

CARATTERIZZAZIONE DI GENOTIPI DI OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) PER MEZZO DI MARCATORI MOLECOLARI SSR E RAPD

IDENTIFICATION OF OLIVE (*OLEA EUROPAEA* L.) GENOTYPES USING SSR AND RAPD MARKERS

La Mantia M.⁽¹⁾, Guerin J.⁽²⁾, Sedgley M.⁽²⁾ e Barone E.⁽¹⁾

(1) Dipartimento di Colture Arboree, Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze, 11 - Palermo

(2) School of Agriculture and Wine, University of Adelaide, PMB1 Glen Osmond, 5064 South Australia

Parole Chiave: Risorse genetiche, identificazione varietale, DNA

Additional key words: *Genetic Resources, varietal identification, DNA fingerprinting*

Abstract

*SSR and RAPD markers were used to identify DNA fingerprints of 100 accessions of olive trees (*Olea europaea* L.) from the National Olive Variety Assessment (NOVA) collection of the University of Adelaide, (Australia). The markers were compared for their ability to discriminate between genotypes and their level of polymorphism per marker. The results were similar for both types of markers, and it was shown that several cultivars in the collection had similar genotypes. However, with SSRs were identified more genotypes than with RAPD. The DNA fingerprints collected have been used for the construction of a genetic database that was used to identify eight out of ten presumed Mission olive cultivars from the USA.*

Introduzione

L'olivo (*Olea europaea* L.), è una specie prevalentemente allogama con livelli considerevoli di eterozigosi e polimorfismo genetico tra gli individui (Angiolillo et al., 1999; Rallo et al., 2000). L'ampio patrimonio genetico e l'elevato numero di sinonimie e omonimie richiedono metodi precisi di discriminazione. Molteplici tecniche basate su caratterizzazioni morfo-agronomiche e biochimiche sono state largamente impiegate nello studio della variabilità (Barone et al., 1994; Trujillo et al., 1995). L'introduzione di marcatori molecolari ha fornito un buon sistema di discriminazione, indipendente dalle condizioni ambientali. I RAPD sono stati adottati con successo per la caratterizzazione di cultivar di olivo. (Belaj et al., 2001; Guerin et al., 2002; Mekuria et al., 1999). Oggi, gli SSR si sono dimostrati i marcatori molecolari più idonei alla identificazione e discriminazione di cultivar di olivo, essendo questi trasferibili, altamente polimorfici e co-dominanti (Carriero et al., 2002; Cipriani et al., 2002; Rallo et al., 2000). Gli obiettivi del presente lavoro sono: (1) identificare per mezzo di marcatori SSR e RAPD i profili di DNA di 100 accessioni di olivo; (2) confrontare i suddetti marcatori per il loro potere di discriminare fra i genotipi; (3) verificare l'identità di cultivar di olivo adottando un database di profili di DNA.

Materiale e metodo

Materiale vegetale e estrazione del DNA. Tutti i campioni sono stati prelevati dal campo di collezione NOVA (National Olive Variety Assessment) dell'Università di Adelaide (Australia). Dieci campioni presunti della cv. Mission sono stati raccolti da piante coltivate negli USA. Il DNA genomico totale è stato isolato da foglie fresche seguendo il protocollo precedentemente descritto da Guerin et al. (2002).

Analisi RAPD. Sono stati usati 4 primer random: GC01, GC05, OPZ11 e GC18. Le amplificazioni dei RAPD e l'identificazione delle cultivar NOVA sono state eseguite come riportato da Guerin et al. (2002).

Analisi SSR. Le analisi hanno interessato 9 coppie di primer SSR: UDO-006, UDO-008, UDO-024, UDO-031 (Cipriani et al., 2002), EMO-2 (De La Rosa et al., 2002), SSR-3, -4, -14 e -16 (Sefc et al., 2000). I primer forward erano marcati con sostanze fluorescenti, FAM, NED e HEX. Le

amplificazioni sono state eseguite adottando il seguente profilo: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min, 34 cicli di 45 s a 95°C, 45 s alla temperatura di ibridazione, tipica per ciascuna coppia di primer (da 50 a 57°C), 45 s at 72°C, e una fase finale di estensione di 45 min a 72°C. I prodotti ottenuti dalla PCR sono stati prima verificati per mezzo di gel di agarosio (1,75%) e poi analizzati al sequenziatore automatico (96 capillary ABI Prism 3700 DNA Analyser - Appl. Biosys., USA). I risultati sono stati interpretati per mezzo del software Genscan 3.5.1 e la presenza o l'assenza di alleli tradotta in matrice binaria assegnando 1 o 0 alla presenza o all'assenza di alleli, rispettivamente. Utilizzando SIMQUAL è stato possibile calcolare una matrice di similarità tra le accessioni, l'analisi dei cluster è stata eseguita con il metodo UPGMA e l'algoritmo SHAN, i raggruppamenti risultanti espressi mediante un dendrogramma ottenuto con NTSYS-pc (Exeter Software v.2.02k).

Identificazione dei campioni di Mission. Dieci presunti campioni della cv. Mission sono stati identificati usando il database genetico costituito dai profili di DNA della collezione NOVA. Sono stati testati 6 microsatelliti: UDO-006, UDO-008, UDO-031, EMO-2, SSR-3 e SSR-16. Il metodo UPGMA ha poi permesso di rappresentare le similarità genetiche attraverso un dendrogramma.

Risultati

RAPD e SSR. Entrambi, RAPD e SSR, si sono dimostrati altamente efficienti nel discriminare le 100 cultivar NOVA esaminate. I quattro primer RAPD, come riportato da Guerin e coll. (2002), hanno generato 26 bande polimorfiche che hanno permesso di caratterizzare 58 differenti genotipi. Nella collezione NOVA sono stati riscontrati 15 gruppi, ciascuno dei quali contenente sinonimi. Otto di questi gruppi sono stati identificati essendo geneticamente uguali a cultivar note provenienti da collezioni internazionali, mentre non è stato possibile identificare i rimanenti sette gruppi.

Tutti e nove i marcatori microsatelliti sono risultati polimorfici, rivelando un totale di 64 alleli, in un intervallo variabile da 4 a 10 alleli per locus, con una media di 7,1 alleli per locus. Il dendrogramma ottenuto con gli SSR (Fig. 1) è risultato simile a quello ottenuto con i RAPD. Tuttavia, le cv. Pueblana, WA Mission, Paragon e Bouteillon che con i RAPD avevano prodotto lo stesso profilo della cv. Frantoio sono state differenziate con gli SSR; Paragon, comunque, è risultata ancora uguale a Bouteillon; la cv Gros Reddeneau che con i RAPD mostrava lo stesso genotipo di altre 4 accessioni è stata differenziata con gli SSR.

Identificazione di Mission. Dopo aver confrontato i genotipi dei Mission col database, sono stati individuati gruppi geneticamente uguali, (Fig. 2): i campioni nel gruppo 1 sono risultati uguali tra loro e alla cv. Manzanillo da Cordoba, (SP); quelli nel gruppo 2 uguali tra loro e alla cv. Mission da UC Davis, USA; il campione da San Louis (gruppo 3) ha mostrato lo stesso genotipo della cv. Nevadillo Blanco da UC Davis; infine, San Diego "AB" e San Francisco Solano 3 non coincidevano con alcuno degli altri genotipi.

Conclusioni

La natura co-dominante dei marcatori SSR ha permesso la discriminazione di un maggior numero di genotipi, come dimostrato in altri lavori (Belaj et al., 2003; Powel et al., 1996). I profili di DNA raccolti dalla collezione NOVA e impiegati per la realizzazione di un database genetico, hanno consentito di identificare otto dei dieci presunti campioni della cv. Mission.

Ringraziamenti

Ringraziamo Susan Sweeney del PIRSA (Primary Industries and Resources S. Australia) per l'accesso al NOVA; Bill Krueger, dell'UCCE Glenn County USA, e i membri del Mission Olive Preservation, Restoration and Education Project per avere fornito i campioni della cultivar Mission.

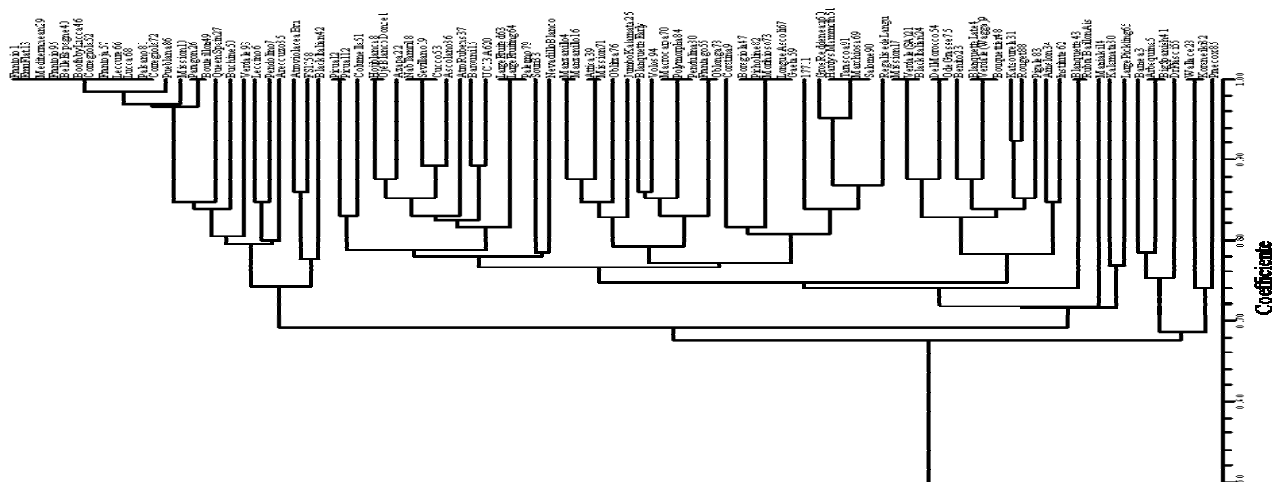


Fig. 1 Dendrogramma di similarità tra le 100 accessioni della collezione NOVA, usando 9 marcatori SSR.

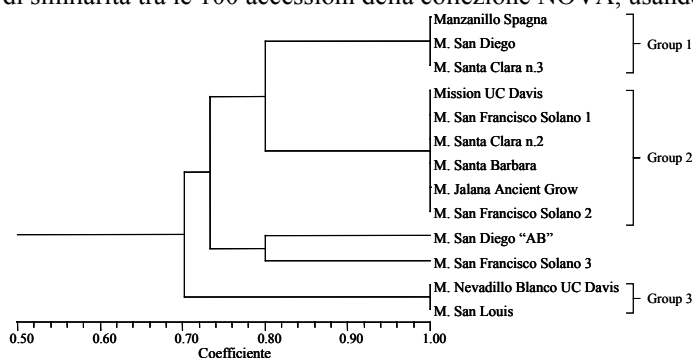


Fig. 2 Dendrogramma di similarità tra i dieci presunti campioni della cultivar Mission e le cultivar Manzanillo (Spagna), Mission (UC Davis) e Nevadillo Blanco (UC Davis).

Bibliografia

- Angiolillo A., Mencuccini M. and Baldoni L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 98:411-421.
- Barone E., Di Marco L., Motisi A. and T. Caruso (1994). The Sicilian olive germplasm and its characterization by using statistical methods. *Acta Horticulturae* 356:66-69.
- Belaj A., Trujillo I., Rosa R.D.L. and 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.
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L. and Trujillo I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor. Appl. Genet.* 107: 736-744.
- 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.
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A. and 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.
- De La Rosa R., James C.M. and Tobutt K.R. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes* 2:265-267.
- 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.
- 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.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. and Rafalski A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2:225-238
- Rallo P., Dorado G. and Martin A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101:984-989.
- 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.
- Trujillo I., Rallo L. and Arus P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:318-324.