- Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorno, C., Cattapan, F., Fogher, C. (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. Food Chemistry, 83:127-134.

- Cantini C., Cimato A., Sani A., 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica* 109:173-181.
- Carboni. M., 2007. Gli antichi olivi del ducato di Parma e Piacenza. Grafiche step editrice. Parma.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F. and Giorio G., 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104:301-307.
- Caruso T., Campisi G., Motisi A., La Mantia M., Occorso G., Testolin R., 2005. Morphological, phenological and molecular characterization of the sicilian indigenous olive (*Olea europaea sativa* L.) germplasm. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (*IN PRESS*).
- Caruso T., Cartabellotta D., Motisi A., (2007). Cultivar di olivo siciliane. Identificazione validazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e qualità degli oli. Pp. 1-202. Palermo.
- Castelletti L., Castiglioni E., Rottoli M., 2001. L'agricoltura dell'Italia settentrionale dal Neolitico al Medioevo. In: Le piante coltivate e la loro storia, a cura di Failla O. e Forni G., Ed. Franco Angeli.
- Cavallero E., 2006. Gli olivi in Piemonte: cenni storici. Convegno "Biodiversità olivicola del Piemonte e del Monferrato casalese, Casale Monferrato, 19/3/2005.
- Cervi G., 1992. La collina reggiana: ambiente naturale, vicende storiche e patrimonio culturale del medio Appennino reggiano. Ed. Cassa di Risparmio di Reggio Emilia. 404 pp.
- Cherubini G., 1985. L'Italia rurale del basso medioevo. Olio, Olivo, Olivicoltori. Ed. Laterza.
- Cicoria M., Corbo M., D'Uva T., D'Uva T., Ruggiero A., 2000. Il germoplasma dell'olivo nel Molise. Ed. ERSA-Molise, Campobasso.
- Ciferri R. e Breviglieri N., 1942. Introduzione ad una classificazione morfo – ecologica dell'olivo coltivato in Italia. *L'Olivicoltore*, n° 1, pp. 2 – 7.
- Ciferri R., 1942. Recenti progressi degli studi botanico – agrari sull'olivo. *Accademia dei Georgofili. Conv. di studi olivicoli*. Firenze.
- Ciferri R., Marinucci M., Morettini A., 1942b. Dati preliminari per una sistematica delle razze di olivo in coltura. *L'Olivicoltore*, n° 1, pp. 1 – 8.
- Cimato A., Cantini C., Sani G., 2001. L'olivo in Toscana: il germoplasma autoctono. Ed. ARSIA Toscana-IPSL, CNR-Regione Toscana, Firenze.
- Cimato A., Cantini C., Sani G., Marranci M., 1993. Il germoplasma dell'olivo in Toscana. Ed. Regione Toscana, pp. I – VI. Firenze.
- Cimato A., Cantini C., Sani G., Romani A., Autino A., Cresti M., 2004. Il germoplasma autoctono dell'olivo in Toscana. Ed. ARSIA Toscana-Regione Toscana, Firenze.

- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi A., Cimato A., 2001. 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.
- 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.
- Clemente G., 1847. Cenni sul verme dell'olivo. *Giornale di agricoltura, orticoltura, industria, commercio ed economia comunale per le provincie venete*, 5(I): 33.
- Collins F.S., Brooks L.D., Chakravarti A., 1998. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research*, 8:1229-1231.
- Columella, L. G. M., (Sec. I d.C.), 1977. L'arte dell'agricoltura e Libro sugli alberi. Einaudi, Torino.
- Consolandi C., Calmieri L., Doveri S., Maestri E., Marmioli N., Reale S., Lee D., Baldoni L., Tosti N., Severgnini M., De Bellis G., Castiglioni B., 2007. Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format. *Journal of Biotechnology*, 129:565-574.
- Contento A., Ceccarelli M., Gelati M.T., Maggini F., Baldoni L., Cionini P.C., 2002. Diversità of *Olea* genotypes and the origin of cultivated olives. *Theor Appl Genet.*, 104:1229 – 1238.
- Cooper D.N., Smith B.A., Cooke H., Niemann S., Schmidtke J., 1985. An estimate of unique sequence heterozygosity in the human genome. *Human Genetics*. 69:201-205.
- Corradini A., 1979. Immagini della storia di Albinea documenti e fotografie inedite della nostra terra. Pro Loco di Albinea. Reggio Emilia.
- Cresti M., Linskens H.F., Mulcahy D.L., Bush S., Di Stilio V., Xu M.Y., Vignani R., Cimato A., 1996. Preliminary communication about the identification of DNA in leaves and in olive oil of *Olea europaea*. *Adv. Hort. Sci.* 10:105-107.
- Cristoferi G., Rotondi A., Magli M., 1997. Il germoplasma dell'olivo in Emilia Romagna. Ed. ISTEA. Bologna.
- Dall'Acqua M., Lucchesi M., 1979. Parma città d'oro. Ed. Altermilli. Parma.
- Damigella P., 1960. Variabilità dei caratteri biometrici dell'olivo e impiego delle funzioni discriminanti. *La Ric. Scientifica*, 4:522-530.
- De la Rosa R., Angiolillo A., Guerrero C., Pellegrini M., Rallo L., Besnard G., Bervillè A., Martin A., Baldoni L., 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 106(7):1273-82.
- Deumling B., 1981. Sequence arrangement of a highly methylated satellite DNA of plant Scilla: a tandemly repeated inverted repeat. *Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 78*, pp. 338 – 342. USA.

- Diaz A., De la Rosa R., Martin A., Rallo P., 2005a. Development and characterization of 12 new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.). 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (*IN PRESS*).
- Diaz A., De la Rosa R., Martin A., Rallo P., 2005b. Cultivar identification and elucidation of genetic relationships within the species *Olea europaea* L. using microsatellites. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (*IN PRESS*).
- Diaz A., De la Rosa R., Martin A., Rallo P., 2006a. 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 Genetics & Genomes*, 2: 165-175.
- Diaz A., Martin A., Rallo P., Barranco D., De la Rosa R., 2006b. Self-incompatibility of “Arbequina” and “Picual” Olive Assessed by SSR Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131(2):250-255.
- Diaz Bermudez A., 2005. Desarrollo y caracterización de nuevos microsatélites y SNPs y aplicación en la mejora genética del olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral, Departamento de Genética, Universidad de Córdoba – E.T.S.I.A.M. Córdoba.
- Donna G., 1944. Notizie storiche sulla coltivazione dell’olivo in Piemonte. *Annali dell’Accademia di Agricoltura di Torino*, 87: 61-84.
- Durante M., Petrucelli R., Bartolini G., Bernardi R., 1992. Impiego delle proteine di riserva per l’identificazione delle cultivar di olivo (*Olea europaea* L.). Cong. “Olive oil Qualità”. pp. 57 – 60.
- Fabbri A., Ganino T., 2003. Il germoplasma olivicolo in Emilia. Atti Conv. “Germoplasma olivicolo e tipicità dell’olio”. Perugia, 5 Dicembre.
- Fabbri A., Hormaza J.I., Polito V.S., 1995. Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *J. Amer. Soc. Sci.*, 120(3):538 – 542.
- Falstocco Tolsi(1996)- Cytogenetic investigation in *Olea europaea* L. *Journal of Genetics and Breeding*, 3, 235-238.
- FAO (2008) www.oleadb.eu
- Faostat (2004) <http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops>.
- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle*.
- Finkeldey, R., Gregorius, H.F. 1994. Genetic resources: selection criteria and design. In: Z.S. & H.H. Hattermer (Eds.), *Conservation and Manipulation of Genetic Resources in Forestry*, Kwang Moon Kag, Seoul, pp. 322-347.

- Fontanazza G., 1993. Aspetti tecnici di ristrutturazione della olivicoltura ligure. In: Studio della ristrutturazione dell'olivicoltura ligure. Regione Liguria Servizio di Assistenza Tecnica e Sperimentazione in Agricoltura (Ed). Imperia, p.p. 28-62.
- Frezzotti, 1937. Studio biometrico sulle olive di diverse varietà e provenienze. Le varietà di olivo coltivate in Italia. Ed. Reda. Roma.
- Gallitelli M., Semeraro L., Antonelli N.M., 1991. RFLP analysis in the olive (*Olea europaea* L.), EMBO COURSE, Cologne.
- Ganino T., Bartolini G., Fabbri A. (2006). The classification of olive germplasm - A review. *J Hort Sci Biotech*, 81(3):317-334
- Ganino T., Beghè D., Valenti S., Nisi R., Fabbri A., 2007. RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region, Northern Italy. *Genet Resour Crop Evol.*, 54 (7): 1531-1540
- Ganino T., Fabbri A., 2005. Genetic characterization of *Olea europaea* L. germplasm in northern Italy. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (IN PRESS).
- Gaudenzi A., 1916. Il monastero di Nonantola, il ducato di Persiceta e la Chiesa di Bologna.
- Gemas V.J., Rijo-Johansen M.J., Tenreiro R., Fevereço P., 2000. Inter- and intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(3):312-319.
- Germano A., 1998. L'olivo e l'olio nell'antichità (1a parte). *Olivo & Olio*, 6: 52 – 55.
- Germi A., Rossi S., Zanetti R., Corradini R., Fogher C., Marchelli R., 2005. Development of a peptide nucleic acids array platform for the detection of genetically organism in food. *J. Agric. Food Chem* 53: 3958-3962.
- Gonzalo Claros M., Crespillo R., Aguilar M. L., Cánovas F. M., 2000. DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 116: 131-142.
- Gottlieb L.D., 1977. Electrophoretic evidence and plant systematic. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 64:161 – 180.
- Gounaris Y., Skoula M., Fournaraki C., Drakakaki G., Makris A., 2002. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum x intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30:249-258.
- Grassi, S. 2004. Cryopreservation of buds of *Vitis Vinifera* L. rootstock “Kober 5BB” (*Vitis Berlandieri* x v. *Riparia*). *Acta Naturalia de “l'Ateneo parmense”* 40, 3/4: 91-94. (IN PRESS)
- Gribaudo P., 1897. Olive e zafferano sulle colline di Torino. *Bollettino storico-bibliografico Subalpino*, 3: 298-301.

- Guerin J., Sweeney S., Collins G. and Sedgley M., 2002. The Development of a Genetic Database to Identify Olive Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(6):977-983.
- 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(2):211-217.
- Hatzopoulos P., Banilas G., Giannoulia K., Gazis F., Nikoloudakis N., Milioni D., Haralampidis K., 2002. Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 574-586.
- Hosseini-Mazinani M., 2005. Olive growing and olive research in Iran: a status report. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkey). (*IN PRESS*).
- Hotelling, H., Analysis of a Complex of Statistical Variables with Principal Components *Journal of Educational Psychology*, 24:498-520 (1933).
- Imberciadori I., 1975. *La Bonifica*. XXIX(3).
- Imberciadori I., 1983. L'olivo nella storia e nell'arte mediterranea. *Rivista di Storia dell'Agricoltura*, XXIII (1): 435-481.
- Khadari B., Charafi J., A. Moukhli, Ater M., 2007. Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. *Tree Genetics & Genomes*, DOI 10.1007/s11295-007-0102-4.
- Kosman E. and Leonard K.J., (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploidy species.
- La Mantia M. et al., (2006). Identification of olive genotypes using SSR and RAPD markers. *Proceedings OLIVEBIOTEQ Biotechnology and quality of Olive tree products around the Mediterranean basin*. Pp. 9-14. Actes Editions, Rabat, Maroc
- Labombarda P., Cipriani M., Fontanazza G., 2002b. Analisi AFLP della biodiversità di germoplasma olivicolo umbro. *Atti "Convegno Internazionale di Olivicoltura"*. Spoleto, 22-23 aprile: 400-405.
- Labombarda P., Fontanazza G., 2002a. Caratterizzazione genetica del gruppo varietale del "Moraiolo": utilizzo dei marcatori molecolari AFLP per chiarire casi di omonimie e sinonimie. *Atti "Convegno Internazionale di Olivicoltura"*. Spoleto, 22-23 aprile: 406-410.
- Lanaro Sartori P., 1992. Capitolo L'agricoltura e la pesca dall'Atlante del Garda. *Grafo Edizioni*, vol.II: 15 – 16.
- Lanza B., Marsilio V., Martinelli N., 1995. Identificazione varietale di cultivars di olivo (*Olea europaea* L.). Approcci analitici quantitativi del pattern esinico del granello pollinico. *Atti del convegno: "L'olivicoltura mediterranea: stato e prospettive della coltura e della ricerca. Rende (CS)*.
- Ledig, F.T. 1986. Conservation strategies for forest gene resources. *For Ecol Manage* 14, 77-90.

- Ledig, F.T., Millar, C.I., Riggs, L.A. (Editors) 1990. Special issue: conservation of diversity in forested ecosystems. *For Ecol Manage* 35, 1-197.
- Leitão F., De Fatima Potes M., Leonilde Calado M., José de Almeida F., 1986. Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. Ed. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Direcção Geral de Planeamento e Agricultura, pp 5 – 13. Lisboa.
- Lombardo N., Madeo A., Mazzalupo I., Alessandrino M., Belfiore T., Ciliberti A., Godino G., Pellegrino M., Rizzuti B., Perri E., Mazzotti F., Russo A., Salerno R., Parise A., Noce M.E., 2004. Contributo alla caratterizzazione del germoplasma olivicolo pugliese. Ed. Regione Puglia-I.S.Ol.-Comunità Europea. Cosenza.
- Lombardo N., Perri E., Muzzalupo A., Madeo A., Godino G., Pellegrino M., 2003. Il germoplasma olivicolo calabrese. Ed. ISOI-Regione Calabria-Co.R.Ass.Ol. Cosenza.
- Lona F., Gandini I.M., Corradi M.G., 1981. Il verde a Parma: aspetti significativi della cultura e della tradizione botanica in Parma. Ed. Banca Monte Parma. Parma. 191 pp.
- Lopes M.S., Mendonça D., Sefc K.M., Gil F.S., Machado A., 2005. Evidence of intra-cultivar genetic variability in olive cultivars. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (*IN PRESS*).
- Maas J.L., 1977. Pollen ultrastructure of Strawberry and other Small – Fruit Crops. Ed. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 102:560 – 571.
- Mailer R.J. e May C.E., 2002. Variability and inter-relationships of olive trees and cultivars using RAPD analysis. *Adv. Hort. Sci.*, 16(3-4):192-197.
- Malan C.E., 1935/38. *Lavori di Botanica*, IV volume.
- Marchesini M., 1998. Il paesaggio vegetale nella pianura bolognese in età romana sulla base di analisi archeopalinologiche e arcocarpologiche. Tesi di dottorato, Università degli Studi di Firenze.
- Marchionni C., Baldoni L., Angiolillo A., Pannelli G., Panara F., 1999. Caratterizzazione genetica delle più importanti cultivar di olivo dell'Umbria, 5° Convegno nazionale sulla biodiversità. *Atti n°13*:243 – 250.
- Marinucci M., 1908. Schema di sistemazione delle razze di olivo coltivate nell'Italia meridionale. *Atti Istit. Incoragg.*, Serie 4, Vol. V, pp. 1 – 18. Napoli.
- Markert C.L., Moller F., 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, antogene and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45:753-763.
- Marrazzo T., Cipriani G., Marconi R., Cimato A., Testolin R., 2002. Isolation and characterisation of microsatellite DNA in Olive (*Olea europaea* L.). *Acta Hort.* 586:61-64.
- Martins-Lopes P., Lima-Brito J., Gomes S., Meirinhos J., Santos L., Guedes-Pinto H., 2007. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic Variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:117-128

- Mekuria G., Collins G. and Sedgley M., 1999. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 74(3):309-314.
- Messina R. 2007. Estrazione del DNA da oli con il metodo "RM2006" In: *Italus Hortus. VIII Giornate Scientifiche SOI. 8-12 maggio 2007.* (vol.14, pp63). Sassari:(Italy).
- Miliani R., 1932. Classificazione ecologica dell'olivo in Italia. *Annali di Tecnica Agraria*, anno V, fasc. III, pp. 247 – 256.
- MirAli N., Nabulsi I, 2004. Molecular characterization and genetic relatedness among olive cultivars using RAPD markers. *Adv. Hort. Sci.*, 18(4):173-180.
- Montemurro C., Simeone R., Pasqualone A., Ferrar E., Blanco A., 2005. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *J. Hort. Sci. and Biotech.*, 80(1):105-110.
- Muzzalupo, I., Perri, E., 2002. Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *European Food Research and Technology*, 214:528-531.
- Nikoloudakis N., Banilas G., Gazis F., Hatzopoulos P., Metzidakis J., 2003. Discrimination and genetic diversity among cultivated olives of Greece using RAPD markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 128(5): 741-746.
- Omrani-Sabbaghi A., Shahriari M., Falahati-Anbaran M., Mohammadi S.A., Nankali A., Mardi M., Ghareyazie B., 2006. Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. *Scientia Horticulturae*, 112:439-447.
- Pafundo S, Agrimonti C, Marmioli N., 2005. Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *J AgricFood Chem.*, 53:6995-7002
- Pandey K.M., Troughton J.N., 1974. Scanning Electron Observations of Pollen Grains and Stigma and the Self Incompatible Species. *Euphytica*, 23:337 – 344.
- Pannelli G., Alfei B., D'Ambrosio A., Rosati S., Famiani F., 2000. Varietà di olivo in Umbria. Ed. Pliniana, pp. XXII – XXXVIII. Umbria.
- Parlati M.V. e Pandolfi S., 2003. Catalogo delle principali varietà di olivo selezionate nel Lazio. Ed. Unione Europea-Regione Lazio-ARSIAL Lazio. Roma.
- Pasqualone A., Montemurro C., Caponio F., Blanco A., 2004. Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites. *Jour. Agric. Food Chem.*, 52(5): 1068-1071.
- Passeri R., 1978. *La seconda Canossa. Storia di Monteveglio e di Montebudello*. Bologna.
- Patac de la Traviesas L., Cadahia Circuendez P., Del Campo Sanchez E., 1954. Tratado de olivicultura. Ed. Sindicato Nacional del Olivo. Madrid.

- Peakall R. e Smouse P.E., 2005. *GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. The Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
- Pellini U., 1996. *Alberi nella storia di Reggio*. AGE Editore. Reggio Emilia.
- Perri E., Lombardo N., Palopoli A., Miele D., 1999. Indagine sul Germoplasma di olivo della Sicilia mediante RAPD. 5° Convegno nazionale sulla biodiversità. Atti n°13:299 – 304.
- Perri E., Parlati M.V., Palopoli A., Godino G., 1998. Valutazione di presunti cloni di olivo (*Olea europaea* L.) cv Carboncella, mediante marcatori RAPD. Atti IV Giornate Scientifiche SOI, Sanremo.
- Perri E., Parlati M.V., Palopoli A., Sirianni R., Giofriddo F., 1995. Caratterizzazione varietale in olivo (*Olea europaea* L.) mediante analisi multivariata applicata alla composizione acidica di oli monovarietali. Atti Conv. "Tecniche, norme e qualità in olivicoltura". Potenza, 15-17 dicembre 1993.
- Petrucelli R., 1992. Analisi di caratteri Biochimici e morfo – agronomici ai fini della identificazione varietale dell'olivo (*Olea europaea* L.). Tesi Dott. di Ricerca, Dipartimento di Ortoflorofrutticoltura, Università di Firenze.
- Pignone, R., 2007. Terre per l'olivo. www.regione.emilia-romagna.it/geologia
- Pilla F., Veltri C., Lagonigro R., Angiolillo A., Marchionni C., Baldoni L., 1999. Esame di alcune cultivar di olivo del Molise mediante marcatori AFLP. 5° Convegno nazionale sulla biodiversità. Atti n°13:305 –309. Caserta, 9-10 Settembre.
- Pini A.I., 1980. Due colture specialistiche del Medioevo: la vite e l'olivo nell'Italia padana. Ed. Società editrice il Mulino. Bologna.
- Pinna M., 1996. Le variazioni del clima, dall'ultima grande glaciazione alle prospettive per il XXI° secolo. Ed. Franco Angeli. 214 pp.
- Pontikis C.A., Loukas N., Koussonig G., 1980. The use of biochemical marker to distinguish olive cultivars. J. Hort. Sci. Vol. 55 (4), pp. 333 – 343.
- Pugliano G., Flaminio G., Pugliano G., Pugliano M.L., Sanino G., Schiavone S., 2000. La risorsa genetica dell'olivo in Campania. Ed. Regione Campania – Giunta Regionale, pp. 9 – 21. Napoli.
- Quiros C.F., 1975. Exine patter of a hybrid between *Lycopersicum esculentum* and *Solanum pennelli*. The Jour.Ed. Heredity, 66:45 – 77.
- R Development Core Team, (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

- Rabbini M., 1999. Il borgo del Sasso tra Medioevo e contemporaneità: da Castel del Vescovo a Sasso Marconi. Bologna.
- Rafalski A., 2002. Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:94 – 100.
- Rafalski A., Ching A., Bhatramakki D., Morgante M., Dolan M., Register J.C., Smith O.S., Tingey S., 2001. SNP markers in maize: discovery and applications. International Plant and Animal Genome IX Conference, January 13-17, 2001, W149. San Diego.
- Rallo L., Barranco D., Caballero J.M., Del Rio C., Martin A., Tous J., Trujillo I., 2005. Variedades de olivo en España. Ed. Junta de Andalucía – Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación – Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Barcelona, México.
- Rallo P., Dorado G., Martin A., 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101:984-989.
- Ranamukhaarachchi D. G., Kane M. E., Guy C. L., Li Q.B., 2000. Modified AFLP Technique for Rapid Genetic Characterization in Plants. *BioTechniques*. 29(4):858-866.
- 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(9):1193-1205.
- Resta P., Lotti C., Fanizza G., Godini A., Mariani R., Palasciano M., 2002. Use of AFLP to Characterize Apulian Olive Varieties. *Acta Hort.*, 586: 73-77.
- Rombaldi O., 1978. L'agricoltura nell'area matildica: l'Emilia. Ed. Aedes Muratoriana. Modena.
- Roselli G., 1979. Identificazione di cultivar di olivo da alcuni caratteri del polline. *Riv. Ortoflorofrutticoltura*. 63:435 – 445.
- Roselli G., Petruccelli R., Polsinelli L., Cavalieri D., 2002. Variability in five olive cultivars (*Olea europea* L.). *J. Genet & Breed.*, 56:51 – 60.
- Roselli G., Scaramuzzi F., 1974. Definizione dei termini di cultivar e clone. *Accademia Nazionale di Agricoltura*, Estratto dagli annali, 167° anno, IV serie, Fasc. 2. Bologna.
- Roselli G., Vendramin G., Rossi P., 1990. Patterns isoenzimatici in cultivar di olivo. *Atti XXXIV Conv. Società di genetica Agraria*, Marina di Ugento.
- Rotondi A., Magli M., Ricciolini C. and Baldoni L., 2003. Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica* 132:129-137.
- Rotondi A., Mari M., Badini A.R., Govoni M., Cristoferi G., 2004. L'attitudine alla propagazione e la certificazione genetica e sanitaria dell'olivo in Emilia-Romagna. Editrice La Mandragola Imola (BO).
- Rotundo A., Marone E., 2002. Il germoplasma olivicolo lucano. Ed. Unione Europea-Regione Basilicata-MiPAF, Potenza.

- Ruby J., 1917. Recherches morphologiques et biologiques sur l'olivier et sur ses variétés cultivées en France. Ann. Soc. Nat., tome XX, pp. 95 e sgg. Paris.
- Rugini E., Baldoni L., 2003. Le biotecnologie. In: Olea - Trattato di olivicoltura. Edagricole, Bologna.
- Russo G., Resta P., Corona M.G., Canizza G., 2002. Analisi RAPD della diversità in varietà pugliesi di olivo. Atti VI Convegno Nazionale Biodiversità. Valenzano, 6-7 Settembre 2001.
- Sacchi A., 1973. Introduzione ad un corso di filologia micenea. Roma.
- Sakai, A., Matsumoto, T., Hirai, D., Niino, T. 2000. Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *Cryoletters* 21: 53-62.
- Sansavini S., Pancaldi M., 2000. Brevettabilità e tutela dell'identità genetica delle nuove varietà. Frutticoltura, 2: 38 – 44.
- Savastano L., 1939. Identificazione delle varietà di olivo. Ann. R. Staz. Sper. Oliv, I:99-sgg. Pescara.
- Sebastiani L., Busconi M., Borghi M., Fogher C., 2004. Caratterizzazione molecolare delle principali cultivar del patrimonio olivicolo ligure. Atti convegno "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio". Perugia, 5 dicembre 2003: 202-206.
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues Dos Santos M., Laimer Da Câmara Machado M. and Da Câmara Machado A., 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Mol. Ecol. 9:1171-1173.
- Shahriari M., Nankali A., Ghareyazi B, 2005. Identification iranian olive cultivars by using RAPD and SSR markers. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (IN PRESS).
- Simmonds, N.W., 1976. Evolution of crop plants. Longman. London e New York.
- Smartt J., Simmonds N.W., 1988. Evolution of crop plants, Second Edition. Blackwell Publishing. London.
- Soller M., Beckmann J.S., 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet., 67:25 – 33.
- Strikic F., Bandelj D., Perica S., Cmelik Z., Satovic Z., Javornik B., 2005. Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L.) cultivar "Oblica" detected using AFLP markers. 5th international symposium on olive growing, 27 september – 2 october 2004, Izmir (Turkiye). (IN PRESS).
- Taamalli W., Geuna F., Banfi R., bassi., Daoud D., Zarrouk M., 2006. Agronomic and molecular analyses for the characterization of accessions in Tunisian olive germoplasm

collections. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717- 3458, 2006 by Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso – Chile.

Tauz H., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 17 , 16: 6463-6471.

Tavanti G., 1819. Trattato teorico – pratico completo sull’olivo. Tomo I. Ed. Piatti. Firenze.

Testolin R, Lain O., 2005. DNA extraction from olive oil and PCR amplification of microsatellite markers. *J Food Sci*, 70:108-112

Testolin R., Cipriani G., Marrazzo T., Marconi R., Cimato A., 2000. Identificazione genetica delle varietà di olivo del Garda. *L’Inf. Agr.*, 35:71-76.

Toniolo A. R., 1914. La distribuzione dell’olivo e l’estensione della provincia climatica mediterranea nel Veneto occidentale. Estratto dalla Rivista Geografica Italiana, Ed. Firenze, anno XXI, Fascicoli I-II, III, IV.

Tournefort J. P., 1719. *Institutiones rei herbariae*. Ex Typographia Regia. Parisiis.

Trigui A., Msallem M., Yengui A., Belguith H., Khecherem J., Meliène A., Malek S., Bousselmi A., Samet A., Trabelsi E.B., 2002. *Oliviers de Tunisie: Catalogue des Variétés Autochtones & Types Locaux*. Ed. Reliure d’art. Sfax.

Trujillo I., Rallo L., Carbonell E.A., Asins M.J., 1989. Isoenzymatic variability of olive cultivars according to their origin. *Acta Hort.* Vol. 286, pp. 137 – 139.

UPOV, 1985. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability: olive. Ed. International union for the protection of new varieties of plants. Genève.

Varanini G. M., 2000. *Olio ed olivi del Garda veronese*. Verona.

Vicini E.P., 1931. *Registro della chiesa cattedrale di Modena*.

Wagner H.W. e Sefc K.M., 1999. *Identity 1.0: freeware program for the analysis of microsatellite data*. Vienna. <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>.

Watson J.D., Gilman M., Witkoschi J., Zoller M., 1998. *DNA Ricombinante*. Ed. Zanichelli. Bologna

Zamparutti P., 2004. L’inizio della piccola Era Glaciale, MTG News,

Ziliotto F., Barcaccia G., Baldoni L., Tonutti P., 2002. Identificazione e caratterizzazione di alcune cultivar di olivo. *L’Informatore Agrario*, 15: 115-118.

Zito F., 1932. Esame biometrico del nocciolo delle olive come base complementare di classificazione delle varietà. *L’Olivicoltore*, n° 24.

Zohary D., Spiegel-Roy P., 1975. Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187(4174): 319-327.

Zohary D., Spiegel-Roy P., 1994. Domestication of Plants in the Old World (second edition). Clarendon, Oxford. 279 pp.

Ringraziamenti

Ed è arrivato anche questo momento...

Innanzitutto ringrazio tutto il personale del Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, per avermi accolta in un ambiente familiare ed accogliente.

Ringrazio il Professor. Andrea Fabbri per avermi dato l'opportunità di fare questa esperienza e per avermi insegnato a muovere i primi passi in un campo, quello dell'arboricoltura, che non conoscevo e che mi ha veramente appassionata. Lo ringrazio anche per la fiducia che mi ha dimostrato in questi tre anni di dottorato.

Ringrazio il mio "piccolo gruppo di ricerca", con cui ho condiviso gioie e pene di questo lavoro o più semplicemente la vita quotidiana: grazie Tommaso, semplicemente indispensabile! Grazie per la disponibilità, la tua pazienza e per avermi insegnato così tanto...; grazie alle due dottorande Rossella e Linda, per tutti i momenti belli passati assieme. E grazie, anche, a tutti tesisti e soprattutto alla mia "prima tesista", Virgi finalmente abbiamo finito di fare delle amplificazioni!

Ringrazio con tanto affetto Manu, Matteo, Anna, Luisa, Renato, Enrico, Alessandro, Anna M.C. Corrado, Roberto, sempre disponibili e pronti ad ogni tipo di consiglio; grazie soprattutto perchè mi avete fatto conoscere il meraviglioso mondo della botanica.

Ringrazio tutti coloro con cui ho collaborato durante questi tre anni; ringrazio la Dott.ssa Angelina Belaj, per avermi accolto con affetto e fatto sentire parte del suo gruppo di ricerca a Codoba; la Dott.ssa Rachele Messina e la Dott.ssa Tania Bracci per tutti i consigli on-line.

Infine ringrazio con profonda gratitudine i miei genitori, per il loro sostegno, la loro pazienza e per l'affetto che mi dimostrano ogni giorno; la mia sorellina, che porta ovunque allegria e spensieratezza; e per ultimo ringrazio Luca, che più di tutti ha creduto in me e nelle "mie capacità"; Grazie per avermi trasmesso l'entusiasmo per la ricerca, e per essere "il mio immenso valore aggiunto".