

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

---

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

**Identificazione di possibili sofisticazioni in preparati commerciali  
di Origano Mediterraneo ed analisi genetica di *Origanum* spp.  
mediante marcatori molecolari genomici:  
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e  
Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Marcello Tomaselli**

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Renato Bruni**

**Cotutor:**

**Chiar.ma Prof.ssa Anna Torelli**

**Dottorando: Matteo Marieschi**

**2010**



*Alla mia famiglia*



# INDICE

<b>Premessa</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Il genere <i>Origanum</i></b>	<b>3</b>
1.1.1 Morfologia	3
1.1.2 Tassonomia	7
1.1.3 Caratteristiche chimiche. L'olio essenziale	11
<b>1.2 La droga Origano</b>	<b>14</b>
1.2.1 Sistematica	14
1.2.2 Cenni storici e d'impiego	15
1.2.3 Importanza dell'origano	16
<b>1.3 Analisi qualitativa delle droghe vegetali</b>	<b>20</b>
1.3.1 Approccio classico: le analisi strutturali	21
1.3.2 Analisi chimiche	24
1.3.3 Analisi ultrastrutturali	25
<b>1.4 Marcatori molecolari genomici</b>	<b>26</b>
1.4.1 Tecniche basate sull'ibridazione	27
1.4.2 Tecniche basate su amplificazione PCR	28
<b>2 SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>37</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Materiale vegetale</b>	<b>39</b>
3.1.1 Reperimento dei campioni di Origano Mediterraneo	39
3.1.2 Reperimento delle accessioni del genere <i>Origanum</i> e allestimento di un campo collezione	39
3.1.3 Elenco delle specie vegetali reperite, non appartenenti al genere <i>Origanum</i>	42
3.1.4 Campionamento delle specie vegetali fresche	42
<b>3.2 Analisi farmacognostica</b>	<b>43</b>

<b>3.3 Estrazione del DNA genomico</b>	<b>43</b>
3.3.1 Protocollo A	44
3.3.2 Protocollo B	45
3.3.3 Protocollo C	47
3.3.4 Protocollo D	48
3.3.5 Protocollo E	49
<b>3.4 Analisi del DNA genomico</b>	<b>51</b>
3.4.1 Quantificazione spettrofotometrica del DNA genomico	51
3.4.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA genomico mediante gel di agarosio	51
<b>3.5 Elettroforesi su gel di agarosio non denaturante per DNA</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Amplificazione PCR-RAPD</b>	<b>52</b>
<b>3.7 Tecniche preliminari alla conversione in marcatori genomici     SCAR delle bande specifiche individuate attraverso analisi     comparativa dei profili di amplificazione RAPD</b>	<b>54</b>
3.7.1 Eluizione da gel di agarosio	54
3.7.2 Reazione di ligasi nel vettore di clonaggio pGEM-T-Easy®	54
3.7.4 Preparazione cellule competenti per elettroporazione	54
3.7.5 Trasformazione batterica tramite elettroporazione	55
3.7.6 Amplificazione PCR-Colony	56
3.7.7 Reazione di sequenziamento	57
3.7.8 Programmi informatici di analisi di sequenza nucleotidica	58
<b>3.8 Amplificazione PCR-SCAR</b>	<b>59</b>
<b>3.9 Estrazione ed analisi degli oli essenziali</b>	<b>60</b>
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Estrazione del DNA genomico</b>	<b>63</b>
4.1.1 Protocollo A	65
4.1.2 Protocollo B	67
4.1.3 Protocollo C	68

4.1.4 Protocollo D	69
4.1.5 Protocollo E	70
4.1.6 Purificazione aggiuntiva del DNA non direttamente amplificabile	72
<b>4.2 Analisi PCR-RAPD</b>	<b>73</b>
4.2.1 Scelta dei marcatori RAPD per i contaminanti del gruppo I	74
4.2.2 Sensibilità dei marcatori RAPD	77
4.2.3 Validazione dei marcatori RAPD	81
4.2.4 Scelta dei marcatori RAPD per i contaminanti del gruppo II	82
<b>4.3 Sviluppo dei marcatori molecolari genomici SCAR</b>	<b>87</b>
4.3.1 Isolamento e sequenziamento dei marcatori RAPD contaminante specifici e costruzione dei primer SCAR corrispondenti	87
4.3.2 Saggi di specificità, sensibilità e validazione dei marcatori SCAR selezionati	92
4.3.2 <i>Olea europea</i>	101
<b>4.4 Amplificazione PCR-SCAR con additivi</b>	<b>104</b>
<b>4.5 Analisi degli oli essenziali</b>	<b>110</b>
<b>5 CONCLUSIONI</b>	<b>121</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>123</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>141</b>



## PREMESSA

Un'indagine farmacognostica, compiuta negli anni 2001-2007, su 84 campioni di Origano Mediterraneo introdotti sul mercato europeo in forma di droga frantumata, effettuata in ottemperanza alle specifiche indicate dalla Farmacopea Europea (Ph. Eur.), ha permesso di rilevare numerose e pesanti adulterazioni con specie vegetali differenti dalle specie regolamentari *Origanum vulgare* L. e *Origanum onites* L.

Come riassunto nella **tabella 1**, solo il 9.5% dei campioni analizzati è risultato in linea con le indicazioni della Ph. Eur. (purezza superiore al 98% p/p), e anche considerando un intervallo meno stringente (purezza superiore al 95% p/p), solo il 27.4% è risultato conforme.

I contaminanti vegetali individuati attraverso saggio microscopico sono stati suddivisi in due gruppi, principalmente in base alla distanza tassonomica che li separa dalla droga in esame, indicativa anche della differenza fitochimica ed organolettica:

- Gruppo I. Costituito da *Cistus incanus* (Cistaceae), *Rubus* sp (Rosaceae). e *Rhus* sp. [Sumac] (Anacardiaceae). Individuati nel 16.7% dei campioni. Sono specie vegetali da considerarsi quasi prive di olio essenziale e pertanto non individuabili tramite una semplice analisi gascromatografica.
- Gruppo II. Costituito da *Origanum majorana* e *Satureja montana*. Rilevate nell'88.1% dei campioni analizzati. Sono piante aromatiche, ricche in oli essenziali e appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae. La loro fragranza può essere confusa da un operatore inesperto o adeguatamente celata anche a personale esperto a causa della somiglianza con quella tipica dell'origano. In termini organolettici e fitochimici la loro distanza dall'origano può non essere particolarmente elevata.

La maggior parte dei campioni di Origano Mediterraneo analizzati è risultata contenere più di una specie vegetale contaminante, tra queste *Origanum majorana*, è risultata presente nel 48.8% dei campioni con una percentuale p/p di contaminazione compresa tra l'1.3 e il 95.2%, e *Satureja montana* nel 77.4% dei campioni, per valori compresi tra l'1.2 e il 76.9% (p/p).

In circa il 5% dei campioni è stato individuato *Cistus incanus* (valori p/p compresi tra l'8.9 e il 52.1%), nell'8% dei campioni è risultato presente *Rhus* sp. (tra l'1.0 e l'83.0% p/p), mentre nel 5% dei campioni analizzati è stato individuato *Rubus* sp. (tra l'1.0 e il 57.8% p/p). E'

## Premessa

plausibile che una diluizione della matrice originale con differenti tipologie di adulteranti sia effettuata al fine di renderne meno agevole l'individuazione.

**Tabella 1.** Analisi microscopica farmacognostica di campioni di Origano Mediterraneo (n=84) e determinazione dei contaminanti vegetali presenti. La maggior parte dei campioni presenta più di un contaminante, ogni valore riportato è riferito ad ogni singola specie individuata.

<b>Purezza</b> (% p/p)	<b>Specie vegetali</b> <b>identificate</b>	<b>n° di campioni</b>	<b>Min – Max</b> (% p/p)
>98 <sup>a</sup>	Origano Mediterraneo <sup>b</sup>	8 (9.5%) <sup>c</sup>	
>95	Origano Mediterraneo	23 (27.4%)	
<b>Contaminazione</b>			<b>Min – Max</b> (% p/p)
<b>Gruppo I</b> <sup>d</sup> (16.7%) <sup>c</sup>	<i>Cistus incanus</i>	4 (4.8%)	8.9 - 52.1
	<i>Rhus</i> sp.	7 (8.3%)	1.0 - 83.0
	<i>Rubus</i> sp.	4 (4.8%)	1.0 - 57.8
<b>Gruppo II</b> <sup>e</sup> (88.1%)	<i>Satureja montana</i>	65 (77.4%)	1.2 - 76.9
	<i>Origanum majorana</i>	41 (48.8%)	1.3 - 95.2
	Altre Lamiaceae	10 (11.9%)	1.7 - 13.1

a = Valore conforme alle specifiche della Farmacopea Europea (Ph. Eur.);

b = *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* e/o *Origanum onites* in conformità a Ph. Eur.

c = Tra parentesi: percentuale di campioni;

d = Vegetali privi di olio essenziale o di un profilo chimico caratterizzato;

e = Vegetali con aroma simile a origano.

Le percentuali rilevate di contaminanti del gruppo I sono indice di una frode molto grave perpetrata ai danni dei consumatori così come degli operatori onesti del mercato alimentare ed erboristico, che si trovano costretti a richiedere l'intervento di personale altamente specializzato per effettuare lunghi e dispendiosi controlli farmacognostici del materiale che ritengono dubbio.

La presenza, all'interno di un lotto di origano a destinazione alimentare, di tracce di maggiorana o santoreggia, rappresenta una sofisticazione parzialmente tollerata in termini di legge, in quanto piante appartenenti alla stessa famiglia o genere, aventi un certo valore commerciale. Le differenze di composizione degli oli essenziali di queste tre specie sono comunque tali da pregiudicare pesantemente la qualità della fragranza di origano, oltre a

costituire un vantaggio illecito ed una concorrenza sleale nella fase di contrattazione di mercato, spesso basata sulla competitività del prezzo all'ingrosso. La sofisticazione risulta invece più grave se riferita al confezionamento di un preparato erboristico, per il quale esclusivamente l'utilizzo della sola droga indicata in etichetta e non di una miscela di questa con altre dotate di simili componenti, è indice di elevata qualità e riproducibilità terapeutica. I termini di legge fissano comunque ad un massimo del 2% la presenza di eventuali contaminanti in un preparato, a prescindere dalla loro origine botanica (Ph. Eur.).



# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Il genere *Origanum*

### 1.1.1 Morfologia

Il genere *Origanum* (dal Greco: οροξ = montagna e γαροξ = ornamento) appartiene alla famiglia delle Lamiaceae ed è caratterizzato da un'ampia variabilità fenotipica sia morfologica che chimica. È costituito da piante erbacee perenni, spontanee in terreni calcarei e con steli eretti, alti fino a 1m, foglie picciolate e fiori disposti in spighe ovoidi od oblunghe, formanti infiorescenze a pannocchia o a corimbo. Le foglie sono piccole, ovali, intere, opposte e tomentose, in genere picciolate e con margine seghettato, le fiorali sono ridotte allo stato di brattee. Possono differire per grandezza, forma, spessore così come per densità e tipo di tricomi su di esse.

I peli ghiandolari sono numerosi sugli organi vegetativi, in particolare sulla pagina superiore delle foglie, e meno densi in quelli riproduttivi. Secernono un olio essenziale che è il principale motivo di interesse del genere da un punto di vista alimentare ed erboristico.

In *Origanum* sono state individuate tre tipologie distinte di tricomi ghiandolari (Werker *et al.*, 1985a e 1985b):

1. Peli peltati, composti da una testa di 12 cellule che poggia su di uno stelo e una base unicellulare, circondati da una struttura peribasale formata da 12-18 cellule epidermiche. Essi secernono la maggiore parte dell'olio essenziale prodotto dalla pianta.
2. Peli capitati di Tipo I, formati da una testa composta da una sola cellula di tipo secretorio che poggia su di uno stelo unicellulare e una sola cellula basale.
3. Peli capitati di Tipo II, simili al tipo I, ma dotati di una cellula intermedia tra lo stelo e la cellula basale.

I peli non ghiandolari sono pluricellulari, generalmente falcati e filiformi, composti principalmente da 4-7 cellule, sono numerosi in tutta la parte aerea della pianta e principalmente sulle nervature della pagina inferiore delle foglie.

Le strutture stomatiche sono di tipo diacitico, ovvero le cellule di guardia sono accompagnate da due cellule sussidiarie annesse longitudinalmente (formanti un angolo retto con l'asse maggiore dello stoma).

## **Introduzione**

I fiori, ermafroditi e zigomorfi, sono distribuiti in verticilli che contengono di norma due unità anche se raramente se ne possono trovare da sei a dieci. I verticilli sono raggruppati in spighe oblunghe, compatte e solitarie; talvolta in corimbi o pannocchie alla sommità dei rami. Le brattee possono presentarsi colorate in viola rossastro, in questo caso sono più ampie dei sepali che formano un calice persistente, oppure possono essere di colore verde ed allora saranno più piccole di esso. Il calice può essere attinomorfo o zigomorfo, principalmente di tipo ovale o campanulato con dieci o tredici nervi e cinque denti oppure bilabiato con il labbro superiore dilatato e quello inferiore appena visibile. La corolla è di colore variabile dal bianco al rosaceo in funzione della specie o della cultivar, di tipo bilabiato, con tubo dritto incluso o estroflesso dal calice e fauce gradatamente ampliata. Gli stami sono quattro, divergenti all'apice, inclusi o sporgenti dal tubo; l'ovario è supero e quadripartito a logge ovate e rotonde all'apice; lo stilo è semplice e centrale, più lungo degli stami ed è caduco.

I frutti sono disposti in quattro acheni liberi, ovoidi, glabri e lisci.

Il fusto è pubescente ed ha una sezione quadrangolare, come in tutte le piante della famiglia delle Lamiaceae.



*Origanum vulgare* L.

### 1.1.2 Tassonomia

A seguito della revisione tassonomica effettuata da Ietswaart nel 1980, il genere risulta diviso in 3 gruppi, 10 sezioni, costituite a loro volta da 42 specie o 49 taxa (specie, sottospecie e varietà) dei quali è indicato anche l'areale di distribuzione.

I gruppi sono:

A – Calice 1-2 labiato, piuttosto largo e lungo 4-12mm. Brattee larghe, lunghe 4-25mm, membranose, generalmente porpora e raramente verdi-giallastre, più o meno glabre. È suddiviso nelle sezioni *Amaracus*, *Anatolicon*, *Brevifilamentum* e *Longitubus*.

## **Introduzione**

B – Calice generalmente piccolo, 1-2 labiato, lungo 1.3-3.5mm. Le brattee sono piccole, 1-5mm, simili alle foglie per struttura e colore, più o meno tomentose. Include le sezioni *Chilocalyx* e *Majorana*.

C – Calice con 5 denti (sub)uguali. Costituito dalle sezioni *Campanulaticalyx*, *Elongataspica*, *Origanum* e *Prolaticorolla*.

Le sezioni:

### I. Sezione *Amaracus* (Gleditsch) Bentham

Costituito da 7 specie, ristrette al Mediterraneo orientale, che hanno in genere brattee porpora, calice 1-2 labiato non dentato e corolla saccata.

1. *O. boissieri* Ietswaart (Turchia)
2. *O. calcaratum* Jussieu (Grecia)
3. *O. cordifolium* Vogel (Cipro)
4. *O. dictamnus* L. (Creta)
5. *O. saccatum* Davis (Turchia)
6. *O. solymicum* Davis (Turchia)
7. *O. symes* Carlström (Grecia)

### II. Sezione *Anatolicon* Bentham

Comprende 8 specie, distribuite in aree ristrette, con calice fortemente bilabiato con 5 denti.

1. *O. akhdarensis* Ietswaart et Boulos (Libia)
2. *O. cyrenaicum* Beguinot et Vaccari (Libia)
3. *O. hypericifolium* Schwarz et Davis (Turchia)
4. *O. libanoticum* Boissier (Libano)
5. *O. scabrum* Boissier et Heldreich (Grecia)
6. *O. sipyleum* L. (Grecia, Turchia)
7. *O. vetteri* Briquet et Barbey (Grecia)
8. *O. pampaninii* Ietswaart (Libia)

### III. Sezione *Brevifilamentum* Ietswaart

La sezione comprende 6 specie endemiche della Turchia, caratterizzate da calice bilabiato e lunghezza fortemente ineguale degli stami, i superiori sono nascosti nella corolla.

1. *O. acutidens* Ietswaart (Turchia)

2. *O. bargyli* Mouterde (Siria, Turchia)
3. *O. brevidens* Dinsmore (Turchia)
4. *O. haussknechtii* Boissier (Turchia)
5. *O. leptocladum* Boissier (Turchia)
6. *O. rotundifolium* Boissier (Turchia)

IV. Sezione *Longitubus* Ietswaart

Un'unica specie ritrovata sul monte Amanus in Turchia. Ha un calice leggermente bilabiato e filamenti staminali molto brevi.

1. *O. amanum* Post (Turchia)

V. Sezione *Chilocalyx* Ietswaart

Quattro specie che sono limitate all'Anatolia del Sud e a Creta. Leggermente bilabiate e con gola del calice densamente tomentosa.

1. *O. bigleri* Davis (Turchia)
2. *O. micranthum* Vogel (Turchia)
3. *O. microphyllum* Vogel (Creta)
4. *O. minutiflorum* Schwarz et Davis (Turchia)

VI. Sezione *Majorana* Bentham

Costituita da 3 specie caratterizzate da calice 1-labiato e brattee verdi. Tra esse *O. siriacum* è suddiviso in 3 varietà separate geograficamente e distinguibili prevalentemente per *indumentum* e forma delle foglie.

1. *O. majorana* L. (nativa di Cipro e Turchia e diffusa in tutto il bacino del Mediterraneo)
2. *O. onites* L. (Grecia, Sicilia, Turchia)
3. *O. siriacum* L. var. *siriacum* (Israele, Giordania, Siria)
4. var. *bevanii* Ietswaart (Cipro, Siria, Turchia, Libano)
5. var. *sinaicum* Ietswaart (penisola del Sinai)

VII. Sezione *Campanulicalyx* Ietswaart

Sei specie. Il calice ha 5 denti uguali ed è campanulato (anche quando contiene i frutti).

1. *O. dayi* Post (Israele)
2. *O. isthmicum* Danin (Nord Sinai)
3. *O. ramonense* Danin (Israele)

## **Introduzione**

4. *O. petraeum* Danin (Giordania)
5. *O. punonense* Danin (Giordania)
6. *O. giordaniaicum* Danin & Künne (Giordania)

### VIII. Sezione *Elongatispica* Ietswaart

Comprende 3 specie endemiche del Nord Africa caratterizzate da spighe lasse e rade con calici tubolare con 5 denti uguali.

1. *O. elongatum* Emberger et Maire (Marocco)
2. *O. floribundum* Munby (Algeria)
3. *O. grosii* Pau et Font Quer ex Ietswaart (Marocco)

### IX. Sezione *Origanum*

È una sezione monospecifica della specie *O. vulgare*, ampiamente distribuita in Asia, Europa e Africa e introdotta dall'uomo in Nord America (Ietswaart 1980). Gli individui della specie hanno spighe dense e calici tubolari con 5 denti. Si distinguono 6 sottospecie in base alle differenze nell'*indumentum*, numero di ghiandole su foglie, brattee e calici, taglia e colore di brattee e fiori. Le 3 subspecie che si localizzano più a Sud sono ricche in oli essenziali, mentre quelle distribuite a Nord ne contengono in genere pochi.

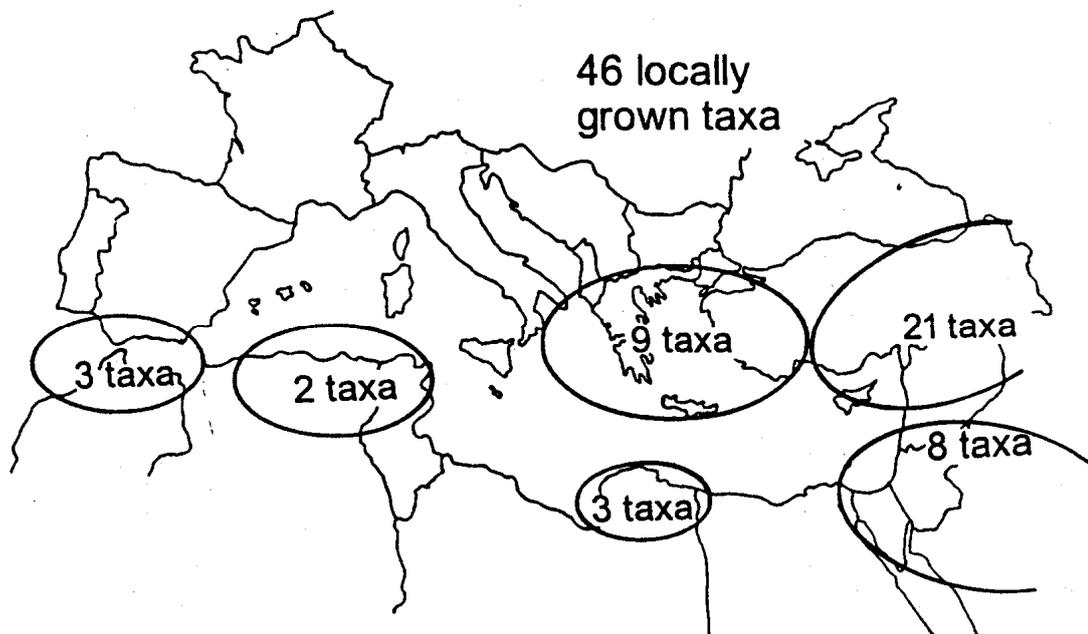
1. *O. vulgare* L. subsp. *vulgare* (Europa, Iran, India, Cina)
2. *O. vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart (Algeria, Tunisia)
3. *O. vulgare* L. subsp. *gracile* (Koch) Ietswaart (Afganistan, Iran, Turchia, URSS)
4. *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart [sin: *O. heracleoticum* auct. non L.] (Albania, Croazia, Grecia, Turchia)
5. *O. vulgare* L. subsp. *viridulum* Nyman [sin: *O. vulgare* L. subsp. *viride* Hayek; *O. heracleoticum* L.] (Afganistan, Cina, Croazia, Francia, Grecia, India, Iran, Italia, Pakistan)
6. *O. vulgare* L. subsp. *virens* (Hoffmannsegg & Link) Ietswaart (Azzorre, Baleari, Canarie, Madeira, Marocco, Portogallo, Spagna)

### X. Sezione *Prolaticorolla* Ietswaart

Comprende 3 specie, caratterizzate da spighe dense e calici tubolari che divengono turbinati quando portano i frutti.

1. *O. compactum* Benthham (Marocco, Spagna)
2. *O. ehrenbergii* Boissier (Libano)
3. *O. laevigatum* Boissier (Turchia)

Quarantasei dei 49 taxa del genere presentano una distribuzione molto localizzata in aree ristrette del bacino del Mediterraneo, soprattutto lungo le coste orientali ed africane (figura 1).



**Figura 1.** Distribuzione e numero dei taxa locali del genere *Origanum* nel bacino del Mediterraneo (Kokkini, 1996).

### 1.1.3 Caratteristiche chimiche. L'olio essenziale

Anche dal punto di vista fitochimico il genere *Origanum* è estremamente variabile. La pianta aromatica che viene commercializzata con il nome di origano è selezionata tra i taxa che producono oli essenziali ricchi in monoterpenoidi fenolici, generalmente carvacrolo, mentre con il nome di maggiorana si commercializzano gli appartenenti al genere che sono ricchi nei monoterpenoidi biciclici *cis*- e *trans*-sabinene idrato.

Nei taxa dove tra i componenti volatili dell'olio essenziale prevalgono carvacrolo e timolo si rilevano frequentemente altre molecole ad essi chimicamente correlate (i precursori  $\gamma$ -terpinene e *p*-cimene, ad es.), con le quali possono essere raggruppati nella categoria di composti 'tipo cimene'. Quando a prevalere sono invece *cis*- e *trans*-sabinene idrato, si riscontrano generalmente altre molecole assieme alle quali formano la categoria dei composti 'tipo sabinene' (sabineni idrati, sabinoli, tujene ecc.).

Oltre a questi gruppi di composti, negli oli essenziali del genere *Origanum*, possono essere presenti monoterpenoidi aciclici (geraniolo, linalolo, mirceni ecc.), composti 'tipo bornano'

## Introduzione

(canfene, canfora, borneolo ecc.) ed alcuni sesquiterpenoidi (cariofilleni, germacrene, humuleni, muuroleni, cadineni ecc.).

Nella **tabella 2** è riportata la distribuzione dei principali gruppi di composti volatili degli oli essenziali del genere *Origanum*, all'interno dei taxa individuati da Ietswaart (1980) (Skoula e Harborne, 2002).

**Tabella 2.** Distribuzione dei composti tipo cimene (Cim), sabinene (Sab), monoterpenoidi aciclici (Ac), tipo bornano (Bor) e sesquiterpeni (Sesq) rilevati negli oli essenziali, all'interno dei taxa del genere *Origanum* secondo la classificazione di Ietswaart.

Gruppo	Sezione	Taxon	Composti					Resa <sup>a</sup>
			Cim	Sab	Ac	Bor	Sesq	
A	<i>Amaracus</i>	<i>O. boissieri</i>	+++ <sup>b</sup>	+	-	-	+	Bassa
		<i>O. calcaratum</i>	+++	-	-	-	-	Bassa
		<i>O. cordifolium</i>	+++	-	-	-	+	Bassa
		<i>O. dictamus</i>	+++	+	-	-	+	Media
		<i>O. saccatum</i>	+++	-	-	-	-	Media
		<i>O. solymicum</i>	+++	-	-	-	-	Bassa
	<i>Anatolicon</i>	<i>O. hypericifolium</i>	+++	-	-	-	-	Bassa
		<i>O. libanoticum</i>	+++	-	-	-	++	Bassa
		<i>O. sipyleum</i>	+++	-	-	-	+	Bassa
	<i>Brevifilamentum</i>	<i>O. acutidens</i>	+++	-	-	-	-	Bassa
		<i>O. bargyli</i>	+++	-	+	++	+	Media
		<i>O. haussknechtii</i>	++	+	-	+	++	Bassa
		<i>O. leptocladum</i>	+++	-	-	++	-	Bassa
		<i>O. rotundifolium</i>	+	+++	++	+	++	Bassa
	B	<i>Chilocalyx</i>	<i>O. bilgeri</i>	+++	-	-	-	-
<i>O. micranthum</i>			+	+++	++	-	+	Media
<i>O. microphyllum</i>			+	+++	+	-	-	Media
<i>O. minutiflorum</i>			+++	-	-	-	-	Media
<i>Majorana</i>		<i>O. majorana I</i>	+	+++	+	-	-	Alta
		<i>O. majorana II</i>	+++	-	-	-	-	Alta
		<i>O. onites I</i>	+++	-	+	+	+	Alta
		<i>O. onites II</i>	-	-	+++	+	+	Alta
		<i>O. syriacum</i> var. <i>syriacum</i>	+++	-	-	-	-	Alta
		<i>O. syriacum</i> var. <i>bevanii</i>	+++	-	-	-	-	Alta
		<i>O. syriacum</i> var. <i>sinaicum</i>	+++	-	-	-	-	Alta
		C	<i>Campanulaticalyx</i>	<i>O. isthmicum</i>	+++	-	-	-
<i>O. ramonense</i>	++			++	+	+	-	Bassa
<i>Elongatispica</i>	<i>O. elongatum</i>		+++	-	-	-	-	Alta

	<i>O. floribundum</i>	+++	-	-	-	-	Alta	
<i>Origanum</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	+++	-	-	-	-	Alta	
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>gracile I</i>	+++	-	-	-	-	Media	
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>gracile II</i>	-	-	++	-	+++	Bassa	
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	+++	-	-	-	-	Alta	
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	-	-	+++	-	+++	Bassa	
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>viridulum I</i>	+++	-	-	-	-	Media	
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>viridulum II</i>	+	++	+++	-	+++	Bassa	
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	+	-	+++	-	+++	Bassa	
	<i>Prolaticorolla</i>	<i>O. compactum</i>	+++	-	-	-	-	Alta
		<i>O. laevigatum</i>	-	-	-	-	+++	Bassa

a = Resa in olio essenziale (% p/v): Bassa se <0.5%; Media se 0.5-2.0%; Alta se >2.0%;

b = Secondo la % (v/v) nell'olio essenziale: 5%< + <10%; 10%< ++ <30%; +++>30%;

c = Valore non rilevato.

(Skoula e Harborne, 2002).

Le sezioni più importanti all'interno del genere sono la sezione *Maggiorana* e la sezione *Origanum*. Entrambe includono i taxa del genere che producono la più alta resa in oli essenziali (**tabella 2**).

In particolare nella sezione *Maiorana* sono inclusi i taxa *O. majorana* L. e *O. onites* L., conosciuto anche come 'origano turco', mentre la sezione *Origanum* comprende la specie più diffusa e diversificata, *O. vulgare* L., la cui sottospecie *hirtum* Ietswaart, conosciuta anche con il nome di 'origano greco', è generalmente considerata il taxon che produce l'olio essenziale di miglior qualità commerciale (Calpouzou, 1954; Fleisher e Sneer, 1982; Fleisher e Fleisher, 1988; Lawrence, 1984).

La distribuzione dei componenti volatili degli oli essenziali non si sovrappone alla suddivisione tassonomica, infatti in *O. majorana* L. sono stati riscontrati prevalentemente linalolo, terpinene e sabinene (Fischer *et al.*, 1987), mentre l'olio essenziale di entrambi i taxa *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* e *O. onites* L., anche se appartenenti a sezioni differenti, è ricco in composti 'tipo cimene', in particolare i fenoli timolo e carvacrolo (Kokkini e Vokou, 1989; Kokkini *et al.*, 1991; Vokou *et al.*, 1993; Vokou *et al.*, 1988; Ruberto *et al.*, 1993).

Nel taxon più diffuso, *O. vulgare* subsp. *vulgare* L., generalmente povero in oli essenziali, sono stati rilevati principalmente monoterpenoidi aciclici e sesquiterpenoidi (Lawrence, 1984).

## Introduzione

### 1.2 La droga Origano

Secondo la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) possono essere commercializzati, con il nome di origano (*Origanum herba*), preparati erboristici ottenuti da foglie e fiori essiccati dei soli taxa *Origanum onites* L. e *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietswaart.

La droga anidra deve avere un contenuto minimo di olio essenziale di 25ml/kg e questo deve avere nella sua composizione un minimo del 1.5% (v/v) in carvacrolo e timolo.

Il materiale estraneo non deve superare la soglia del 2% (p/p).

#### 1.2.1 Sistematica:

*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietswaart:

Divisione Spermatophyta

Sottodivisione Angiospermae

Classe Dicotyledones

Ordine Lamiales

Famiglia Lamiaceae

Sottofamiglia Nepetoideae

Tribù Mentheae

Genere *Origanum*

Specie *Origanum vulgare* L.

Sottospecie *hirtum* Ietswaart

*Origanum onites* L.:

Divisione	Spermatophyta
Sottodivisione	Angiospermae
Classe	Dicotyledones
Ordine	Lamiales
Famiglia	Lamiaceae
Sottofamiglia	Nepetoideae
Tribù	Mentheae
Genere	<i>Origanum</i>
Specie	<i>Origanum onites</i> L.

**1.2.2 Cenni storici e d'impiego**

Il genere *Origanum*, soprattutto i taxa ricchi in olio essenziale, sono utilizzati come spezia da migliaia di anni nella tradizione alimentare e trova impiego anche nella medicina popolare, soprattutto all'interno dei maggiori areali di crescita (Baričević e Bartol, 2002). Nella Bibbia sotto il nome di 'issopo' e nella tradizione araba nella composizione del condimento *za'atar* è quasi sempre sottointesa una droga con alto contenuto in carvacrolo o timolo, riconducibile ai numerosi taxa del genere *Origanum* presenti nella regione mediorientale (Fleisher e Fleisher, 1988).

Nelle tradizioni mediche locali il genere ha avuto largo impiego, come ipoglicemizzante in Siria, come diuretico, stomachico ed espettorante in Iran, come digestivo ed anticarminativo in Grecia e a Cipro, proprietà queste ultime poi confermate da studi recenti (Yaniv *et al.*, 1988; Afsharypour *et al.*, 1997; Arnold *et al.*, 1993). In Turchia è utilizzato da lungo tempo contro i disturbi digestivi ed intestinali (Başer *et al.*, 1992) ed in India come astringente, diuretico, antiasmatico e antiparalitico (Yadava e Khare, 1995).

Anche in Europa, fin dal Medioevo, è considerato un'erba dotata di interessanti proprietà curative.

Secondo il 'Dizionario di fitoterapia e piante medicinali' (Campanini, 1998), l'origano è stomachico e antispasmodico, ha azione stimolante della funzionalità digestiva e svolge un'azione antisettica e antifermentativa a livello intestinale. Nella medicina popolare l'essenza di origano può servire per frizioni delle parti dolenti nei soggetti affetti da dolori

## **Introduzione**

reumatici, nevralgie e algie e i principi volatili contenuti nell'olio essenziale sono utili espettoranti in grado di alleviare le tosse secche particolarmente nel caso di fumatori abituali.

Oggi il principale ambito d'utilizzo dell'origano è sicuramente all'interno del mercato alimentare. È infatti conosciuto ed utilizzato in tutto il mondo come importante pianta aromatica, per sé, nei preparati di Origano Mediterraneo commercializzati in Europa e in America, o come ingrediente fondamentale di miscele di spezie di largo consumo nei mercati orientale ed africano. Oltre che per la sua fragranza, questa spezia deve probabilmente il suo successo anche alle proprietà antimicrobiche dell'olio essenziale ed antiossidanti della componente fenolica lipofila ed idrosolubile, che hanno garantito una migliore conservazione e sicurezza dei cibi in epoche storiche in cui i supporti tecnologici a sostegno delle filiere alimentari erano scarsi se non nulli. La sua capacità di prevenire l'irrancidimento ed aumentare la *shelf-life* dei cibi nei climi caldi in cui l'origano cresce è certamente uno dei motivi della sua grande diffusione attuale.

È in progressivo aumento anche l'interesse verso le attività biologiche e le proprietà farmacologiche dei suoi estratti, come dimostra la continua crescita del numero di studi in proposito.

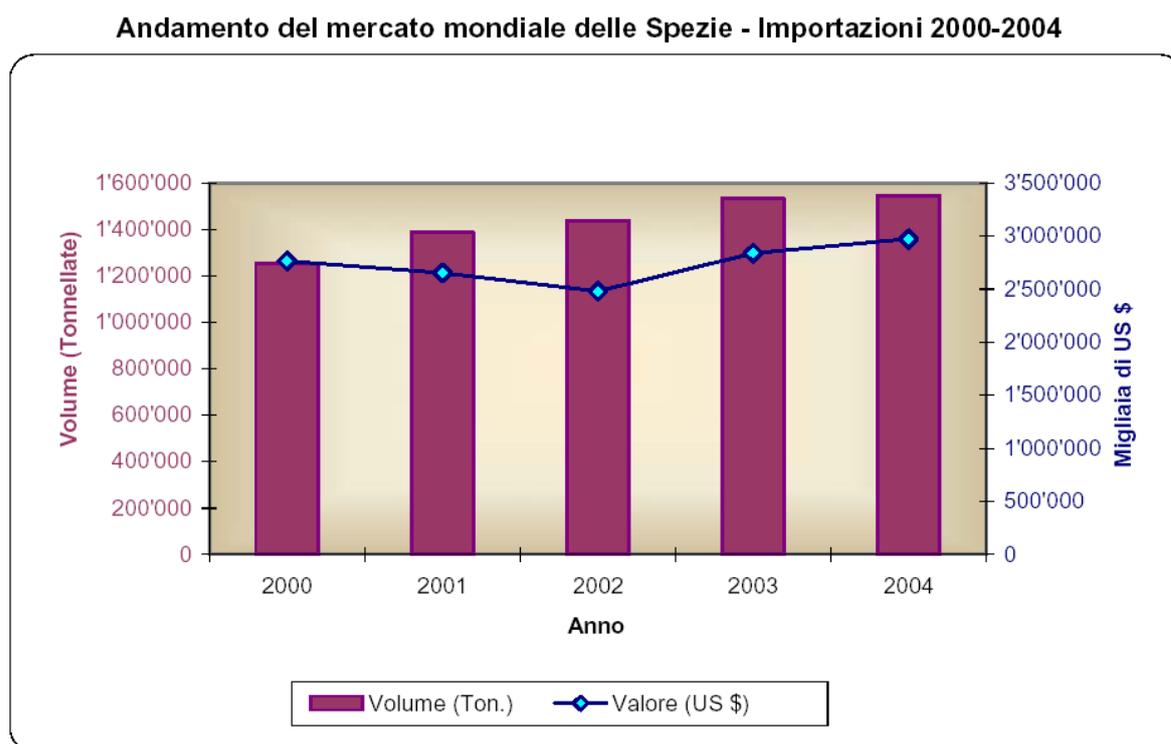
### **1.2.3 Importanza dell'origano**

#### **Industria alimentare**

Oggi l'origano, la porzione aerea del vegetale e i suoi estratti, è comunemente usato nell'industria alimentare per il suo aroma ed è considerato una delle più importanti spezie autoctone del bacino del Mediterraneo. (Carmo *et al.*, 1989; Başer *et al.*, 1992, 1993; Vokou *et al.*, 1988, 1993).

Nel mondo con il termine 'origano' vengono indicate numerose specie vegetali accomunate da un particolare profumo ed aroma generalmente attribuibile al composto fenolico carvacrolo. La maggior parte di esse proviene dalle due famiglie delle Lamiaceae e delle Verbenaceae e nel mercato della droga la distinzione più significativa è fra 'Origano Mediterraneo' riconducibile al genere *Origanum* e 'Origano Messicano' riconducibile al genere *Lippia* (Kintzios, 1996).

Secondo l'ultimo dato disponibile, riportato nel 2006 nell'informativa tecnica *'World Markets in the Spice Trade 2000-2004'* dall'International Trade Centre, il volume del mercato mondiale delle spezie nel 2004 ammonta a circa 1.55 milioni di tonnellate per un valore in dollari USA (US \$) di circa 2.97 miliardi, sottolineando un continuo incremento delle importazioni nei principali paesi consumatori, USA, Europa e Asia orientale (**figura 2**).



**Figura 2.** Andamento del mercato mondiale delle spezie. Volume delle importazioni, in tonnellate, e valore, in migliaia di dollari USA (US \$), negli anni 2000-2004 (Tratta da *'World Markets in the Spice Trade 2000-2004'*, 2006).

Nel caso specifico dell'origano, i dati pubblicati più completi sono del decennio precedente e si riferiscono al mercato USA, evidenziando per gli anni 1991-1995 un consumo di circa 6000 tonnellate annue (**tabella 3**). Messico e Turchia si attestano i maggiori paesi fornitori, rispettivamente di origano Messicano e Origano Mediterraneo (Olivier, 1996).

## Introduzione

**Tabella 3.** Quantità di origano (entrambi i generi *Origanum* e *Lippia*) importata negli Stati Uniti nel periodo 1991-1995, in tonnellate (ton), suddivisa in anni e per paesi fornitori.

Fornitori	Importazioni di origano USA (ton)				
	1991	1992	1993	1994	1995
Messico	2186	1558	2080	2009	2100
Turchia	2731	2411	2717	3588	3392
Grecia	440	272	321	401	139
Israele	267	192	144	247	168
Marocco	171	32	72	100	140
Altri	340	204	595	350	156
<b>Totale</b>	<b>6135</b>	<b>4669</b>	<b>5929</b>	<b>6695</b>	<b>6095</b>

(Olivier, 1996).

Nel 1999 venivano importate negli Stati Uniti circa 7000 tonnellate di droga, per un valore di circa 14.6 milioni di US \$, indicando un incremento dei consumi. Di questa quantità, il 64% era proveniente dalla Turchia e il 27% dal Messico (Tainter e Grenis, 2001).

### Attività biologica e farmacologica

Il numero di pubblicazioni che riportano le attività biologiche del genere *Origanum* è ampio e diversificato.

#### Attività antifungina

I taxa ricchi in fenoli hanno riconosciute proprietà antifungine (Daouk *et al.*, 1995; Muller-Riebau *et al.*, 1995; Tsao e Zhou, 2000; Sokovic *et al.*, 2002; Bouchra *et al.*, 2003; Daferera *et al.*, 2003; Sokmen *et al.*, 2004; Kizil e Uyar, 2006; Soyly *et al.*, 2006; Esen *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Bendahou *et al.*, 2008). Carvacrolo e timolo sembrano alterare la struttura delle ife fungine e la loro aggregazione, riducendone lo spessore e lisandone la parete (Thompson, 1996; Soyly *et al.*, 2006, 2007).

### Attività antibatterica

L'origano ha forti attività antibatteriche contro *Erwinia amylovora* (Scortichini e Rossi, 1989, 1993) e diversi altri microrganismi sia Gram-positivi che Gram-negativi come *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* (Biondi *et al.*, 1993). È riportata l'attività degli oli essenziali contro la proliferazione batterica di *Campylobacter jejuni* e *Clostridium sporogenes* (Paster *et al.*, 1990,1995; Shaaya *et al.*, 1991), *Clostridium botulinum* (Ismaiel, 1988), *Phytophthora citrophthora*, *Phoma tracheiphila* e *Pseudomonas syringae* (Arras, 1988). Il ruolo fondamentale anche in questa attività è prevalentemente giocato dal carvacrolo (Colin *et al.*, 1989), a sostegno del legame tra bioattività ed uso tradizionale elettivo di alcune varietà o chemotipi di origano.

### Attività erbicida

I composti fenolici hanno anche dimostrato una forte attività erbicida, compromettendo la germinabilità dei semi di varie specie vegetali (Dudai *et al.*, 1999; Angelini *et al.*, 2003). L'effetto fitotossico dei monoterpeni degli oli essenziali è ben conosciuto in letteratura e sembra essere il risultato delle alterazioni esercitate sugli organelli cellulari, come i mitocondri, all'intermo del seme, a livello della sintesi del DNA e della stabilità delle membrane (Koitabashi *et al.*, 1997; Nishida *et al.*, 2005).

### Attività antiossidante e antimutagena

Un'ampia varietà di studi ha evidenziato le forti attività antiossidante e antimutagena esercitate dagli estratti di origano.

La componente fenolica è, ancora una volta, fondamentale per l'azione antiossidante (Madsen *et al.*, 1997; Yanishlieva *et al.*, 1999; Milos *et al.*, 2000; Moure *et al.*, 2001).

L'azione antimutagena sembra dovuta all'effetto combinato tra fenoli e i flavonoidi galangina e quercitina (Kanazawa *et al.*, 1995), come evidenziato da Lagouri e collaboratori (1993) in uno studio sugli oli estratti dai taxa *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietsw. ed *O. onites* L.

## **Introduzione**

### **1.3 Analisi qualitativa delle droghe vegetali**

La filiera di produzione e commercializzazione delle droghe vegetali ha assunto una fisionomia sempre più simile a quella della filiera alimentare e, come questa, richiede un adeguato controllo qualitativo delle materie prime. Requisito fondamentale per la sicurezza qualitativa di un preparato vegetale è che esso non sia soggetto a sofisticazione, adulterazione o deterioramento, azioni che possono verificarsi durante i diversi passaggi della filiera, sia intenzionalmente che per effetto di inesperienza, ad esempio a seguito di mancata osservanza dell'identità della pianta nel momento della raccolta.

In taluni casi la sofisticazione non si configura semplicemente come un danno economico perpetrato ai danni di terzi, ma come un potenziale rischio alla salute dei consumatori. Risulta inoltre assai frequente la commercializzazione di prodotti sofisticati diluendo la droga con materiali vegetali di qualità inferiore. Tali adulteranti, scelti soprattutto per il vantaggio economico che portano al contraffattore stesso, possono essere privi di potere terapeutico oppure, nei casi peggiori, avere effetti secondari indesiderati. Per questo tipo di operazioni si predilige in genere l'impiego di vegetali di scarso valore commerciale, facilmente reperibili nella medesima zona di coltivazione della droga e di aspetto visivamente simile a quello della droga originale. Spesso, inoltre, vengono scelte come adulteranti piante aventi un profilo fitochimico tale da non essere immediatamente riconoscibile nei normali saggi chimico-analitici svolti per quantificare i principi attivi della droga originale. Ad essere oggetto di queste pratiche sono in genere due categorie di spezie: quelle ad elevato valore commerciale e disponibili in volumi limitati (ad es. lo zafferano) o quelle commercializzate in volumi estremamente elevati, grazie ai quali l'economia di scala della contraffazione può determinare grossi guadagni anche a seguito della diluizione con moderate quantità di adulteranti (ad es. il peperoncino, l'origano).

L'adulterazione delle droghe è resa possibile dal fatto che il materiale vegetale viene in genere ridotto in piccoli frammenti, dando origine a droghe contuse o polverizzate, non sempre di facile identificazione visiva attraverso un'analisi macroscopica obiettiva, per le somiglianze morfologiche che si possono avere tra la specie commerciale e i suoi contaminanti. La corretta autenticazione del materiale vegetale è indispensabile per stabilire gli standard qualitativi della droga e della sicurezza di impiego.

Prima dello sviluppo della biologia molecolare, l'identificazione di preparati erboristici e delle spezie sotto forma di droghe frantumate o polverizzate è stata possibile solo attraverso laboriose analisi microscopiche della morfologia e dei contenuti cellulari della droga stessa o attraverso l'individuazione di marcatori istologici caratterizzanti (Ph. Eur.; ASTA Methods; WHO Publications). Nonostante questa sia tuttora la tecnica di identificazione più utilizzata, risulta evidente la necessità di avere a disposizione personale tecnico altamente qualificato e dotato di una considerevole esperienza diretta sulle specie botaniche coinvolte e quindi non solo la droga stessa, ma anche i possibili adulteranti. I tempi di esecuzione, inoltre, risultano piuttosto lunghi e non è possibile effettuare più analisi in parallelo. A complementare ed in alcuni casi a sostituire queste analisi sono giunte negli ultimi decenni le metodiche di analisi chimica, soprattutto basate sull'HPLC e sulla gas-cromatografia. Pur nella sua estrema precisione, l'approccio chimico-analitico presenta quasi sempre zone grigie di rivelazione, nelle quali il sofisticatore esperto può giocare inserendo nuovi contaminanti, i cui costituenti non rientrano nella finestra analitica strumentale, passando quindi inosservati.

L'impiego di analisi molecolari basate sul DNA, si è recentemente dimostrato utile nel riconoscimento dei costituenti vegetali presenti in miscele polverizzate di interesse commerciale ed erboristico (Cheng *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1999; Nieri *et al.*, 2003; Echeverrigaray *et al.*, 2005). L'utilizzo di tali test, a integrazione o in alternativa a quelli macro e microscopico, porterebbe quindi notevoli vantaggi tra cui una maggiore affidabilità, una minor mole di lavoro, una più veloce procedura lavorativa ed un supporto nei casi in cui l'analisi chimico-analitica si dimostri debole.

### **1.3.1 Approccio classico: le analisi strutturali**

L'approccio sistematico all'identificazione di una droga implica un'ordinata e progressiva serie di operazioni: il primo passo consiste in una semplice osservazione macroscopica tesa ad accertare se la droga è di tipo organizzato, ovvero costituita da struttura cellulare o tissutale, o non organizzato, cioè priva di qualsiasi organizzazione biologica come avviene per polveri minerali, latici o resine. Per le droghe organizzate il successivo passo analitico è costituito dall'analisi morfologica della droga, eseguita per osservazione diretta mediante l'aiuto di un microscopio o di uno stereomicroscopio, per l'individuazione dei tipi cellulari caratteristici e

## **Introduzione**

dei contenuti cellulari. Segue infine, sia per droghe organizzate che non organizzate, la diagnosi specifica costituita dall'identificazione dei costituenti chimici.

Il riconoscimento delle droghe ha il fine di stabilire l'identità, scoprire le eventuali sofisticazioni o sostituzioni, valutare la presenza di materiale o organismi estranei e quindi determinare il grado della qualità complessiva.

### **Saggi preliminari:**

Prima di eseguire su di una droga vegetale le analisi specifiche per il suo riconoscimento, il preparato può essere esaminato attraverso una semplice serie di test preliminari, visivi e sensoriali o chimico-fisici. Vengono osservati il colore, la pezzatura, viene considerato l'aroma, saggiato il sapore. Sono saggi veloci e in grado di dare un'indicazione iniziale sulla qualità della droga che si sta analizzando.

#### Saggio del colore:

Viene osservato il colore della droga nella sua completezza. Nelle droghe derivate da organi aerei e fotosintetici le tonalità variano dal verde-scuro al verde-giallo, a seconda della percentuale di foglie, fiori o fusti. Sono disponibili tavolozze di colore appositamente tarate ed idonee a distinguere il cromatismo caratteristico di molte droghe vegetali essiccate o polverizzate.

#### Determinazione della pezzatura:

La droga può presentarsi in forma frantumata, triturrata in varie pezzature:

4. Grande. Sono presenti in forma riconoscibile gli organi e tessuti della pianta che costituiscono la droga.
5. Medio-grande. Gli organi sono frantumati grossolanamente.
6. Medio-piccola. È maggiore la percentuale di pezzi finemente frantumati rispetto a porzioni più grandi.
7. Piccola. La droga vegetale è triturrata finemente, a volte polverizzata.

### Valutazione dell'aroma:

È un'analisi organolettica di tipo sensoriale. Olfattivamente viene definita la fragranza di un campione attraverso il paragone con campioni di riferimento.

L'aroma può essere distinto in:

8. Molto aromatico.
9. Aromatico.
10. Lievemente aromatico.
11. Poco aromatico.

Tali saggi hanno un valore limitato il cui risultato è fortemente legato all'esperienza specifica dell'operatore, ovvero un fattore che si costruisce col tempo ed è frutto di un'elevata specializzazione professionale. L'utilità risiede nella possibilità di identificare, con una ridotta spesa economica e di tempo, le contraffazioni più grossolane.

### **Saggi macro- e microscopico**

#### Saggio autoptico:

Consiste nell'osservazione dei caratteri macroscopici salienti della droga. Questo esame è possibile quando la droga è costituita da parti visibili non triturate o polverizzate, ovvero quando alcuni tratti morfologici sono riconoscibili ad occhio nudo. Per una droga vegetale andranno presi in considerazione la morfologia degli organi principali, fusto, foglia e radice. Si valuterà, solitamente con l'ausilio di uno stereomicroscopio, l'aspetto della corteccia, la conformazione dei fiori, dei frutti e dei semi, se presenti. Questo tipo di indagine si basa sulla conoscenza dell'anatomia vegetale ed usa la terminologia relativa. Si tratta di un approccio che deve molto alla botanica sistematica in quanto fa leva sui medesimi caratteri impiegati nelle chiavi dicotomiche e pertanto sfrutta una considerevole mole di dati ed informazioni già codificati e strutturati in maniera chiara nelle descrizioni tassonomiche. Per contro un problema per questo saggio è che quasi sempre la droga è costituita da un unico tessuto o organo e non dalla pianta intera.

## **Introduzione**

### Saggio microscopico:

Viene eseguito con l'aiuto di un microscopio, solitamente di tipo ottico, molto raramente con microscopio elettronico a trasmissione o a scansione. L'indagine può essere eseguita su sezioni di materiale o su polveri opportunamente trattate al fine di recuperare consistenza o eliminare interferenze, ad esempio effettuando uno sbiancamento o una colorazione preliminare. Per le droghe vegetali organizzate, l'analisi si basa sulla conoscenza dell'istologia e della citologia vegetale. Tra i metodi microscopici atti all'identificazione delle droghe, oltre a quelli propri dell'anatomia istologica caratteristici per ogni specie vegetale, riveste particolare importanza la rilevazione della tipologia degli stomi e dell'indice stomatico. Altri caratteri individuabili microscopicamente e di grande importanza nel riconoscimento di una droga di tipo organizzato sono la presenza e la struttura di tricomi epidermici, di granuli di amido, di granuli di aleurone o di cristalli di ossalato di calcio.

### **1.3.2 Analisi chimiche**

L'esame chimico può spaziare dalla semplice risposta ad un determinato reattivo alla laboriosa analisi gascromatografica di una miscela complessa quale un olio essenziale. Nel caso di droghe liquide o assai polverizzate tali saggi assumono grande valore diagnostico. In particolare sono le conoscenze correlate alla chemotassonomia ad avere un ruolo fondamentale nell'identificazione chimica delle droghe.

La chemotassonomia è la scienza che si occupa della classificazione delle piante in base alle loro affinità e divergenze chimiche, attraverso il riconoscimento della presenza e della distribuzione di metaboliti secondari come alcaloidi, terpeni o glucosidi, e svolge un ruolo complementare, ma raramente risolutivo per sé, alle osservazioni morfologiche.

I saggi chimici si avvantaggiano del fatto che la composizione chimica di un vegetale è meno soggetta ai cambiamenti drastici ed alle alterazioni dovuti agli eventuali processi di essiccazione e frantumazione della droga e tende a conservarsi più stabilmente nel tempo, diversamente a quanto succede ai tratti morfologici esterni.

Solitamente, più che utili al riconoscimento dell'identità, i saggi chimici risultano indispensabili per la determinazione della qualità della droga.

In chiave erboristica ed in particolar modo nel processo di identificazione e definizione delle proprietà specifiche di una droga vegetale, l'analisi chimica quali-quantitativa è fondamentale nella definizione delle qualità intrinseche della stessa, dato che l'abbondanza di un

determinato marcatore chimico è, in genere, la causa prima dell'attività biologica per la quale la droga è consumata.

Le metodiche analitiche a cui si può fare ricorso nella titolazione di una droga sono numerose, le più diffuse nel controllo di qualità sono l'HPLC e la gascromatografia, indicate rispettivamente per sostanze polari o di media polarità e per classi di composti a bassa polarità o apolari. Nel caso di specie essenziere come l'origano, l'analisi d'elezione è quella gascromatografica e non a caso essa è inclusa nelle specifiche delle più comuni farmacopee.

Attraverso analisi gascromatografica è possibile:

- verificare la presenza di adulteranti di sintesi omologhi alle sostanze naturali (come ad esempio può essere il linalolo artificiale in un olio essenziale di Lavanda o Bergamotto o l'aggiunta di componenti caratterizzanti in oli di scarsa qualità);
- distinguere oli essenziali di composizione ed aroma simile ma ottenuti da droghe, o parti delle stesse, meno nobili (come ad esempio l'olio essenziale di cannella corteccia e olio essenziale di cannella foglie);
- individuare contaminanti chimici come ftalati e residui di solventi.

### 1.3.3 Analisi ultrastrutturali:

In aggiunta alle metodiche di riconoscimento classico, alcuni autori come Quiro nel 1975 e Maas nel 1977 hanno proposto analisi di tipo ultrastrutturale basate sulla morfologia del polline. In particolare sono state studiate le caratteristiche di diametro dell'esina che costituisce la superficie esterna della parete del granulo pollinico. Le ornamentazioni presenti nell'esina sono infatti particolarmente stabili nel tempo a differenza delle normali caratteristiche morfologiche osservate, le quali sono più soggette all'influenza ambientale. Questo tipo di osservazione è fondamentale ad esempio nel riconoscimento dell'origine del miele e dei suoi derivati di uso erboristico come polline e pappa reale, nonché nella caratterizzazione di alcune droghe costituite da fiori o loro parti, ma non trova ampio utilizzo al di fuori di questi contesti.

## Introduzione

### 1.4 Marcatori molecolari genomici

Già nel secolo XIX Mendel sviluppò, nelle sue osservazioni sperimentali di determinati organismi vegetali, il concetto di marcatori genetici fenotipici, cioè fattori in grado di classificare un aspetto di un fenotipo. Nei successivi esperimenti condotti su *Drosophila* da Morgan e Sturtevant sono state poste le basi per la teoria della concatenazione/associazione genica (Sturtevant, 1913).

Questi marcatori fenotipici, con le loro limitazioni, hanno favorito la ricerca e la scoperta di marcatori più generali e di ampio utilizzo noti come marcatori molecolari genomici.

Un marcatore molecolare genomico è definito come una porzione di DNA che è rappresentativa di una particolare condizione a livello genomico, ma non è necessariamente correlato all'espressione fenotipica di un tratto. È un qualsiasi carattere ereditario, trasmesso in maniera mendeliana semplice ed in grado di divenire un vero e proprio elemento di identificazione e riferimento (Sansavini e Pancaldi, 1998).

I marcatori molecolari genomici offrono numerosi vantaggi rispetto ai marcatori fenotipici, essi sono infatti stabili e rilevabili in tutti i tessuti indipendentemente da crescita, differenziazione e stadio di sviluppo.

Non sono soggetti ad effetti pleiotropici o epistatici. Ciò significa che mentre un marcatore fenotipico può essere o non essere presente in base alle caratteristiche ereditarie o ambientali che ne determinano l'espressione, un marcatore molecolare genomico è sempre identificabile nel genoma che lo 'esprime', qualsiasi sia la condizione di regolazione genica, ereditaria o ambientale, alla quale è soggetto l'organismo.

Il "marcatore genomico ideale", ha i requisiti di:

1. essere ereditario;
2. essere stabile nel tempo;
3. essere neutro (senza effetti sul fenotipo);
4. essere altamente polimorfico
5. essere facilmente individuabile;
6. essere evidenziabile direttamente sul DNA;
7. essere riproducibile;
8. essere economico.

Sfortunatamente, non esistono, o non sono ancora stati individuati, marcatori in possesso di tutte queste caratteristiche contemporaneamente, tali da risultare utilizzabili universalmente.

Il progredire delle conoscenze riguardanti il materiale genetico e le sue possibili manipolazioni, unitamente ai grandi passi che si sono compiuti nelle tecniche e nelle strumentazioni applicate alla biologia molecolare, hanno consentito negli ultimi venti anni di riconoscere e sviluppare un buon numero di marcatori molecolari genomici, anche molto differenti fra di loro, ciascuno soddisfacente solo in parte i requisiti ideali.

In base al tipo di tecnica che implicano per il loro sviluppo, i marcatori molecolari genomici si possono classificati in due categorie principali:

12. Marcatori basati sull'ibridazione degli acidi nucleici.

13. Marcatori basati sulla reazione di amplificazione PCR.

### **1.4.1 Tecniche basate sull'ibridazione:**

#### RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

Gli RFLP sono marcatori che permettono di analizzare il polimorfismo di sequenza nucleotidica generato nel DNA dopo digestione con enzimi di restrizione (Beckmann e Soller, 1986). E' 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 il doppio filamento di DNA in corrispondenza o nelle vicinanze di tali sequenze.

I frammenti vengono successivamente separati attraverso elettroforesi e messi in evidenza con l'utilizzo di sonde complementari al frammento ricercato. Tali sonde sono costituite da sequenze nucleotidiche con marcature che possono essere di tipo chimico radioattivo o chimico non radioattivo.

I grossi vantaggi di questi marcatori, indipendenti dalle influenze ambientali, risiedono nella loro codominanza, nella distribuzione uniforme sul genoma, nella mancanza di effetti

## Introduzione

pleiotropici, nell'essere ereditati mendelianamente (questo è vero per gli RFLP nucleari, mentre per gli RFLP degli organelli l'ereditarietà è materna) e infine nella possibilità di generare un numero pressoché illimitato di polimorfismi semplicemente variando le combinazioni di enzimi.

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 nel loro utilizzo.

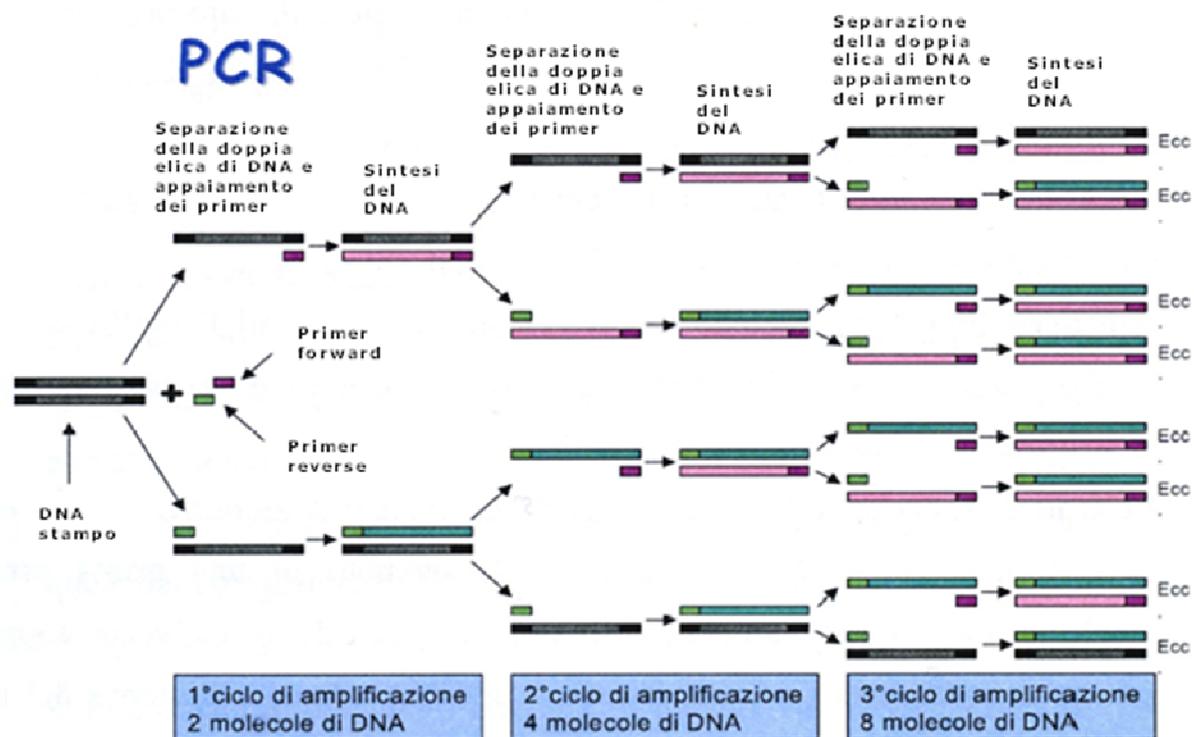
Gli RFLP trovano applicazione principalmente in aree di interesse agronomico come l'identificazione varietale, lo screening delle risorse genetiche e l'analisi genetica di caratteri economicamente importanti.

### 1.4.2 Tecniche basate su amplificazione PCR:

I marcatori molecolari genomici oggi maggiormente utilizzati si basano sull'amplificazione di sequenze del genoma attraverso la reazione PCR, Polymerase Chain Reaction (Mullis *et al.*, 1986; Mullis e Faloona, 1987). La reazione è in grado di individuare ed evidenziare i polimorfismi caratteristici di alcune porzioni del genoma dell'organismo oggetto di analisi.

Il metodo di amplificazione PCR prevede tre fasi fondamentali che si ripetono ciclicamente (**figura 3**):

- *Denaturazione del DNA stampo* (termica), cioè separazione delle doppie eliche che costituiscono le molecole di DNA. La temperatura in questa fase è circa 94°C: in queste condizioni si ha la denaturazione del DNA con formazione di singoli filamenti stampo sui quali si legheranno le sequenze d'inizio della polimerizzazione (primer).
- *Appaiamento o ibridazione dei primer*, abbassando la temperatura si permette ai primer oligonucleotidici di appaiarsi alle sequenze complementari presenti nelle DNA stampo, definendo i punti d'inizio della sintesi operata dalla DNA polimerasi. La temperatura di appaiamento è un parametro variabile, dipendente dalla natura degli oligonucleotidi posti in reazione (lunghezza e composizione in basi) e capace di determinare il grado di selettività/specificità dell'amplificazione PCR, è perciò uno dei passaggi caratterizzanti la tecnica.
- *Allungamento o polimerizzazione* (sintesi di nuovi segmenti di DNA), la temperatura ottimale per l'attività dell'enzima Taq DNA polimerasi è di 72°C. Questo enzima è una polimerasi termoresistente proveniente dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* (Watson *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Schema di reazione PCR nei primi tre cicli di amplificazione. Sono indicate le fasi di denaturazione, appaiamento e amplificazione di ciascun ciclo, del tratto di DNA di interesse.

Il ripetersi ciclico delle tre temperature, alle quali si susseguono le tre fasi di denaturazione, appaiamento dei primer e polimerizzazione del DNA, determina un'amplificazione esponenziale della porzione (una o più sequenze) del DNA stampo riconosciuta e delimitata dalle sequenze primer.

La quantità di DNA stampo richiesta per la reazione è minima (dalle centinaia di fentogrammi ai nanogrammi).

I frammenti amplificati (ampliconi), possono essere separati attraverso elettroforesi su gel di agarosio ed evidenziati con etidio bromuro, fluorescente alla luce ultravioletta.

Il polimorfismo esistente tra diversi individui si manifesta attraverso la presenza o l'assenza del prodotto di amplificazione a seguito di una specifica reazione PCR.

La relativa semplicità, la plasticità e l'efficacia della tecnica PCR hanno consentito un'ampia varietà di applicazioni e non da ultima la creazione di validi e diversificati marcatori molecolari genomici.

## **Introduzione**

Le tecniche principali basate su PCR possono essere a loro volta distinte in due categorie, in base alla specificità dell'amplificazione.

### **Marcatori che non richiedono la conoscenza di sequenze specifiche**

L'utilizzo di primer casuali ha reso possibile superare le limitazioni dovute alla necessità di conoscenza di sequenze specifiche per l'applicazione della PCR ed ha agevolato l'individuazione di polimorfismi genetici e lo sviluppo di marcatori molecolari genomici da utilizzare in diversi ambiti.

#### **RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA**

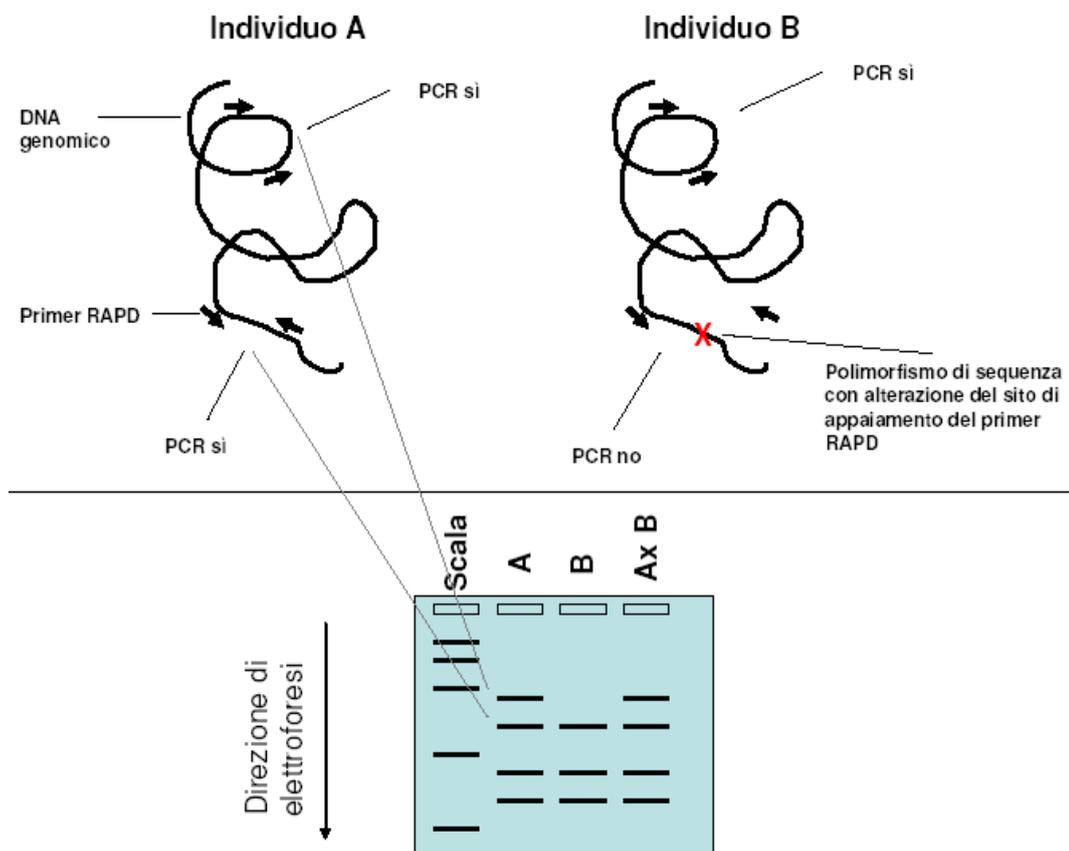
La tecnica RAPD-PCR amplifica il DNA genomico utilizzando come primer per la reazione piccole sequenze oligonucleotidiche non specifiche (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990). L'approccio non richiede alcuna conoscenza del genoma che deve essere amplificato e per questo è una tecnica molto plastica nelle possibili applicazioni.

In questo tipo di analisi ogni reazione di amplificazione viene effettuata con un singolo primer di breve sequenza (ideale 9-10nt) nota ma arbitraria che, per la sua natura poco specifica, può legarsi al DNA genomico in differenti posizioni; se i siti di appaiamento del primer delimitano una sequenza di dimensioni amplificabili, a seguito della reazione, si formeranno un certo numero di ampliconi di dimensioni ed intensità differenti.

La reazione di amplificazione RAPD-PCR può essere condotta su quantità ridotte di DNA, è una tecnica relativamente semplice e veloce e costituisce uno strumento efficace per stimare ed individuare polimorfismi di sequenza tra individui.

Il numero, la riproducibilità e l'intensità delle bande visualizzabili in un profilo RAPD sono funzione di diversi parametri quali composizione del tampone di reazione, temperatura di appaiamento, concentrazione e purezza del DNA stampo così come della lunghezza e sequenza del primer RAPD (Tingey e del Tufo, 1993). A parità di queste condizioni, il numero e l'intensità degli ampliconi generati da ogni reazione distinta, riflette il numero di siti di appaiamento tra DNA stampo e primer e il loro grado di complementarietà, mentre l'assenza di un particolare frammento di amplificazione nel profilo di un individuo diverso può derivare da delezioni, inserzioni o mutazioni di basi nel DNA stampo a livello dei siti di

legame con il primer o nel segmento da essi delimitato (**figura 4**) (Ellsworth *et al.*, 1993; Haley *et al.*, 1994).



**Figura 4.** Schema del risultato ottenibile attraverso un'amplificazione RAPD-PCR effettuata su due individui differenti (A e B) e sulla progenie degli stessi (A × B).

Le porzioni di DNA genomico amplificato dalla RAPD-PCR sono in prevalenza regioni non codificanti, in grado di evolversi più rapidamente perché meno sottoposte a pressioni conservative, questo renderebbe ragione della maggiore capacità dei marcatori RAPD di evidenziare polimorfismi genetici rispetto ad altri marcatori molecolari genomici (Boscherini *et al.*, 1994; Bucci *et al.*, 1997).

Poiché i marcatori RAPD segregano in modo mendeliano come caratteri dominanti, la presenza di una data banda non permette di stabilire se il rispettivo locus è omozigote o eterozigote. Ciò nonostante, un locus viene considerato polimorfico se la banda corrispondente è presente in alcuni campioni e assente in altri, e monomorfo se essa è comune a tutti i campioni (Kongkiatngam *et al.*, 1995), assumendo che bande di uguale peso

## Introduzione

molecolare condivise da diversi individui rappresentino omologie (sequenze ereditate da un progenitore comune) piuttosto che omoplasie (sequenze acquisite indipendentemente) (Tingey e del Tufo, 1993).

La tecnica, impiegata in numerosissime ricerche presenta quindi numerosi vantaggi rispetto ad altri marcatori: 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, il principale è dovuto alla bassa riproducibilità e trasferibilità del risultato dell'amplificazione. Infatti la reazione poco specifica è facilmente influenzabile da numerosi fattori quali la metodica di estrazione del DNA, la concentrazione dello stesso, modifiche nei componenti e nella strumentazione utilizzati per effettuare l'amplificazione, ecc.

Inoltre, poiché diversi loci possono essere amplificarsi contemporaneamente, i profili che risultano possono essere anche molto complessi e impegnativi da analizzare.

### AFLP Amplified fragment length polymorphism

La procedura è stata pubblicata per la prima volta da Vos e colleghi nel 1995 e successivamente applicata in campo vegetale (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).
- Amplificazioni (PCR) con primer marcati costruiti sulla sequenza degli 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 per il sequenziamento (di poliacrilamide).

Gli AFLP sono molto polimorfici (si ottengono fino a 100 bande per corsia, delle quali alcune decine sono spesso polimorfiche). La tecnica consente di individuare sia marcatori dominanti (85% dei casi circa), che codominanti.

Gli svantaggi sono rappresentati dalla necessità di grandi quantità di DNA privo di contaminazioni, che potrebbero inibire la digestione tramite enzimi di restrizione, dalla complessità tecnica e dai costi particolarmente elevati che ne rendono ostica l'applicazione routinaria o su larga scala.

### **Marcatori che richiedono la conoscenza di sequenze specifiche**

#### SSR - Simple Sequence Repeat (Microsatelliti)

Questa tecnica si basa sull'esistenza nel DNA di particolari sequenze denominate "microsatelliti" che rappresentano zone altamente ripetute di tre o quattro nucleotidi rinvenibili in tutto il genoma. La variabilità genetica deriva dalla frequenza delle sequenze ripetute ed ogni sequenza rappresenta un locus altamente variabile (Tautz e Renz, 1984).

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 e la tecnica risultava lunga e onerosa.

L'applicazione dell'amplificazione PCR con coppie di primer in grado di riconoscere gli estremi della regione microsatellite e il perfezionamento della tecnica mediante l'utilizzazione di sequenziatori automatizzati hanno reso i microsatelliti tra i marcatori molecolari genomici più utilizzati (Wenz *et al.*, 1998; Schuelke, 2000).

I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo dovuto all'alto tasso di mutazione di questo genere di sequenze, prevalentemente provocato dallo scivolamento (*slippage*) della polimerasi durante la replicazione del genoma (Schlotterer e Tautz, 1992). 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*.

La tecnica SSR di contro ha un'interpretazione delle bande non sempre semplice, alti costi iniziali e una messa a punto lunga e difficile, infatti è necessario prima identificare e poi sequenziare le regioni microsatellite al fine di disegnare i primer per l'amplificazione.

#### SCAR - Sequence Characterized Amplified Region

Il limite delle tecniche basate su amplificazioni PCR aspecifiche, come la tecnica RAPD, è dato dalla difficile riproducibilità di un determinato profilo, a causa dell'estrema variabilità alla quale è soggetta la reazione in condizioni di bassa astringenza.

Ogni polimorfismo di sequenza nucleotidica risultato marcatore caratteristico di un particolare organismo o condizione dello stesso, individuato attraverso una tecnica veloce, ma poco specifica, può essere isolato e reso robusto e riproducibile attraverso la sua conversione in un

## Introduzione

secondo tipo di marcatore, noto come SCAR, Sequence Characterized Amplified Region (Paran e Michelmore, 1993; McDermott *et al.*, 1994).

I marcatori SCAR sono generati costruendo una coppia di primer altamente specifici sulla sequenza di una banda marcatrice individuata attraverso amplificazione arbitraria RAPD-PCR, questo permette al nuovo amplificato di essere altamente affidabile e riproducibile (Hernandez, Martin, Dorado 1999). Con questa tecnica un singolo locus può essere identificato inequivocabilmente. Per poter ottenere marcatori SCAR bisogna tuttavia avere una mappatura parziale dei polimorfismi di un particolare genoma (attraverso la tecnica RAPD) ed effettuare l'isolamento, il clonaggio ed il sequenziamento dei frammenti che risultano discriminanti, questo rende necessario un considerevole lavoro pregresso sugli organismi in esame.

### SNP - Single Nucleotide Polymorphism

Gli SNP sono alla base di una tecnica di identificazione molecolare molto recente.

Sono polimorfismi di sequenza caratterizzati da una differenza a carico di un unico nucleotide. Gli SNP utili come marcatori molecolari sono quelli con frequenza allelica inferiore all'1% all'interno di una popolazione. 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 rivelato 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 sequenziamento degli ampliconi ottenuti in PCR o la ricerca *in silico*, interrogando le principali banche dati genomiche, selezionando e confrontando un certo numero di sequenze riconducibili ad un determinato gene (Rafalski, 2002).

Nella **tabella 4** sono riassunte le principali caratteristiche dei marcatori molecolari genomici più utilizzati.

**Tabella 4.** Principali marcatori molecolari genomici utilizzati nell'analisi di organismi vegetali. Sono indicate le caratteristiche fondamentali che ne determinano i vantaggi e gli svantaggi e le principali applicazioni.

<b>Marcatore</b>	<b>Frequenza nel genoma</b>	<b>Conoscenza della sequenza di DNA</b>	<b>Riproducibilità</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Specificità</b>	<b>Difficoltà Tecnica</b>	<b>Quantità di DNA richiesta</b>	<b>Applicazioni principali</b>
<b>RFLP</b>	Alta	No	Alta	Basso	No	Alta	Alta	Mappatura fisica
<b>RAPD</b>	Alta	No	Bassa	Medio	No	Bassa	Bassa	Differenziazione e Marcatura genetica
<b>AFLP</b>	Alta	No	Alta	Medio	No	Media	Media	Marcatura genetica
<b>SSR</b>	Media	Si	Media	Medio	Si	Media	Bassa	Differenziazione genetica
<b>SCAR</b>	Media	Si	Alta	Medio	Si	Media	Bassa	Marcatura genetica Mappatura fisica
<b>SNP</b>	Bassa	Si	Alta	Alto	Si	Alta	Bassa	Marcatura genetica

Modificata da (Agaward, Shrivastava, Padh, 2008).

Quando si vuole affrontare un problema sperimentale con l'ausilio di marcatori molecolari genomici è quindi indispensabile valutare a priori quale di essi abbia le caratteristiche più adatte per risolvere la questione, in base alle condizioni e natura dei campioni da esaminare e ovviamente al tipo di domanda alla quale si vuole dare risposta.

## **Introduzione**

## 2 SCOPO DEL LAVORO

L'impiego di metodiche molecolari basate sul DNA in ambito vegetale è sempre più diffuso, ne è confermata la crescita continua del numero di pubblicazioni scientifiche nelle quali il riconoscimento e l'autenticazione di specie vegetali di importanza economica o farmaceutica è compiuto attraverso marcatori molecolari genomici (Joshi *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2008; Sucher e Carles, 2008).

Nell'ambito della certificazione delle piante medicinali l'utilizzo di tali tecniche, ad integrazione o in alternativa alle analisi tipicamente fenotipiche macro e microscopiche nonché chimico-analitiche, può determinare numerosi vantaggi tra cui una maggiore affidabilità del risultato ed una più veloce procedura lavorativa, soprattutto se l'analisi deve essere compiuta in tempi brevi per un numero elevato di campioni.

Obiettivo del lavoro è stato lo sviluppo di procedure di identificazione e controllo di qualità basate su marcatori molecolari genomici, delle specie vegetali principalmente rinvenute come adulteranti in preparati commerciali di Origano Mediterraneo e la definizione dei limiti di sensibilità dei metodi individuati, valutando la minima percentuale di contaminanti identificabile, al fine di rendere veloce e trasferibile il processo di autenticazione e certificazione qualitativa della droga.

Come metodica di base dell'analisi molecolare è stata scelta la tecnica PCR-RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990).

I marcatori RAPD sono risultati fondamentali per l'identificazione ed autenticazione di un ampio spettro di specie vegetali di interesse agronomico e farmaceutico (Koller *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 1999; Congiu *et al.*, 2000; Belaj *et al.*, 2002; Weder, 2002; Nieri *et al.*, 2003; Busconi *et al.*, 2003; Echeverrigaray *et al.*, 2005; Sucher e Carles, 2008).

L'analisi PCR-RAPD è infatti in grado di individuare e riconoscere i polimorfismi distintivi dei vegetali in esame con costi e tempi di sviluppo relativamente ridotti, perché non necessita di conoscenze a priori delle loro sequenze genomiche e può essere quindi direttamente impiegata sia per studi intra che extraspecie. È basata sull'amplificazione PCR e non richiede l'estrazione di quantitativi elevati di DNA di alta purezza, difficilmente ottenibile dai vegetali

## Scopo del Lavoro

(e miscele di vegetali) essiccati e potenzialmente molto ricchi in metaboliti secondari che sono oggetto di indagine.

Dall'analisi PCR-RAPD, per sopperire alle caratteristiche di difficile riproducibilità e complessità di trasferimento della metodica, e per rendere ulteriormente veloce l'analisi di numeri elevati di campioni, semplificando l'interpretazione dei risultati, è stata successivamente derivata una seconda categoria di marcatori molecolari genomici definita SCAR, Sequence Characterized Amplified Region (Paran e Michelmore, 1993), altamente sensibile, riproducibile e trasferibile, perché basata sul sequenziamento delle porzioni di genoma marcatrici di ciascuna specie contaminante.

I marcatori genomici SCAR appartengono alle tecniche molecolari più avanzate ed efficaci e recentemente sono molto utilizzati, in studi di identificazione di specie vegetali e cultivar di interesse agronomico (Vidal *et al.*, 2000; Bautista *et al.*, 2002; Scheef *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Masuzaki *et al.*, 2008), per compiere selezioni genetiche guidate da marcatori (Paran e Michelmore, 1993; Hernandez *et al.* 1999; Akkurt *et al.*, 2007), così come per l'autenticazione di specie presenti in preparati medicinali ed erboristici (Devaiah e Venkatasubramanian, 2008; Jain *et al.*, 2008; Sucher e Carles, 2008).

Per contro, la metodica PCR-SCAR, necessita di tempi e costi di sviluppo decisamente più elevati rispetto ad altre tecniche, buona parte dei quali sono però ridotti dall'aver precedentemente sviluppato sulle stesse specie vegetali l'analisi RAPD. Si avvale anch'essa della tecnica PCR ed ha perciò i medesimi vantaggi della metodica PCR-RAPD, relativamente a quantità e purezza del DNA sul quale può essere applicata.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 Materiale vegetale

#### 3.1.1 Reperimento dei campioni di Origano Mediterraneo

Tra gli anni 2001 e 2007, campioni di Origano Mediterraneo essiccato sono stati acquistati in lotti uniformi di 250gr da grossisti operativi nell'area mediterranea ed attivi sul mercato europeo. Allo scopo di simulare le reali condizioni commerciali, i campioni sono stati conservati in ambiente asciutto e buio alla temperatura di 5°C fino al momento dell'analisi macroscopica e microscopica.

Parte di ciascun campione è stata polverizzata in mortaio, con l'ausilio di azoto liquido, e conservata a -80°C per la successiva estrazione del DNA genomico.

#### 3.1.2 Reperimento delle accessioni del genere *Origanum* e allestimento di un campo collezione

Semi di varie specie e sottospecie di *Origanum* (*O. majorana* L., *O. onites* L., *O. vulgare* L., *O. vulgare* L. subsp. *vulgare*, *O. vulgare* L. subsp. *gracile* Ietsw., *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietsw., *O. vulgare* L. subsp. *virens* Ietsw., *O. vulgare* L. subsp. *viride* Hayek, *O. heracleoticum* L.) di differente origine geografica, sono stati reperiti presso:

- North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa (USA);
- Abteilung Genbank, Leibnitz IPK, Gatersleben (Germania);
- Istituto Sperimentale di Assestamento Forestale e Apicoltura, Trento (Italia).

Quarantotto accessioni di questi taxa sono state seminate e coltivate in serra presso l'Orto Botanico di Parma.

Nel luglio 2007, quattro individui per ogni accessione, distinti da una lettera (A, B, C, D), sono stati trapiantati in pianterra, presso l'azienda 'Giardino delle erbe' di Casola Valsenio (RA), , allestendo un campo collezione (**tabella 5**).

## Materiali e Metodi

**Tabella 5.** Elenco dei taxa del genere *Origanum* presenti nel campo collezione di Casola Valsenio (RA).

Taxon	N° accessioni per taxon	N° individui per taxon	N° nazioni di provenienza per ogni taxon
<i>Origanum majorana</i> L.	3	12	2
<i>O. onites</i> L.	1	4	1
<i>O. vulgare</i> L.	13	52	10
<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>vulgare</i>	16	64	8
<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>gracile</i> Ietsw.	2	8	2
<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i> Ietsw.	3	12	3
<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>virens</i> Ietsw.	3	12	2
<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>viride</i> Hayek	3	12	2
<i>O. heracleoticum</i> L.	3	12	2
<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>viride</i> Hayek × <i>O. majorana</i> L.	1	4	1
<b>TOT</b>	<b>48</b>	<b>192</b>	-

Elenco delle accessioni del genere *Origanum* presenti nel campo collezione di Casola Valsenio con numero di catalogazione e nazione di provenienza (quando conosciuta):

- 01 *Origanum majorana* provenienza Italia
- 06 *O. vulgare* provenienza Cina
- 08 *O. vulgare* provenienza Albania
- 09 *O. vulgare* provenienza Polonia
- 10 *O. vulgare* provenienza Svizzera
- 11 *O. vulgare* provenienza Francia
- 12 *O. vulgare* subsp. *gracile* provenienza Unione Sovietica
- 13 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Ucraina
- 14 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Germania

- 16 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Repubblica Ceca
- 17 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Ungheria
- 19 *O. vulgare* subsp. *virens* provenienza sconosciuta
- 20 *O. vulgare* provenienza Ungheria
- 21 *O. vulgare* var. *Compactum* provenienza sconosciuta
- 22 *O. vulgare* subsp. *viride* provenienza Italia
- 23 *O. vulgare* provenienza Georgia
- 24 *O. vulgare* provenienza URSS
- 26 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Georgia
- 27 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Italia
- 28 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Italia
- 30 *O. vulgare* var. *Compactum* provenienza sconosciuta
- 31 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Russia
- 32 *O. vulgare* subsp. *vulgare* cv. *Nymphenburg* provenienza sconosciuta
- 33 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Germania
- 34 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Albania
- 35 *O. vulgare* subsp. *virens* provenienza Albania
- 37 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Italia
- 38 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Italia
- 39 *O. vulgare* subsp. *viride* provenienza Albania
- 40 *O. vulgare* subsp. *virens* provenienza Spagna
- 41 *O. vulgare* subsp. *hirtum* provenienza USA
- 42 *O. vulgare* subsp. *viride* × *O. majorana* provenienza Italia
- 43 *O. vulgare* subsp. *vulgare* cv. *Erntedank* provenienza sconosciuta
- 44 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Germania
- 45 *O. vulgare* provenienza Italia
- 46 *O. vulgare* subsp. *gracile* provenienza Cecoslovacchia
- 47 *O. vulgare* subsp. *viride* provenienza Albania
- 49 *O. vulgare* cv. *Wilder Dost* provenienza Belgio
- 50 *O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Italia
- 51 *O. vulgare* subsp. *hirtum* provenienza Albania
- 52 *O. vulgare* subsp. *hirtum* provenienza Grecia
- 53 *O. vulgare* provenienza Italia
- 54 *O. heracleoticum* provenienza Regno Unito

## Materiali e Metodi

55 *O. heracleoticum* provenienza Regno Unito

56 *O. majorana* provenienza Italia Lucca

57 *O. heracleoticum* provenienza Italia Foggia

58 *O. majorana* provenienza Regno Unito

59 *O. onites* provenienza Italia Vicenza

### 3.1.3 Elenco delle specie vegetali reperite, non appartenenti al genere *Origanum*:

Individui freschi di: *Cotinus coggygria*, *Fragaria vesca* e *Rubus caesius*, sono stati reperiti in campo.

Individui freschi di: *Cistus ladanifer*, *Cistus salvifolius*, *Cistus* sp., *Helianthemum* sp., *Olea europaea*, *Rhus typhina*, *Rubus idaeus*, *Satureja hortensis* e *Satureja montana*, sono stati acquistati presso vivaio.

Individui freschi di: *Cistus incanus* e *Rhus coriaria*, sono stati reperiti presso gli orti botanici di Ferrara e di Palermo rispettivamente.

I vegetali sono stati coltivati e conservati in vaso presso l'Orto Botanico di Parma.

### 3.1.4 Campionamento delle specie vegetali fresche

Per tutti i vegetali reperiti, sono stati prelevati campioni freschi della porzione aerea ed una aliquota dei campioni prelevati è stata essiccata in stufa a 40°C per una settimana.

#### Miscele artificiali di composizione nota *Origanum*/contaminante:

Una porzione dei campioni, sia freschi che secchi, dei vegetali *Cistus incanus*, *Rhus coriaria*, *Rubus caesius*, *Origanum majorana* e *Satureja montana* (contaminanti, vedi **tabella 1**), è stata utilizzata per creare miscele artificiali di composizione nota con materiale proveniente da *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*. Ogni singolo contaminante è stato mescolato ad *Origanum* alle percentuali dell' 1, 2, 5, 10% (p/p), costituendo 4 miscele distinte per contaminante.

Tutti i campioni, freschi, essiccati e in miscela, sono stati polverizzati in azoto liquido mediante l'utilizzo di un mortaio e le polveri così ottenute sono state conservate a -80°C per la successiva estrazione del DNA genomico.

Per le accessioni del genere *Origanum* presenti nel campo collezione di Casola Valsenio, l'estrazione di DNA è stata effettuata su polveri ottenute dagli individui A di ciascuna accessione.

Nel luglio degli anni 2008 e 2009, in concomitanza con il periodo balsamico delle specie in esame, sono state nuovamente campionate tutte le accessioni presenti nel campo collezione di Casola Valsenio.

### 3.2 Analisi farmacognostica

Da ciascun campione di Origano Mediterraneo di origine commerciale sono state prelevate 3 parti uguali (come indicato dalle direttive relative ai metodi di controllo qualitativo per il materiale medicinale di origine vegetale, fornite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, OMS), 20mg di ciascuna parte sono stati accuratamente pesati e osservati allo stereomicroscopio e al microscopio (Stemi SV 11, ZEISS, Germany). L'analisi qualitativa e quantitativa è stata effettuata attraverso riconoscimento diretto e isolamento manuale basandosi sui caratteri morfologici tassonomici di ciascun frammento vegetale osservato. L'identificazione della porzione di Origano Mediterraneo è stata fatta secondo le indicazioni presenti nella monografia "*Origani herba*" riportata dalla Farmacopea Europea (Ph. Eur.), mentre l'identificazione degli altri componenti vegetali è stata compiuta attraverso ricerca e riconoscimento di specifici caratteri morfologici tassonomici [*Flora d'Italia*] (Pignatti, 1982) e "*Flora Europaea*" (Tutin *et al.*, 1964-1980, 1993)]. Ogni specie vegetale individuata è stata isolata e pesata singolarmente.

## Materiali e Metodi

### 3.3 Estrazione del DNA genomico

Nel corso del progetto sono stati sviluppati 5 protocolli di estrazione del DNA genomico, tutti basati sull'azione del detergente cationico cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB), a partire dalla metodica indicata da Murray e Thompson nel 1980.

#### 3.3.1 Protocollo A - Estrazione in tampone CTAB secondo procedura Murray e Thompson (1980) modificata.

##### Tampone di estrazione A:

Tris-HCl pH 8.0	50mM
EDTA pH 8.0	10mM
NaCl	0.7M
CTAB	1%(p/v)
$\beta$ -mercaptoetanolo	2%(v/v)
H <sub>2</sub> O sterile	

##### Protocollo di estrazione A:

1. Pesare 50mg di campione polverizzato in un tubo da 15ml, aggiungere 2940 $\mu$ l di tampone di estrazione preriscaldato a 65°C e 60 $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanolo.
2. Incubare a 65°C per 1h mescolando il campione ogni 15min.
3. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e mescolare delicatamente per almeno 3min.
4. Centrifugare a 3000 $\times$ g per 20min a T ambiente.
5. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 15ml e ripetere l'estrazione con cloroformio/alcol isoamilico.
6. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 15ml, aggiungere pari volume di isopropanolo, mescolare delicatamente per inversione ed incubare a -20°C per circa 1h.
7. Precipitare gli acidi nucleici centrifugando a 3000 $\times$ g per 1h a 4°C ed eliminare il surnatante.
8. Lavare 2 volte il precipitato aggiungendo 1ml di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 3000 $\times$ g per 10min a 4°C ed eliminare il surnatante.

9. Lasciare asciugare il precipitato all'aria 10min, risospendere in 300 $\mu$ l di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) e trasferire in un tubo da 1.5ml.
10. Aggiungere 5 $\mu$ g di RNAsi A e incubare a 37°C per 45min.
11. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e mescolare delicatamente.
12. Centrifugare a 20000 $\times$ g per 10min a T ambiente e recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 1.5ml.
13. Aggiungere 1/10 di volume di acetato di sodio 3M pH 5.2, 2 volumi di etanolo 100%, mescolare delicatamente per inversione ed incubare a -20°C per circa 1h.
14. Precipitare il DNA centrifugando a 20000 $\times$ g per 30min a 4°C ed eliminare il surnatante.
15. Lavare 2 volte il DNA precipitato aggiungendo 200 $\mu$ l di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 20000 $\times$ g per 5min a 4°C ed eliminare il surnatante.
16. Lasciare asciugare il DNA all'aria 5min e risospendere il precipitato in 50-100 $\mu$ l di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0).

### 3.3.2 Protocollo B - Estrazione in tampone CTAB a T ambiente con aggiunta di PVP e carbone attivo.

#### Tampone di estrazione B:

Tris-HCl pH 8.0	50mM
EDTA pH 8.0	10mM
NaCl	0.7M
CTAB	1%(p/v)
$\beta$ -mercaptoetanol	2%(v/v)
H <sub>2</sub> O sterile	
PVP	1%(p/v)
Carbone attivo	0.3%(p/v)

#### Protocollo di estrazione B:

1. Pesare 10mg di carbone attivo in un tubo da 15ml, aggiungere 30-50mg di campione polverizzato, 2940 $\mu$ l di tampone di estrazione e 60 $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanol.
2. Incubare a T ambiente per 16h in agitazione continua.

## Materiali e Metodi

3. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e mescolare delicatamente per almeno 3min.
4. Centrifugare a 3000×g per 20min a T ambiente.
5. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 15ml e ripetere l'estrazione con cloroformio/alcol isoamilico.
6. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 15ml, aggiungere pari volume di isopropanolo e mescolare delicatamente per inversione.
7. Precipitare gli acidi nucleici centrifugando a 3000×g per 60min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
8. Lavare 2 volte il precipitato aggiungendo 1ml di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 3000×g per 10min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
9. Lasciare asciugare il precipitato all'aria 10min, risospendere in 300μl di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) e trasferire in un tubo da 1.5ml.
10. Aggiungere 5μg di RNAsi A e incubare a 37°C per 45min.
11. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e mescolare delicatamente.
12. Centrifugare a 20000×g per 10min a T ambiente e recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 1.5ml.
13. Aggiungere 1/10 di volume di acetato di sodio 3M pH 5.2, 2 volumi di etanolo 100% e mescolare delicatamente per inversione.
14. Precipitare il DNA centrifugando a 20000×g per 30min a T ambiente per eliminare il surnatante.
15. Lavare 2 volte il DNA precipitato aggiungendo 200μl di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 20000×g per 5min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
16. Lasciare asciugare il DNA all'aria 10min e risospendere il DNA in 50-100μl di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0).

**3.3.3 Protocollo C - Estrazione doppia in tampone CTAB/NaCl (Marieschi *et al.*, 2009).**

Tampone di estrazione C:

Tris-HCl pH 8.0	50mM
EDTA pH 8.0	10mM
NaCl	0.7M
CTAB	2%(p/v)
$\beta$ -mercaptoetanololo	2%(v/v)
H <sub>2</sub> O sterile	
PVP	1%(p/v)
Carbone attivo	0.3%(p/v)

Protocollo di estrazione C:

1. Pesare 10mg di carbone attivo in un tubo da 15ml, aggiungere 30-50mg di campione polverizzato, 2940 $\mu$ l di tampone di estrazione e 60 $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanololo.
2. Incubare a T ambiente per 16h in agitazione continua.
3. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e mescolare delicatamente per almeno 3min.
4. Centrifugare a 3000 $\times$ g per 20min a T ambiente.
5. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 15ml e ripetere l'estrazione con cloroformio/alcol isoamilico.
6. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 15ml, aggiungere pari volume di isopropanolo e mescolare delicatamente per inversione.
7. Precipitare gli acidi nucleici centrifugando a 3000 $\times$ g per 1h a T ambiente ed eliminare il surnatante.
8. Lavare 2 volte il precipitato aggiungendo 1ml di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 3000 $\times$ g per 10min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
9. Lasciare asciugare il precipitato all'aria 10min e risospendere in 300 $\mu$ l di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) e trasferire in un tubo da 1.5ml.
10. Aggiungere 5 $\mu$ g di RNAsi A e incubare a 37°C per 45min.
11. Aggiungere CTAB ed NaCl per ottenere una concentrazione finale di CTAB 1% e NaCl 0.7M ed incubare a 65°C per 15min.
12. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e mescolare delicatamente.

## Materiali e Metodi

13. Centrifugare a 20000×g per 10min a T ambiente e recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 1.5ml.
14. Aggiungere 1/10 di volume di acetato di sodio 3M pH 5.2, 2 volumi di etanolo 100% e mescolare delicatamente per inversione.
15. Precipitare il DNA centrifugando a 20000×g per 30min a T ambiente per eliminare il surnatante.
16. Lavare 2 volte il DNA precipitato aggiungendo 200µl di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 20000×g per 5min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
17. Lasciare asciugare il DNA all'aria 10min e risospendere il precipitato in 50-100µl di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0).

### 3.3.4 Protocollo D - Estrazione in tampone CTAB secondo procedura Doyle e Doyle (1990) modificata.

#### Tampone di estrazione D:

Tris-HCl pH 8.0	100mM
EDTA pH 8.0	20mM
NaCl	1.4M
CTAB	2%(p/v)
β-mercaptoetanololo	2%(v/v)
H <sub>2</sub> O sterile	
PVP	2%(p/v)
Carbone attivo	0.6%(p/v)

#### Protocollo di estrazione D:

1. Pesare 5mg di carbone attivo in un tubo da 2ml, aggiungere 20-30mg di campione polverizzato, 882µl di tampone di estrazione e 18µl di β-mercaptoetanololo.
2. Incubare a T ambiente per 16h in agitazione continua.
3. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1), mescolare delicatamente per almeno 3min.
4. Centrifugare a 20000×g per 10min a T ambiente.
5. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 2ml, se necessario portare a 900µl con nuovo tampone di estrazione e ripetere l'estrazione con cloroformio/alcol isoamilico.

6. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 1.5ml, aggiungere pari volume di isopropanolo e mescolare delicatamente per inversione.
7. Precipitare gli acidi nucleici centrifugando a 20000×g per 30min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
8. Lavare 2 volte il precipitato aggiungendo 400µl di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 20000×g per 5min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
9. Lasciare asciugare precipitato all'aria 5min e risospendere il precipitato in 200µl di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0).
10. Aggiungere 5µg di RNAsi A e incubare a 37°C per 30min.
11. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1), mescolare delicatamente.
12. Centrifugare a 20000×g per 10min a T ambiente e recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 1.5ml.
13. Aggiungere 1/10 di volume di acetato di sodio 3M pH 5.2, 2 volumi di etanolo 100% e mescolare delicatamente per inversione.
14. Precipitare il DNA centrifugando a 20000×g per 30min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
15. Lavare 2 volte il DNA precipitato aggiungendo 200µl di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 20000×g per 5min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
16. Lasciare asciugare il DNA all'aria 5min e risospendere il precipitato in 50-100µl di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0).

### **3.3.5 Protocollo E - Estrazione secondo protocollo D con modifiche derivate da procedura di Tibbits e collaboratori (2006).**

#### Tampone di estrazione E:

Tris-HCl pH 8.0	100mM
EDTA pH 8.0	20mM
NaCl	1.4M
CTAB	2%(p/v)
β-mercaptoetanol	2%(v/v)
H <sub>2</sub> O sterile	
2%(p/v) PVP	
0.6%(p/v) Carbone attivo	

## Materiali e Metodi

### Protocollo di estrazione E:

1. Pesare 5mg di carbone attivo in un tubo da 2ml, aggiungere 20-30mg di campione polverizzato, 882 $\mu$ l di tampone di estrazione e 18 $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanololo.
2. Incubare a T ambiente per 16h in agitazione continua.
3. Centrifugare a 3000 $\times$ g per 10min a T ambiente per precipitare la componente cellulare insolubile.
4. Recuperare il surnatante in un nuovo tubo da 2ml e se necessario portare a 800 $\mu$ l con nuovo tampone di estrazione.
5. Aggiungere 110 $\mu$ l di soluzione NaCl/BSA [4.54M NaCl, 3.63%(p/v) BSA], 5 $\mu$ g di RNAsi A e incubare a 37°C per 30min.
6. Aggiungere pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e mescolare delicatamente per almeno 3min.
7. Centrifugare a 20000 $\times$ g per 10min a T ambiente.
8. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 1.5ml e ripetere l'estrazione con cloroformio/alcol isoamilico.
9. Recuperare la fase acquosa in un nuovo tubo da 1.5ml, aggiungere pari volume di isopropanolo e mescolare delicatamente per inversione.
10. Precipitare il DNA centrifugando a 20000 $\times$ g per 30min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
11. Lavare 2 volte il DNA precipitato aggiungendo 400 $\mu$ l di etanolo 70%(v/v), centrifugare a 20000 $\times$ g per 5min a T ambiente ed eliminare il surnatante.
12. Lasciare asciugare il DNA all'aria 5min e risospendere il DNA in 50-100 $\mu$ l di tampone TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0).

### **3.4 Analisi del DNA genomico**

#### **3.4.1 Quantificazione spettrofotometrica del DNA genomico**

Il DNA è stato controllato quantitativamente e qualitativamente allo spettrofotometro (KONTRON UVICON 930) e attraverso lettura a O.D. 260 (porzione genomica) mentre le contaminazioni dovute a proteine e altri composti organici (polisaccaridi, peptidi, composti fenolici e aromatici) sono state valutate rispettivamente attraverso lettura a O.D. 280 e O.D. 230.

#### **3.4.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA genomico mediante gel di agarosio**

Dopo l'analisi per via spettrofotometrica, l'integrità del DNA ottenuto è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.5%. Data l'inattendibilità di alcune misure spettrofotometriche si è resa inoltre necessaria una ulteriore quantificazione da gel. La quantificazione è stata effettuata confrontando l'intensità della banda ottenuta caricando su gel 2µl di DNA per campione e quella ottenuta da un campione di riferimento a concentrazione nota (350ng/µl).

Il gel colorato con etidio bromuro è stato fotografato con fotocamera digitale CANON Power Shot A620 e analizzato con il programma Kodak digital sciences 1D Images analysis per ottenere una quantificazione più precisa del DNA estratto.

### **3.5 Elettroforesi su gel di agarosio non denaturante per DNA**

Per 50ml di gel:

Agarosio in polvere	Xmg
Tris acetato EDTA * (TAE) 50×	1ml
Etidio bromuro 50mg/l	50µl
Acqua distillata	49ml

[\* = EDTA, acido etilendiamminotetraacetico]

## Materiali e Metodi

Sciogliere l'agarosio in acqua distillata a 80 °C, aggiungere il tampone TAE e lasciare raffreddare alcuni minuti, aggiungere quindi l'etidio bromuro. Versare il gel nell'apposita slitta e lasciare solidificare.

Immergere il gel nella cella elettroforetica e coprire con tampone di corsa TAE 1x. Negli appositi pozzetti caricare i campioni preparati con 2µl di DNA, 7µl di acqua sterile e 1µl di loading buffer 10x (0.41% bromofenolo blu, 0.41% xilene cianolo FF, 50% glicerolo). Collegare gli elettrodi ad un generatore di corrente continua e fare migrare i campioni per circa 30 min a 80V.

### 3.6 Amplificazione PCR-RAPD

Miscela di amplificazione RAPD, reazione standard:

DNA	20ng
Tampone	[75mM Tris-HCl, pH 9.0; 2mM MgCl <sub>2</sub> ; 50mM KCl; 20mM(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]
dNTP	200µM
Primer	25pmol
Taq DNA Polimerasi	1U
Acqua sterile	
Volume totale	25µl

È stato utilizzato un termal cycler MJ-RESEARCH PTC-100.

Programma di amplificazione RAPD:

Denaturazione iniziale a	95°C per 5min	
Denaturazione a	92°C per 40sec	} 40 cicli
Appaiamento del primer RAPD a	36°C per 40sec	
Estensione dei filamenti a	72°C per 2min	
Estensione finale dei filamenti a	72°C per 10min	

Le amplificazioni vengono quindi separate e visualizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% (p/v) e documentate con fotocamera digitale CANON Power Shot A620.

Analisi dei profili RAPD:

I profili RAPD ottenuti con ciascun primer utilizzato sono stati analizzati con il programma Kodak digital sciences 1D Images analysis software, calcolando le dimensioni in paia-basi (bp) di ogni amplicone presente nella corsa elettroforetica di ciascun campione.

I primer RAPD utilizzati sono indicati in **tabella 6**.

**Tabella 6.** Elenco dei primer RAPD utilizzati per l'analisi con relativa sequenza nucleotidica (5' → 3') e temperatura ottimale di appaiamento.

<b>Primer</b>	<b>Sequenza</b>	<b>T di appaiamento (°C)</b>
OPA01	5'-d[CAGGCCCTTC]-3'	34
OPA03	5'-d[AGTCAGCCAC]-3'	32
OPA04	5'-d[AATCGGGCTG]-3'	32
OPA05	5'-d[AGGGGTCTTC]-3'	32
OPA07	5'-d[GAAACGGGTG]-3'	32
OPA09	5'-d[GGGTAACGCC]-3'	34
OPA10	5'-d[GTGATCGCAG]-3'	32
OPA11	5'-d[CAATCGCCGT]-3'	32
OPA12	5'-d[TCGGCGATAG]-3'	32
OPA16	5'-d[AGCCAGCGAA]-3'	32
OPA20	5'-d[GTTGCGATCC]-3'	32
OPB02	5'-d[TGATCCCTGG]-3'	32
OPB08	5'-d[GTCCACACGG]-3'	34
OPB10	5'-d[CTGCTGGGAC]-3'	34
OPB12	5'-d[CCTTGACGCA]-3'	32
OPB13	5'-d[TTCCCCGCT]-3'	34
OPB16	5'-d[TTTGCCCCGGA]-3'	32
OPB19	5'-d[ACCCCCGAAG]-3'	34
OBB20	5'-d[GGACCCTTAC]-3'	32
OPP10	5'-d[TCCCCGCCTAC]-3'	34

## Materiali e Metodi

### 3.7 Tecniche preliminari alla conversione in marcatori genomici SCAR delle bande specifiche individuate attraverso analisi comparativa dei profili di amplificazione RAPD

#### 3.7.1 Eluizione da gel di agarosio

Le bande che dall'analisi dei profili RAPD sono risultate distintive per le specie in esame, sono state eluite da gel di agarosio utilizzando il Quiaquick Gel Purification kit (Quiagen, Valencia, CA), seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

#### 3.7.2 Reazione di ligasi nel vettore di clonaggio pGEM-T-Easy<sup>®</sup>

La reazione lega il frammento di DNA con estremità poli-A protrudenti ottenuto mediante PCR, al vettore plasmidico pGEM-T-Easy<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI), che presenta estremità poli-T protrudenti, per la sua successiva clonazione in un ceppo di laboratorio (XL1B) del batterio *Escherchia coli*.

##### Condizioni di reazione:

Tampone 10×	1μl
pGEM-T-Easy vector	0.5-1μl
DNA inserto	3-5μl
T4 DNA ligasi	1μl
H <sub>2</sub> O sterile	
Volume finale	10μl

La reazione viene incubata a 4°C o/n, poi precipitata con etanolo e risospesa in 4μl di H<sub>2</sub>O sterile.

#### 3.7.4 Preparazione cellule competenti per elettroporazione

10ml di coltura batterica vengono cresciuti o/n in Terreno LB + Tetraciclina. Al mattino viene inoculato 1 litro di LB + Tetraciclina con 2ml di coltura o/n; i batteri vengono fatti crescere

fino a  $O.D._{550} = 0.6$ . Le colture vengono poi versate in 4 bottiglie sterili da 250ml e raffreddate in ghiaccio.

Da questo momento si lavora a 4°C: i batteri vengono raccolti mediante centrifugazione a 5000rpm (rotore J-S 7.5 Beckman) per 15 minuti; il precipitato batterico di ogni bottiglia viene risospeso in 250ml di H<sub>2</sub>O sterile pre-raffreddata a 4°C. Di nuovo si centrifuga a 5000rpm per 15 minuti e il precipitato di ogni bottiglia viene risospeso in 50ml di glicerolo 10% sterile. I batteri vengono poi centrifugati a 3000rpm per 30 minuti. Il pellet complessivo ottenuto dalle 4 bottiglie viene portato ad un volume finale di 1.6ml con glicerolo 10%. Infine 40µl di cellule batteriche vengono subaliquotate in tubi sterili da 1.5ml e congelate in azoto liquido. Le cellule vengono conservate a -80°C.

Composizione terreno di coltura batterica Luria-Bertani, LB (Sambrook *et al.*, 1989):

- 10g/l bacto-tryptone
- 5g/l bacto-yeast extract
- 10g/l NaCl

### **3.7.5 Trasformazione batterica tramite elettroporazione**

Le cuvette sterili monouso da utilizzare per l'elettroporazione vengono tenute in ghiaccio per 10-15 minuti.

L'elettroporatore viene collegato con l'alimentatore settato a:

- 1500Volt
- 25mA
- 25Watt

Nelle cuvette vengono inserite 40µl di cellule competenti e 2µl di plasmide legato al frammento genico di interesse. Mediante l'elettroporatore viene applicato uno shock elettrico, che provoca l'entrata dei plasmidi nelle cellule batteriche. I batteri elettroporati vengono immediatamente risospesi in 1ml di SOC.

## Materiali e Metodi

### Composizione del SOC (Sambrook *et al.*,1989):

- 20g/l bacto-tryptone
- 5g/l bacto-yeast extract
- 0.5g/l NaCl
- 2,5mM KCl

Per ogni ml aggiungere al momento dell'uso:

- 10 $\mu$ l di glucosio 2M
- 10 $\mu$ l Mg 2M

Dopo l'elettroporazione i batteri vengono incubati in agitazione costante a 37°C per un'ora. 400-500 $\mu$ l di sospensione cellulare vengono quindi piastrati su terreno LB solido (2% p/v agar) addizionato di opportuni antibiotici, in questo caso Tetraciclina (10 $\mu$ g/ml) e Ampicillina (100 $\mu$ g/ml), X-gal (32 $\mu$ g/ml) e IPTG (32 $\mu$ g/ $\mu$ l) per lo screening bianco/blu dei cloni positivi. Le piastre vengono incubate a 37°C o/n.

[X-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indoyl-b-D-galactopiranoside; IPTG = isopropylthio-  $\beta$ -D-galactoside]

### **3.7.6 Amplificazione PCR-Colony**

Risospendere con una punta sterile una colonia singola di *E. coli* trasformata attraverso elettroporazione in 20 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile in un microtubo sterile e portare ad ebollizione per 5min.

Utilizzare 5 $\mu$ l come stampo nella reazione PCR e amplificare con i primer forward e reverse del vettore di clonaggio.

Miscela di amplificazione PCR-Colony:

DNA	5 $\mu$ l
Tampone	[75mM Tris-HCl, pH 9.0; 1.8mM MgCl <sub>2</sub> ; 50mM KCl; 20mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]
dNTP	200 $\mu$ M
Primer For	12.5pmol
Primer Rev	12.5pmol
Taq DNA Polimerasi	1U
Acqua sterile	
Volume totale	25 $\mu$ l

Programma di amplificazione PCR-Colony:

Denaturazione iniziale a	94°C per 2min	
Denaturazione a	94°C per 40sec	} 40 cicli
Appaiamento dei primer a	56°C per 40sec	
Estensione dei filamenti a	72°C per 1min	
Estensione finale dei filamenti a	72°C per 5min	

È stato utilizzato un termal cycler MJ-RESEARCH PTC-100.

I prodotti di amplificazione vengono quindi separati e visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% (p/v) e le bande di interesse vengono eluite (Quiaquick Gel Purification kit), precipitate, quantificate e risospese in H<sub>2</sub>O sterile.

**3.7.7 Reazione di sequenziamento**

I campioni che presentano gli amplificati di PCR-Colony delle dimensioni attese, vengono sequenziati. Il metodo si basa sull'interruzione base-specifica della sintesi enzimatica della molecola da sequenziare, causata dall'incorporazione di analoghi dei nucleotidi (2',3'-dideossiribonucleosidi trifosfati) che fungono da terminatori della catena, poiché mancano dell'ossidrilica in 3'.

## Materiali e Metodi

E' stato utilizzato il kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start (Beckman Coulter) seguendo le istruzioni del produttore.

### Componenti di reazione:

DNA	50-100fmol
DTCS Quick Start Master Mix	8µl
Primer 1.6µM	2µl
Acqua sterile	
Volume totale	20µl

### Condizioni di reazione:

Denaturazione a	96°C per 30sec	} 40 cicli
Appaiamento dei primer a	50°C per 30sec	
Estensione dei filamenti a	60°C per 4min	

È stato utilizzato un termal cycler MJ-RESEARCH PTC-100.

I campioni vengono analizzati utilizzando il sequenziatore automatico CEQ 2000 Beckman.

### **3.7.8 Programmi informatici di analisi di sequenza nucleotidica**

Le analisi di omologia di sequenza di DNA, sono state svolte utilizzando i programmi di analisi informatica BlastN, BlastX, and PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1997) settati ai parametri standard. Per l'allineamento delle sequenze è stato utilizzato il programma ClustalW 1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw>) (Chenna *et al.*, 2003).

### 3.8 Amplificazione PCR-SCAR

Miscela di amplificazione SCAR, reazione standard:

DNA	20-100ng
Tampone	[75mM Tris-HCl, pH 9.0; 50mM KCl; 20mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]
MgCl <sub>2</sub>	1.5-2mM
dNTP	200μM
Primer SCAR For	12.5pmol
Primer SCAR Rev	12.5pmol
Taq DNA Polimerasi	1U
Acqua sterile	
Volume totale	25μl

Miscela di amplificazione SCAR, reazione con additivi BSA e Tween 20:

DNA	20-100ng
Tampone	[75mM Tris-HCl, pH 9.0; 50mM KCl; 20mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]
MgCl <sub>2</sub>	1.5-2mM
dNTP	200μM
Primer SCAR For	12.5pmol
Primer SCAR Rev	12.5pmol
BSA	0.4% (p/v)
Tween 20	0.5% (v/v)
Taq DNA Polimerasi	1U
Acqua sterile	
Volume totale	25μl

## Materiali e Metodi

### Programma di amplificazione SCAR:

Denaturazione iniziale a	94°C per 2min	
Denaturazione a	94°C per 40sec	} 40 cicli
Appaiamento dei primer a	X°C per 40sec	
Estensione dei filamenti a	72°C per 40sec	
Estensione finale dei filamenti a	72°C per 5min	

È stato utilizzato un termal cycler MJ-RESEARCH PTC-100.

La temperatura di appaiamento dei primer è in funzione della sequenza degli stessi.

I prodotti di amplificazione vengono quindi separati e visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.5% (p/v) e documentate con fotocamera digitale CANON Power Shot A620.

### **3.9 Estrazione ed analisi degli oli essenziali**

Circa 50 grammi di ogni accessione e campionamento sono stati sottoposti a distillazione in corrente di vapore per 3h con un apparato di tipo micro-Clevenger commerciale. L'olio essenziale estratto è stato successivamente pesato, anidrificato su sodio solfato e conservato in contenitori sigillati di vetro opaco e posto a -10°C sino al momento dell'analisi gascromatografica.

Per poter caratterizzare puntualmente gli oli essenziali nei costituenti sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo sono state utilizzate due tecniche di analisi: gas cromatografia e gag cromatografia associata alla spettrometria di massa. La prima, per poter ottenere un dato quantitativo più preciso; la seconda, per poter puntualmente caratterizzare gli oli da un punto di vista qualitativo.

Gli oli essenziali sono stati analizzati quali-quantitativamente per via gascromatografica, determinando per ciascun componente della miscela volatile, picco e relativa area utilizzando un gascromatografo Agilent Technologies 6890N dotato di un detector FID a ionizzazione di fiamma. Un'aliquota di ogni campione di olio essenziale è stata disciolta in dicloruro di

metilene ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) in un rapporto 1:100 e in seguito 0.5  $\mu\text{l}$  della soluzione ottenuta è stato iniettato nel gascromatografo. La fase stazionaria era costituita da una colonna DB-WAX (J.W. Scientific) (polietilenglicole; diametro interno = 0.30 mm, lunghezza 30 m, spessore del film = 0.25  $\mu\text{m}$ ). Le condizioni operative erano le seguenti: temperatura dell'iniettore 280°C, temperatura al detector 280°C, come gas carrier è stato utilizzato elio (2 ml/min), rapporto di split di 1:40. L'analisi gascromatografica è stata eseguita impostando il seguente programma: la temperatura del forno è stata mantenuta a 40°C per 2 min e poi innalzata a 150°C con una velocità di 10°C/min, a cui ha fatto seguito un ulteriore innalzamento fino a 210°C ad una velocità di 20°C/min, la temperatura è stata poi mantenuta costante per 4 minuti.

I costituenti degli oli essenziali sono stati identificati attraverso un gascromatografo Agilent Technologies 6890N accoppiato ad uno Spettrometro di massa Agilent Technologies 5973N caratterizzato da una sorgente ionica ad impatto elettronico, ed integrato ad una libreria NBS75K. I componenti sono stati identificati comparando i relativi tempi di ritenzione GC, i KI (Indici di Kovats) ed i dati della massa (grado di frammentazione) con analoghi dati relativi ad oli essenziali di composizione conosciuta e con componenti puri. Si è poi proceduto ad un ulteriore confronto tra i dati della massa ottenuti assieme agli indici di ritenzione di ciascun composto con librerie di spettri di massa citate precedentemente a disposizione dello strumento e con altre presenti in letteratura (Adams, 2001; Adams, 2007). Le condizioni sperimentali del gascromatografo e di preparazione del campione erano le stesse descritte per l'analisi precedente. Le condizioni della spettrometria di massa erano le seguenti: voltaggio 70 eV, corrente di emissione 40  $\mu\text{A}$ , 1 scan/sec, range di analisi della massa 35-550 Da, temperatura della sorgente 200°C.

### Analisi statistica:

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il programma informatico: SPSS-17. (Chicago, IL).

### *Interpretazione dei dati:*

Prima di essere sottoposti all'analisi univariata della varianza (ANOVA) i dati relativi all'analisi degli oli essenziali sono stati esaminati con il test di Levene (1960) e in alcuni casi le varianze sono risultate non omogenee, probabilmente a seguito della differente dimensione dei campioni (considerati come i 6 principali taxa di origano presenti nel campo collezione). L'analisi della varianza è stata quindi condotta con il test non parametrico di Kruskal-Wallis

## **Materiali e Metodi**

(Sokal *et al.*, 1995) che non richiede l'omogeneità delle varianze. Il test è l'equivalente non parametrico dell'analisi della varianza, ed è uno dei più potenti per verificare l'ipotesi che  $k$  gruppi indipendenti provengano dalla stessa popolazione. Il test prevede che tutti i dati dei  $k$  gruppi siano considerati come serie unica e convertiti in ranghi, conservando l'informazione del gruppo di appartenenza. Se i campioni provengono dalla stessa popolazione o da popolazioni con la stessa tendenza centrale, le medie aritmetiche dei ranghi di ogni gruppo di osservazioni dovrebbero essere statisticamente simili. Per esaminare le differenze fra i vari taxa, ai dati sono poi stati applicati i confronti multipli della statistica parametrica, in particolare il test di Tukey-Kramer per campioni disomogenei (Soliani *et al.*, 2005).

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Estrazione del DNA genomico

Il passaggio fondamentale per poter compiere un'analisi molecolare genetica di qualsiasi organismo è l'isolamento del DNA genomico. Le caratteristiche degli organismi vegetali quali la presenza della parete cellulare, la presenza di pigmenti e l'enorme eterogeneità chimica per il contenuto di un'ampia varietà di metaboliti secondari, rendono ragione della necessità dello sviluppo di metodiche *ad hoc* per l'estrazione del materiale genetico. Consistenza, grado di processamento in post-raccolta, età, grado di lignificazione, parte di pianta impiegata, periodo di raccolta, peculiarità del metabolismo secondario sono le variabili principali che determinano la strategia di isolamento del DNA (Varma *et al.*, 2007).

In letteratura sono pubblicati numerosi metodi di estrazione del DNA da specie vegetali e nella maggior parte dei casi essi rappresentano varianti ottenute a partire da un ridotto numero di protocolli principali (Murray e Thompson, 1980; Dellaporta *et al.*, 1985; Doyle e Doyle, 1987) modificati in relazione alla natura dei campioni di partenza. Sebbene alcuni protocolli risultino efficaci per un'ampia varietà di specie vegetali, non esiste una metodica universalmente applicabile.

I problemi rilevanti nell'isolamento e purificazione del materiale genetico e partire da specie aromatiche o medicinali includono:

- degradazione del DNA ad opera di endonucleasi liberate durante il processo di lisi cellulare;
- co-isolamento di polisaccaridi altamente viscosi che rendono insolubili e indisponibili gli acidi nucleici conferendo ad essi una consistenza gelatinosa;
- co-isolamento di polifenoli ed altri metaboliti secondari che, legandosi irreversibilmente al DNA a seguito della loro ossidazione operata dagli enzimi cellulari durante la lisi, inibiscono direttamente o indirettamente le reazioni enzimatiche di analisi.

Riguardo alle principali specie in esame in questo lavoro, vari taxa del genere *Origanum*, *Rubus*, *Cistus*, *Rhus* e *Satureja*, esistono poche ricerche che descrivano in modo compiuto ed esaustivo l'estrazione del materiale genetico. Nel lavoro compiuto da Gounaris e collaboratori

(2002) è stata sviluppata un'estrazione basata sul detergente SDS (sodio dodecilsolfato) a partire dal protocollo di Dellaporta e collaboratori (1983.). Un certo numero di autori ha invece utilizzato 'kit di estrazione del DNA' presenti in commercio (Guzmán *et al.*, 2005; Novak *et al.*, 2008; Beziæ *et al.*, 2009; Katsiotis *et al.*, 2009), mentre la maggior parte (Kaufmann *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1997; Klocke *et al.*, 2002; Katsiotis *et al.*, 2003; Yia *et al.*, 2004; Ayanoglu *et al.*, 2006; El-Gengaihi *et al.*, 2006; Padmalatha e Prasad, 2006; Mader *et al.*, 2008; Sözen *et al.*, 2008; Azizi *et al.*, 2009) ha effettuato un isolamento del DNA basato sull'azione del detergente CTAB (cetiltrimetilammonio bromuro).

Tutti i protocolli individuati da questi ricercatori considerano come materiale di partenza organismi o tessuti vegetali freschi e prelevati nello stadio giovanile e non risulta disponibile un protocollo di estrazione in grado di isolare materiale genetico di adeguata qualità quando la specie analizzata è nel periodo di massima produzione di metaboliti e strutture secondarie e/o nello stato essiccato. Entrambe queste condizioni si verificano normalmente per molte specie medicinali e aromatiche presenti in commercio come l'origano Mediterraneo.

La necessità di sviluppare un protocollo di estrazione del DNA genomico comune per tutte le specie vegetali in esame, perché potenzialmente presenti in miscela nei campioni essiccati di origano Mediterraneo oggetto di analisi, in qualsiasi condizione e stato si trovino, è stato il presupposto principale sul quale si è basata una progressiva e continua "limatura" ed ottimizzazione della procedura selezionata.

La resa è stato uno dei principali parametri considerati e il fattore discriminante è stata la capacità del DNA isolato di produrre un profilo di amplificazione attraverso PCR-RAPD (Singh *et al.*, 1999).

Esperimenti preliminari condotti su campioni di *Origanum* spp., *Satureja montana*, *Rhus* spp., *Cistus* spp. e *Rubus* spp., prelevati nel periodo balsamico ed essiccati in laboratorio o presenti in commercio in questo stato, hanno evidenziato che l'isolamento del DNA genomico attraverso il protocollo basato sull'azione del detergente SDS di Gounaris e collaboratori (2002) o attraverso kit di estrazione non era in grado di garantire risultati adeguati. In particolare la resa è risultata estremamente bassa in entrambi i procedimenti e la maggior parte dei campioni di DNA non ha prodotto amplificati quando saggiata in PCR-RAPD (dato non mostrato).

È stata quindi rivolta l'attenzione verso la metodica di isolamento del DNA basata sull'azione del detergente cationico CTAB e questa si è dimostrata in molti casi migliore delle precedenti.

Nel proseguire del progetto, aumentando il numero e la natura dei campioni analizzati, è proseguita la ricerca di sempre più efficaci correzioni alla procedura scelta e questo ha consentito di individuare ed utilizzare 5 protocolli di estrazione del DNA genomico differenti (indicati con le lettere da A ad E), uno conseguente all'altro, (vedi sezione Materiali e Metodi), le cui caratteristiche principali sono riportate in **tabella 7**.

Tutti i protocolli sviluppati si sono dimostrati validi per l'estrazione a partire da materiale fresco e prelevato in uno stadio giovanile, mentre il fattore limitante, motore del continuo processo di sviluppo e di ottimizzazione, è stata la mai completa efficienza a partire da materiale prelevato nel periodo di massima produzione di metaboliti secondari o di origine commerciale.

Infatti le piante aromatiche e medicinali oltre i già citati costituenti della struttura cellulare (tra i quali parete primaria, secondaria e terziaria) contengono quantitativi elevati di polisaccaridi, terpeni, polifenoli e altri metaboliti secondari come alcaloidi, flavonoidi e tannini, che sono all'origine delle loro proprietà. Proprio le sostanze che rendono queste specie interessanti per scopi medici, alimentari o cosmetici, interferiscono con i processi di estrazione e purificazione degli acidi nucleici. I composti fenolici, ad esempio, a seguito di processi ossidativi susseguenti la lisi cellulare, producono sostanze in grado di legarsi irreversibilmente agli acidi nucleici, rendendoli inutilizzabili ai fini dell'analisi,

#### **4.1.1 Protocollo A - Estrazione in tampone CTAB secondo procedura Murray e Thompson (1980) modificata.**

Il primo protocollo di estrazione del DNA genomico è stato sviluppato sulla base di quello individuato da Murray e Thompson (1980). Gli autori, a partire da materiale vegetale polverizzato in mortaio, basano l'isolamento degli acidi nucleici sulla precipitazione selettiva che avviene ad opera del detergente cationico CTAB (cetiltrimetilammonio bromuro) in rapporto alla quantità di sali presenti in soluzione. Infatti ad una temperatura superiore a 15°C, in un tampone di estrazione contenente CTAB 1% e una concentrazione di NaCl superiore a 0.4M, le proteine e la maggior parte dei polisaccaridi formano complessi insolubili con il detergente e possono essere separati dagli acidi nucleici, che restano in soluzione, attraverso passaggi di estrazione con solventi organici (cloroformio ecc). Inoltre, durante il passaggio di precipitazione con isopropanolo, abbassandosi la forza ionica della soluzione, si formano complessi insolubili CTAB-acidi nucleici e diviene solubile la componente polisaccaridica rimanente che può quindi essere separata eliminando il surnatante (Rogers e

Bendich, 1985). Il DNA è quindi purificato dal detergente attraverso i lavaggi con etanolo, nel quale il CTAB si solubilizza.

Nel protocollo A, alla procedura sviluppata da Murray e Thompson sono state apportate numerose modifiche, in particolare è stata aumentata la concentrazione di  $\beta$ -mercaptoetanololo nel tampone di estrazione (Li *et al.* 2002).

Il  $\beta$ -mercaptoetanololo è un forte agente riducente che ha effetto denaturante sulle proteine, scindendone i ponti disolfuro. Esso previene l'ossidazione dei composti fenolici al momento della lisi cellulare, limitandone quindi il legame irreversibile agli acidi nucleici. L'azione del  $\beta$ -mercaptoetanololo si esercita inoltre ostacolando la polimerizzazione dei tannini che può interferire nell'isolamento del DNA in maniera analoga alla componente polisaccaridica (Michiels *et al.*, 2003; Varma *et al.*, 2007). Alla lunga purificazione attraverso centrifugazione in gradiente di CsCl, presente nel protocollo di Murray e Thompson, sono state preferite la precipitazione degli acidi nucleici con alcoli e l'eliminazione del RNA co-isolato attraverso digestione con RNAsi A.

Il protocollo A è estremamente lungo nei passaggi procedurali. Sono numerosi i passaggi nei quali è richiesto il trasferimento delle soluzioni di DNA in nuovi contenitori e quindi suscettibili di contaminazioni. Il volume di estrazione è grande nei primi passaggi, durante i quali sono richiesti quantitativi di soluzioni e solventi dell'ordine del millilitro.

Il protocollo si è dimostrato efficace solo per quei campioni vegetali freschi raccolti nell'accrescimento primaverile, mentre è risultato completamente inadatto all'estrazione di DNA genomico a partire sia da campioni essiccati che da vegetali freschi ma nel periodo balsamico e ricchi in metaboliti secondari come *Origanum* e altre Lamiaceae o con foglie adulte marcatamente xeromorfe come nei generi *Cistus* e *Rhus* (in seguito anche *Olea*).

Come indicato nella **tabella 7**, i rapporti di purezza allo spettrofotometro indicano forti contaminazioni sia proteica che polisaccaridica, la resa in DNA è estremamente bassa (a partire da materiale essiccato è inferiore a 7-10 $\mu$ g per grammo di polvere di partenza) e, soprattutto, per oltre il 50% dei campioni di DNA estratto da campioni essiccati o dai freschi campionati nello stadio maturo, è impossibile ottenere amplificati in PCR, sia considerando in reazione oligonucleotidi aspecifici che primer specifici (dato non mostrato). A seguito del controllo attraverso migrazione elettroforetica su gel di agarosio, il DNA estratto dai campioni essiccati, quando visibile, si presenta degradato, mentre quello originato da materiale vegetale fresco, nelle condizioni indicate in precedenza, resta in gran parte immobilizzato nella matrice di agarosio all'interno del pozzetto di caricamento.

#### 4.1.2 Protocollo B - Estrazione in tampone CTAB a T ambiente con aggiunta di PVP e carbone attivo.

Il secondo protocollo di estrazione del DNA genomico è strettamente derivato dal precedente. Nella composizione del tampone di estrazione l'unica variazione è dovuta all'aggiunta di PVP (polivinilpirrolidone) e carbone attivo.

Il PVP è un polimero solido di alto peso molecolare solubile in acqua, ha azione riducente ed adsorbente dei polifenoli, infatti forma complessi attraverso legami a idrogeno con vari composti fenolici che quindi co-precipitano con i componenti cellulari insolubili. Durante l'estrazione con cloroformio il PVP complessato si posiziona nell'interfaccia tra fase acquosa e fase organica e può essere eliminato (Maliyakal, 1992; Porebski *et al.* 1997; Kim *et al.* 1997).

Il carbone attivo aggiunto al tampone di estrazione aumenta la probabilità che il DNA sia amplificabile attraverso PCR (Vroh Bi *et al.* 1996), interferendo con la formazione dei legami irreversibili tra DNA e polifenoli.

Carbone attivo e PVP agiscono probabilmente in maniera sinergica operando come adsorbenti dei composti fenolici ed impedendone l'ossidazione (Križman *et al.*, 2006; Abolmaaty *et al.*, 2007).

Nel protocollo B ogni passaggio, dall'incubazione in tampone di estrazione alle precipitazioni in alcoli degli acidi nucleici, viene effettuato a T ambiente (24°C) (Padmalatha e Prasad, 2006).

L'estrazione del DNA a partire da materiale non fresco e potenzialmente degradato è spesso migliorata operando un'incubazione prolungata (ottimale 16h) in tampone di estrazione a T ambiente (Rohland e Hofreiter, 2007) che aumenta la resa in DNA integro rispetto all'incubazione a temperature più elevate, mentre la precipitazione con alcoli degli acidi nucleici effettuata a T ambiente, pur diminuendo parzialmente la resa totale rispetto alla precipitazione a basse temperature, riduce notevolmente la contaminazione del DNA con proteine, polisaccaridi e composti aromatici (Križman *et al.*, 2006).

Come indicato nella **tabella 7**, l'estrazione del DNA effettuata con il protocollo B a partire da vegetali essiccati o freschi mostra rapporti di purezza allo spettrofotometro decisamente più alti anche quando la produzione di metaboliti secondari è massima. È comunque presente una

contaminazione dovuta a proteine e metaboliti, ma la resa in DNA è nettamente migliorata rispetto al protocollo precedente.

Il protocollo B presenta i medesimi inconvenienti individuati per il protocollo A relativamente a numero di passaggi operativi e volume di soluzioni impiegato.

Il tempo di incubazione prolungato può considerarsi sconveniente, ma l'effetto sulla resa è decisamente validante la strategia poiché consente di affrontare eventuali ulteriori passaggi di purificazione del DNA, necessari, ma causa di sostanziali perdite di materiale genetico. L'aumento di resa permette infatti di preservare almeno una parte del DNA estratto.

La mancata incubazione a basse temperature durante le precipitazioni con alcoli degli acidi nucleici porta ad un risparmio di tempo di circa 1h.

Quasi il 70% dei campioni di DNA estratto con il protocollo B risulta amplificabile direttamente attraverso PCR, anche se il DNA proveniente da materiale essiccato presenta spesso una forte degradazione quando visualizzato attraverso elettroforesi su gel di agarosio. Per questo tipo di campione risultano dubbi certi profili di PCR-RAPD, poiché si ha scarsa amplificazione di frammenti di medio-alto peso molecolare (dato non mostrato). Buona parte di quei campioni di DNA che risultano non amplificabili in PCR possono divenire tali aggiungendo al protocollo passaggi purificativi, come ulteriori estrazioni con solventi organici e precipitazioni con alcoli, e comportando quindi un notevole aumento in tempi e costi.

#### **4.1.3 Protocollo C - Estrazione doppia in tampone CTAB/NaCl (Marieschi *et al.*, 2009).**

Il protocollo di estrazione del DNA qui indicato è già stato pubblicato sulla rivista "Journal of Agricultural and Food Chemistry", in un articolo che illustra parte dei risultati ottenuti durante questo lavoro di Tesi di Dottorato (Marieschi *et al.*, 2009).

Il protocollo C è basato anch'esso sul lavoro di Murray e Thompson, ma diversamente dal protocollo B, oltre ad una aumentata concentrazione di PVP e CTAB nel tampone di estrazione, presenta l'aggiunta di un secondo passaggio di incubazione in tampone CTAB/NaCl, per incrementare la purificazione degli acidi nucleici in campioni vegetali particolarmente ricchi in polisaccaridi (Pateraki e Kanellis, 2003). Pan e collaboratori (2006) propongono di effettuare anche più di due estrazioni consecutive con CTAB, per rendere amplificabili campioni di DNA altrimenti indisponibili all'analisi mediante PCR.

In questo protocollo la seconda incubazione in tampone CTAB/NaCl viene effettuata a 65°C per 15 min ed è inserita dopo i passaggi di precipitazione con isopropanolo e trattamento con

RNasi A. Tutte le altre indicazioni di concentrazioni, volumi, temperature e tempi ricalcano le indicazioni del protocollo di estrazione B.

Rispetto al precedente, questo protocollo di estrazione porta ad un aumento di quasi 30min del tempo operativo, mentre la resa e qualità del materiale genetico estratto rimane invariata (**tabella 7**). Il sostanziale vantaggio rispetto al protocollo B è che più dell'80% dei campioni di DNA estratto secondo il protocollo C è direttamente amplificabile in PCR-RAPD e la maggior parte dei campioni che risultavano critici se estratti con il protocollo precedente presentano ora una maggiore percentuale di DNA integro e disponibile.

#### **4.1.4 Protocollo D - Estrazione in tampone CTAB secondo procedura Doyle e Doyle (1990) modificata.**

Anche questo protocollo è basato sull'azione del detergente CTAB ed è divenuto una delle metodologie classiche di isolamento del DNA genomico a partire da materiale vegetale fresco. Il protocollo di Doyle e Doyle (1987, 1990) è stato ripreso e corretto da un elevato numero di ricercatori risultando efficace per un ampissimo spettro di specie vegetali, presenta un tampone di estrazione che ricalca quello proposto da Murray e Thompson, ma con concentrazioni di tutti i componenti raddoppiate.

A tale composizione, nel protocollo D, sono state aggiunte le modifiche che si sono mostrate valide nello sviluppo dei protocolli precedenti: l'aggiunta di PVP, carbone attivo, un'elevata concentrazione di  $\beta$ -mercaptoetanololo, un'incubazione in tampone di estrazione prolungata ed effettuata a temperatura ambiente come i passaggi di precipitazione con alcoli.

La nuova formulazione del tampone di estrazione, a seguito di esperimenti preliminari (dati non mostrati), ha consentito una notevole diminuzione dei volumi di estrazione rispetto ai protocolli A B e C ed ha quindi portato allo sviluppo di una procedura estremamente più veloce rispetto alle precedenti.

Il protocollo presenta un numero di passaggi paragonabile ai protocolli precedenti, ma i volumi sia del tampone di estrazione che dei solventi impiegati è stato ridotto dall'ordine del millilitro a quello delle centinaia di microlitri. Tale riduzione, oltre ad un risparmio effettivo di componenti, ha reso estremamente più agevoli e veloci i passaggi procedurali, rendendo l'estrazione di DNA meno suscettibile di contaminazioni. Il protocollo si è dimostrato estremamente efficace sia nella resa che nella purezza del DNA estratto mantenendo elevata

la percentuale di campioni direttamente amplificabile in PCR (95%, vedi **tabella 7**). L'efficacia del nuovo protocollo, che in versione preliminare prevedeva la seconda estrazione in tampone CTAB/NaCl presente nel protocollo C, ha consentito a seguito di prove comparative di considerare tale passaggio superfluo e quindi di eliminarlo.

#### **4.1.5 Protocollo E - Estrazione secondo protocollo D con modifiche derivate da procedura di Tibbits e collaboratori (2006).**

Il tampone di estrazione del DNA genomico è lo stesso del protocollo D del quale sono mantenuti anche i volumi e le condizioni di temperatura e tempi.

Rispetto al protocollo precedente viene introdotta una rimozione preliminare della componente cellulare insolubile attraverso una centrifugazione breve a bassa velocità ed a questa, prima dell'estrazione con cloroformio /alcol isoamilico, viene fatto immediatamente seguire il trattamento con RNasi A con aggiunta di una soluzione concentrata di NaCl/BSA (albumina di siero bovino) indicata da Tibbits e collaboratori (2006).

Attraverso il passaggio di incubazione con una soluzione NaCl/BSA è aumentata nel tampone la concentrazione di NaCl ad un valore di circa 1.8M. Un aumento della concentrazione di NaCl anche a valori superiori a 6M è stato dimostrato migliorare notevolmente la purezza degli acidi nucleici isolati da specie vegetali particolarmente ricche in polisaccaridi (Fang *et al.* 1992; Porebski *et al.*, 1997; Rout *et al.*, 2002; Puchooa, 2004; Varma *et al.* 2007).

La BSA risulta invece efficace come coadiuvante di PVP e  $\beta$ -mercaptoetanololo nella rimozione dei polifenoli impedendo ad essi di sequestrare irreversibilmente gli acidi nucleici (Geuna *et al.* 1998; Tibbits *et al.* 2006; Varma *et al.* 2007).

Il protocollo somma a tutti i vantaggi del protocollo precedente un'estrema velocità di attuazione, infatti la seconda incubazione con soluzione NaCl/BSA avviene in concomitanza al trattamento con RNasi A, senza richiedere tempi aggiuntivi, e alcuni autori hanno suggerito che l'azione dell'enzima risulti più efficace ad alte concentrazioni di NaCl (Struhl, 1989; Ghosh *et al.*, 2009).

Viene inoltre ridotto il numero di passaggi di estrazione con solventi organici, così come viene effettuata un'unica precipitazione con alcoli.

Il protocollo E, pur portando ad una leggera riduzione della resa rispetto al protocollo D, si è dimostrato estremamente efficace perché mantiene l'elevata percentuale di campioni

direttamente amplificabile in PCR riscontrata nel protocollo precedente, ma consente una notevole riduzione di tempo e solventi (vedi **tabella 7**).

**Tabella 7.** Tabella riassuntiva delle caratteristiche principali dei 5 protocolli di estrazione del DNA genomico sviluppati nel corso del lavoro, al fine di ottimizzare l'estrazione da polveri provenienti da materiale vegetale essiccato.

Protocollo di estrazione DNA genomico		A	B	C	D	E
Composizione tampone di estrazione	Tris HCl pH8 (mM)	50	50	50	100	100
	EDTA pH8 (mM)	10	10	10	20	20
	NaCl (M)	0.7	0.7	0.7	1.4	1.4
	CTAB (% p/v)	1	1	2	2	2
	$\beta$ -mercaptoetanololo (% v/v)	2	2	2	2	2
	PVP (% p/v)	-	1	2	2	2
	Carbone attivo (% p/v)	-	0.3	0.3	0.6	0.6
Volume di estrazione (ml)		3	3	3	0.9	0.9
Quantità di vegetale <sup>a</sup> (mg di polvere)		50	30-50	30-50	20-30	20-30
Incubazione in tampone di estrazione (h -°C)		1h-65°C	16h-24°C	16h-24°C	16h-24°C	16h-24°C
2° estrazione CTAB 1%/NaCl 0.7M (Si/No)		No	No	Si	No	No
Trattamento NaCl/BSA (Si/No)		No	No	No	No	Si
Cloroformio/alcol isoamilico (n° passaggi)		3	3	3	3	2
Precipitazione con isopropanolo (Si/No)		Si	Si	Si	Si	Si
Precipitazione con etanolo (Si/No)		Si	Si	Si	Si	No
Resa ( $\mu$ g DNA/g polvere)		10-300	50-700	50-700	50-700	80-500
Rapporti di assorbanza <sup>b</sup>	A260/A280	1.0	1.3	1.3	1.3	1.5
	A260/A230	0.9	1.5	1.5	1.9	1.7
Amplificazione PCR standard <sup>c</sup> (% di successi)		40	65	85	95	95
Durata protocollo <sup>d</sup> (h min)		6h 30min	5h 30min	5-6h	4h	3h

a = Quantità ottimale di polvere in rapporto al volume di tampone di estrazione;

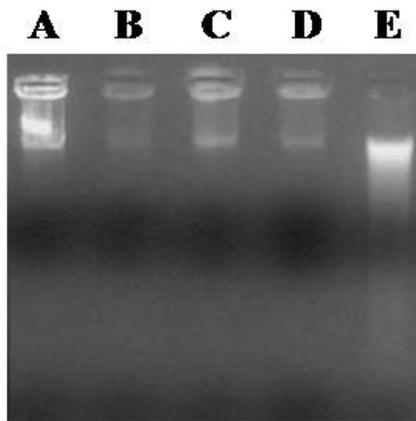
b = Valori medi considerando almeno 20 estrazioni incluse le repliche;

c = Vedi sezione Materiali e Metodi. La percentuale è calcolata considerando almeno 3 amplificazioni per ciascuna estrazione;

d = Durata intesa escludendo il tempo di incubazione in tampone di estrazione e procedure di purificazione aggiuntive.

#### 4.1.6 Purificazione aggiuntiva del DNA non direttamente amplificabile.

In tutti i protocolli sviluppati, anche se con frequenza molto differente, si sono verificati casi nei quali il DNA estratto è risultato fortemente degradato e/o contaminato da carboidrati e/o composti fenolici (**figura 5**) in entità tale da risultare indisponibile per l'amplificazione PCR in condizioni standard (vedi sezione Materiali e Metodi).



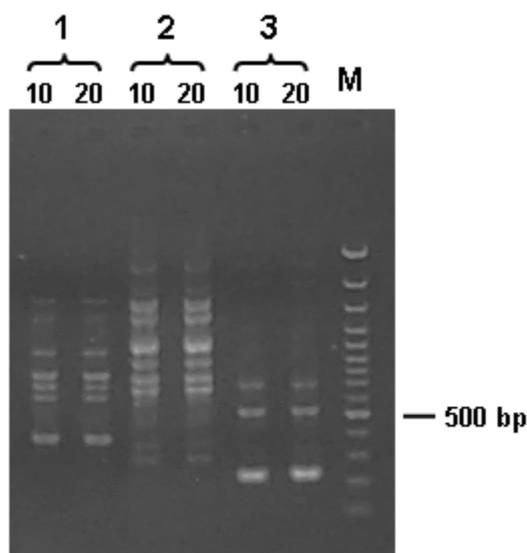
**Figura 5.** Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (p/v) di DNA genomico estratto da 5 campioni differenti di Origano Mediterraneo. Nella corsia A è evidente la forte contaminazione del campione con composti inibenti la migrazione elettroforetica.

Per questi campioni si sono resi necessari passaggi aggiuntivi di isolamento della frazione integra e purificazione dalle sostanze contaminanti co-isolate con il DNA.

In tutti i campioni, un passaggio di purificazione attraverso eluizione da gel di agarosio della porzione integra di DNA genomico, con NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), ha permesso di ripristinare la disponibilità per l'amplificazione PCR. Il nuovo passaggio ha però comportato una perdita di DNA quantificabile tra il 50% e il 60% della resa iniziale ed un notevole incremento nei tempi e nel costo complessivo delle analisi.

## 4.2 Analisi PCR-RAPD

Tra le variabili più influenti sulla riproducibilità della tecnica PCR-RAPD è indicata la concentrazione del DNA utilizzata come stampo per la reazione PCR (Jones *et al.*, 1997; Nieri *et al.*, 2003). Al fine di individuare i quantitativi di DNA ottimali, sono state effettuate prove preliminari considerando concentrazioni di 10 e 20 ng di DNA stampo in reazione PCR-RAPD. Entrambe le quantità hanno consentito di ottenere un profilo di amplificazione stabile e quindi riproducibile (**figura 6**).



**Figura 6.** Profilo di amplificazione PCR-RAPD ottenuto con il primer OPB02. Sono confrontate le reazioni ottenute con concentrazioni di 10 e 20ng di DNA stampo, per tre specie vegetali differenti. 1, DNA estratto da *Origanum vulgare*; 2, *Cistus incanus*; 3, *Rubus caesius*; M, Marcatore di peso molecolare (bp). Corsa elettroforetica effettuata su gel di agarosio (2% p/v).

Le reazioni PCR-RAPD successive sono state effettuate ponendo in reazione 10ng di DNA stampo. È stata scelta la condizione di diluizione più elevata perché, pur mantenendosi il profilo di amplificazione caratteristico della reazione, consente una maggiore diluizione anche di eventuali sostanze co-isolate durante le estrazioni del DNA genomico e potenzialmente inibenti la PCR, con un adeguato rapporto segnale/rumore.

#### 4.2.1 Scelta dei marcatori RAPD per i contaminanti del gruppo I

Stabilite le condizioni di reazione, per ciascuno dei 20 primer RAPD considerati (**tabella 3**), sono state condotte le amplificazioni PCR confrontando in parallelo i profili elettroforetici ottenuti dal DNA estratto da individui freschi dei contaminanti del gruppo I (*Rhus coriaria*, *Rubus caesius* e *Cistus incanus*), con i profili del DNA estratto da individui freschi dei taxa *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietsw., *O. onites* L., (taxa indicati nella monografia ‘*Origani herba*’ della Ph. Eur.) e i 5 taxa più diffusi del genere, *O. vulgare* L., *O. vulgare* L. subsp. *vulgare*, *O. heracleoticum* L. (sin. *O. vulgare* L. subsp. *viride* Hayek), *O. vulgare* L. subsp. *virens* Ietsw. compreso il taxon *O. majorana* L che viene considerato un contaminante. Il confronto dei profili di amplificazione ottenuti con ciascun primer RAPD per ogni singola specie è volto ad individuare i frammenti (ampliconi) caratteristici di ciascuna specie contaminante, perchè assenti in tutti i profili ottenuti con lo stesso primer per i principali taxa del genere *Origanum*.

Le bande caratteristiche individuate con ciascun primer RAPD per ognuna delle tre specie *C. incanus*, *R. caesius* e *R. coriaria*, quando riproducibili con intensità costante in almeno tre amplificazioni distinte (Fracaro *et al.*, 2005; Neeraj *et al.*, 2008), sono state considerate specifiche dei profili dei contaminanti.

Nella **tabella 8** sono riportati, indicandone il peso molecolare (pb), gli ampliconi caratteristici dei contaminanti, individuati con ciascuno dei primer RAPD considerati.

**Tabella 8.** Lista dei 20 primer RAPD utilizzati e delle bande di amplificazione specifiche per i contaminanti del gruppo I, *Cistus incanus*, *Rubus caesius* e *Rhus coriaria*, individuate con ciascuno di essi, caratterizzate per dimensioni molecolari (bp). Ogni amplicone individuato per ciascun contaminante è assente nel profilo di amplificazione RAPD dei taxa del genere *Origanum* utilizzati come controllo.

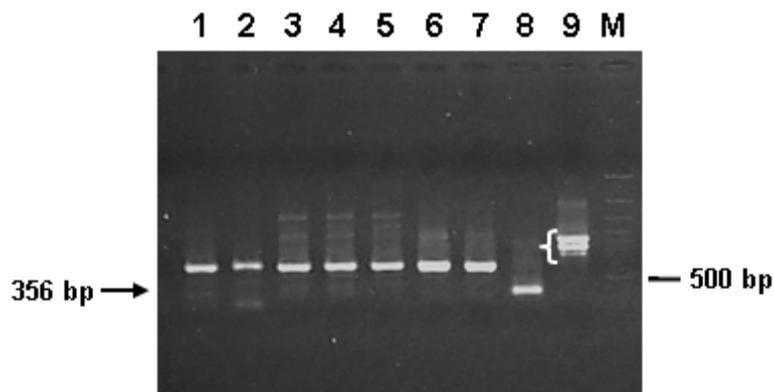
Primer	<i>Cistus incanus</i>	<i>Rubus caesius</i>	<i>Rhus coriaria</i>
OPA01	984	471	-
OPA03	-	-	-
OPA04	444	444	-
OPA05	-	-	682; 507; 388
OPA07	356	1142, 980, 842	1566; 1141; 851; 442
OPA09	1309	2365; 1848, 1615	868
OPA10	1270	-	428; 280
OPA11	456	1110	286
OPA12	-	-	-
OPA16	344	-	801
OPA20	1293; 1021	1021; 806; 317	1298; 1072; 956; 559
OPB02	893	513; 231	-
OPB08	549; 445	-	-
OPB10	-	-	310
OPB12	-	-	-
OPB13	-	-	594; 484; 355
OPB16	-	-	-
OPB19	-	-	-
OBB20	-	-	-
OPP10	-	2096; 1799; 1213; 604	310

- = Nessun amplicone specifico individuato.

Alcuni di questi ampliconi sono stati scelti per essere saggiati come potenziali marcatori molecolari specifici di ciascun contaminante del gruppo I, in particolare sono stati preferiti i frammenti di medio-basso peso molecolare, perché presumibilmente amplificabili con maggior probabilità anche a partire da DNA estratto da campioni vegetali essiccati e potenzialmente degradati.

In **figura 7** è riportato come esempio il profilo di amplificazione ottenuto utilizzando in reazione il primer RAPD OPA07. Sono evidenti: un'intensa banda monomorfica per tutti i taxa del genere *Origanum* considerati (corsie 1-7), avente dimensione molecolare di circa 670bp, una singola banda intensa di 356bp caratteristica del contaminante *C. incanus* (corsia

8) e tre ampliconi di elevato peso molecolare (1142, 980, 842bp) presenti unicamente nel profilo ottenuto da *R. caesius* (corsia 9).

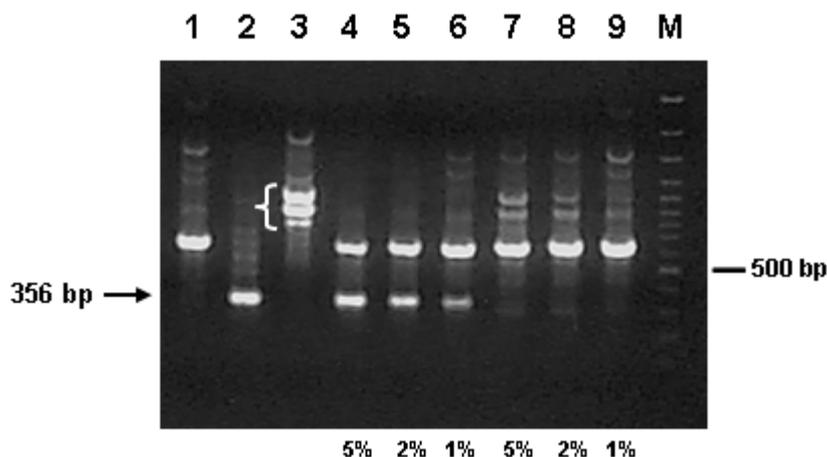


**Figura 7.** Profilo di amplificazione PCR-RAPD ottenuto con il primer OPA07. 1, *O. vulgare*; 2, *O. vulgare* subsp. *vulgare*; 3, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 4, *O. vulgare* subsp. *virens*; 5, *O. heracleoticum* L.; 6, *O. onites*; 7, *O. majorana*; 8 - *Cistus incanus*; 9, *Rubus caesius*; M, Marcatore di peso molecolare (bp). Con la freccia nera è indicata la posizione della banda di 356bp specifica del profilo ottenuto dal contaminante *C. incanus* (corsia 8); la parentesi bianca segnala i tre ampliconi di 1142, 980 e 842bp specifici del profilo di *R. caesius* (corsia 9). È ben evidente l'intensa banda di 670bp monomorfica per il genere *Origanum*, presente in tutti i taxa considerati (corsie 1-7).

Il primer OPA07, per le ragioni descritte precedentemente, è stato scelto come candidato per la marcatura del contaminante *C. incanus*, ma non per *R. caesius*, per il quale invece è stato considerato l'amplicone specifico di 317bp, ottenuto con il primer OPA20. Il primer OPA11 ha invece prodotto un frammento specifico di 286bp che è stato utilizzato per la marcatura di *R. coriaria* (tabella 8).

Come prima conferma dell'attendibilità degli ampliconi RAPD selezionati per ciascuno dei tre contaminanti, è stata testata la loro riproducibilità amplificando in reazione PCR-RAPD miscele di DNA, ottenute aggiungendo al DNA estratto da foglie fresche di *O. vulgare* subsp. *hirtum* il DNA estratto da ciascun contaminante, in tre miscele distinte per percentuale p/p di DNA di contaminante (1, 2 e 5%). Come mostrato in **figura 8**, le miscele di DNA *Origanum/Cistus* e *Origanum/Rubus*, amplificate in PCR con il primer OPA07, presentano nel profilo elettroforetico gli ampliconi riconosciuti come caratteristici dei due contaminanti, chiaramente individuabili anche quando il DNA del contaminante è in miscela all'1% (p/p).

Le bande marcatrici sono amplificate solo quando è presente in reazione il DNA del contaminante per il quale sono state selezionate.

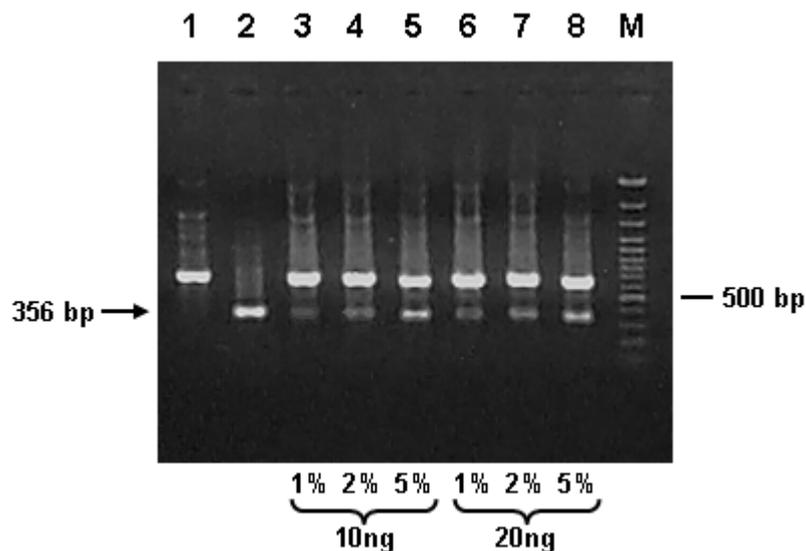


**Figura 8.** Analisi RAPD di DNA estratto da *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *Cistus incanus* e *Rubus caesius*, sia singolo che in miscele *Origanum/Cistus* e *Origanum/Rubus*. Le reazioni PCR sono effettuate con il primer OPA07. Nelle miscele il DNA genomico di ogni singolo contaminante è mescolato al DNA di *Origanum* in tre percentuali differenti (indicate alla base della figura). 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *C. incanus*; 3, *R. caesius*; 4, 5, 6, miscele *Origanum/C. incanus*; 7, 8, 9, miscele *Origanum/R. caesius*; M, Marcatore di peso molecolare (bp). Con la freccia nera è indicata la posizione della banda di 356bp specifica del contaminante *C.s incanus* (corsie 2, 4, 5, 6); la parentesi bianca segnala i tre ampliconi di 1142, 980 e 842bp specifici del profilo di *R. caesius* (corsie 3, 7, 8, 9).

#### 4.2.2 Sensibilità dei marcatori RAPD

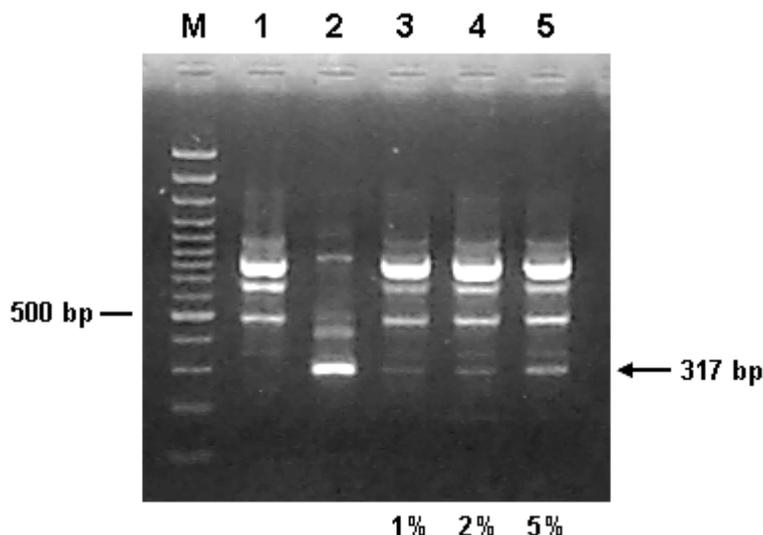
Per confermare la riproducibilità degli ampliconi RAPD individuati anche in preparati vegetali complessi, sono state create miscele artificiali *Origanum*/contaminante (1, 2 e 5% p/p di contaminante), a partire da materiale vegetale fresco. Il DNA è stato quindi estratto indipendentemente da ciascuna miscela.

In **figura 9**, è mostrato il profilo elettroforetico delle reazioni PCR compiute sul DNA isolato dalle miscele di foglie fresche *Origanum/Cistus* con il primer OPA07. Come ulteriore conferma della riproducibilità dei profili, per ogni miscela sono state poste in reazione due quantità distinte di DNA (10 e 20ng). In tutte le reazioni analizzate, l'amplicone caratteristico del profilo di *Cistus* (356bp) è chiaramente individuabile in tutte le condizioni in cui la specie è presente (corsie 2-8), anche se alla percentuale dell'1% (corsie 3 e 6).



**Figura 9.** Analisi RAPD di DNA estratto da miscele di foglie fresche di *O. vulgare* subsp. *hirtum* e *Cistus incanus*. Le foglie fresche della specie contaminante sono state aggiunte in tre percentuali differenti (indicate alla base della figura) alle foglie fresche di *Origanum*, prima dell'estrazione del DNA genomico. Le reazioni sono state effettuate con il primer OPA07 considerando sia 10ng (corsie 3, 4, 5) che 20ng (corsie 6, 7, 8) di DNA stampo per ciascuna miscela. 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *C. incanus*; 3-8, miscele *Origanum/Cistus*; M, Marcatore di peso molecolare (bp). La freccia nera indica la posizione dell'amplicone di 356bp specifico del contaminante *C. incanus* (corsie 2-8).

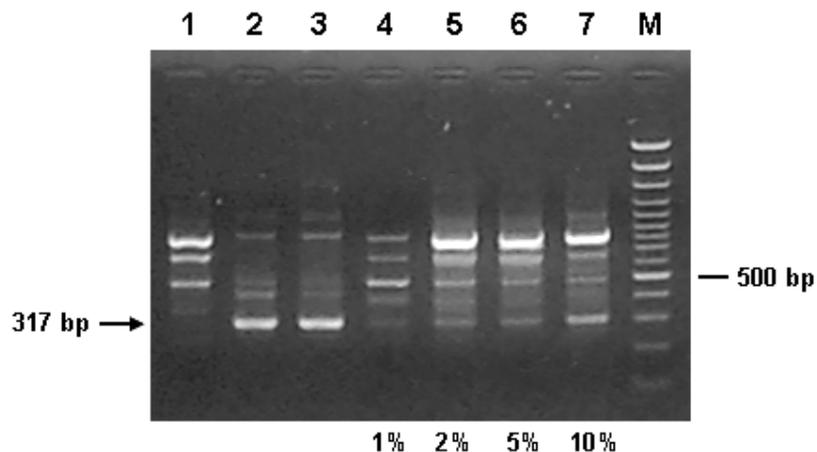
In **figura 10** è invece mostrato il risultato ottenuto a seguito dell'amplificazione PCR con il primer OPA20, a partire da 20ng di DNA estratto da miscele artificiali di foglie fresche *Origanum/R. caesius*, nelle quali il contaminante è presente in tre differenti percentuali p/p (1, 2 e 5%). L'amplicone di 317bp, caratteristico del profilo di *R. caesius*, anche in questo caso risulta sempre chiaramente individuabile quando il DNA posto in reazione sia estratto da campioni che contengono la specie contaminante, anche se solo all'1% (corsia 3).



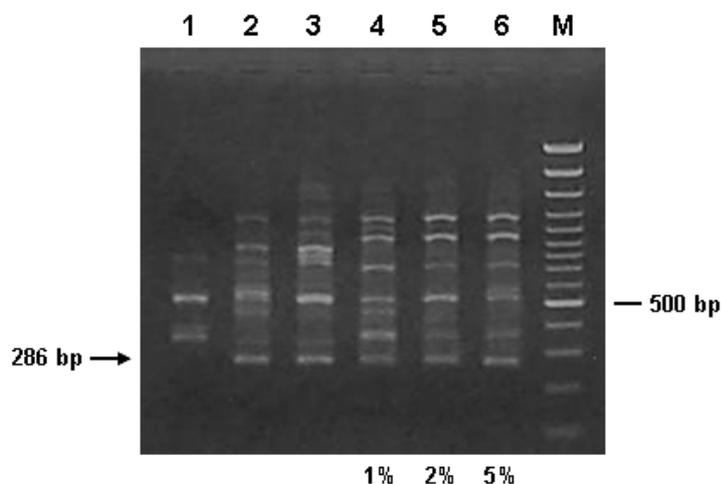
**Figura 10.** Analisi RAPD effettuata con il primer OPA20, di DNA estratto da miscele di foglie fresche di *O. vulgare* subsp. *hirtum* e *Rubus caesius*. Le foglie fresche della specie contaminante sono state aggiunte in tre percentuali differenti (indicate alla base della figura) alle foglie fresche di *Origanum*, prima dell'estrazione del DNA genomico. 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *R. caesius*; 3, 4, 5, miscela *Origanum/R. caesius*; M, Marcatore di peso molecolare (bp). La freccia nera indica la posizione dell'amplicone di 317bp specifico di *R. caesius* (corsie 2-5).

Il metodo di individuazione dei contaminanti *Cistus incanus*, *Rubus caesius* e *Rhus coriaria* è stato quindi esteso a miscele artificiali *Origanum*/contaminante, derivate da vegetali essiccati, mimando le condizioni dei campioni di droga commercializzati.

Nelle **figure 11** e **12** sono mostrati i risultati dell'analisi RAPD effettuate sulle miscele artificiali essiccate *Origanum/R. caesius* e *Origanum/R. coriaria*. La sensibilità della tecnica è evidente anche in questo tipo di campioni, dove la banda RAPD marcatrice, selezionata per ogni specifico contaminante, è chiaramente visibile anche nelle miscele dove il contaminante è presente solo all'1% (*Rubus*, **figura 11**, corsia 4; *Rhus*, **figura 12**, corsia 4).



**Figura 11.** Analisi RAPD effettuata con il primer OPA20, di DNA estratto da miscele di foglie essiccate di *O. vulgare* subsp. *hirtum* e *R. caesius*. Le foglie essiccate della specie contaminante sono state aggiunte in quattro percentuali differenti (indicate alla base della figura) alle foglie essiccate di *Origanum*, prima dell'estrazione del DNA genomico. DNA estratto da foglie fresche di *R. caesius* è utilizzato come ulteriore controllo della reazione (corsia 2). 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *R. caesius* fresco; 3, *R. caesius* essiccato; 4, 5, 6, 7 miscele essiccate *Origanum/R. caesius*; M, Marcatore di peso molecolare (bp). La freccia nera indica la posizione dell'amplicone di 317bp specifico di *R. caesius* (corsie 2-7).



**Figura 12.** Analisi RAPD effettuata con il primer OPA11, di DNA estratto da miscele di foglie essiccate di *O. vulgare* subsp. *hirtum* e *R. coriaria*. Le foglie essiccate della specie contaminante sono state aggiunte in tre percentuali differenti (indicate alla base della figura) alle foglie essiccate di *Origanum*, prima dell'estrazione del DNA genomico. DNA estratto da foglie fresche di *R. coriaria* è utilizzato come ulteriore controllo della reazione (corsia 2). 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *R. coriaria* fresco; 3, *R. coriaria* essiccato; 4, 5, 6, miscele essiccate *Origanum/R. coriaria*; M, Marcatore di peso molecolare (bp). La freccia nera indica la posizione dell'amplicone di 286bp specifico di *R. coriaria* (corsie 2-6).

### 4.2.3 Validazione dei marcatori RAPD

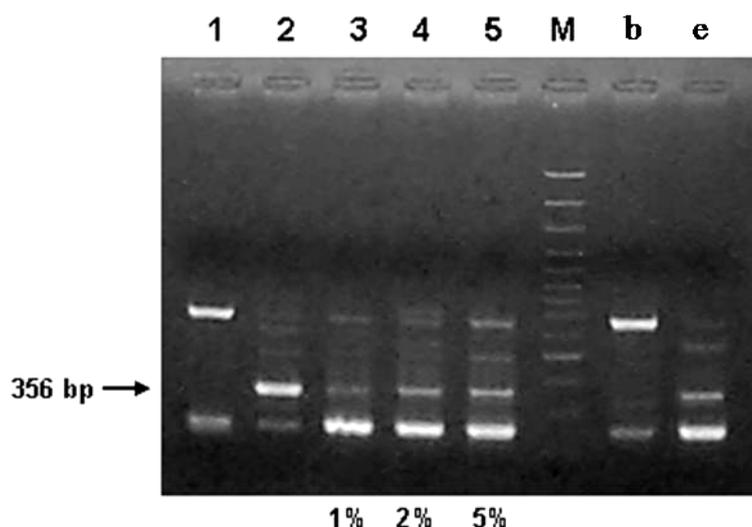
Come prova conclusiva della validità dei marcatori selezionati, l'analisi è stata effettuata sul DNA genomico estratto da campioni di Origano Mediterraneo provenienti dal mercato la cui composizione era già stata stabilita attraverso il saggio microscopico farmacognostico (tabella 9).

**Tabella 9.** Composizione di alcuni campioni commerciali di Origano Mediterraneo individuata attraverso saggio microscopico farmacognostico.

Campione	Specie vegetali individuate(% p/p)						
	Origano Med. *	<i>Origanum majorana</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Cistus incanus</i>	<i>Rubus</i> sp.	<i>Rhus coriaria</i>	Altro
a	36.47%	7.08%	55.13%	1.07%	0.00%	0.24%	0.00%
b	55.36%	8.62%	23.55%	0.00%	0.97%	0.00%	11.49%
c	92.57%	3.11%	2.30%	0.00%	2.00%	0.00%	0.02%
d	95.92%	0.00%	3.33%	0.00%	0.69%	0.06%	0.00%
e	74.36%	0.00%	7.78%	16.44%	0.00%	0.00%	1.42%
f	25.29%	0.45%	24.63%	46.16%	0.00%	1.16%	2.31%

\* = *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* e/o *Origanum onites* conformemente a Ph. Eur.

Nella **figura 13** (corsie b, e) è mostrato un esempio dell'analisi applicata a campioni commerciali di Origano Mediterraneo, di composizione nota. L'analisi microscopica ha individuato una presenza al 16% p/p del contaminante *C. incanus* nel campione (e), mentre tale specie non è stata individuata nel campione (b). Attraverso la reazione RAPD effettuata con il primer OPA07, la banda caratteristica di 356bp specifica di *Cistus* è chiaramente evidente nel campione (e) ed assente nel campione (b), confermando le analisi microscopiche e l'efficacia dei marcatori genomici individuati.



**Figura 13.** Analisi RAPD effettuata con il primer OPA07, di DNA estratto da miscele artificiali di foglie essiccate di *O. vulgare* subsp. *hirtum* e *C. incanus*, in tre percentuali differenti (indicate alla base della figura) e di DNA estratto da campioni commerciali reali di Origanum Mediterraneo (corsie b, e). 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *C. incanus* essiccato; 3, 4, 5, miscele artificiali essiccate *Origanum/C. incanus*; M, Marcatore di peso molecolare (bp); b, campione commerciale di Origanum Mediterraneo non contenente il contaminante *C. incanus*; e, campione commerciale di Origanum Mediterraneo nel quale *Cistus* è stato rilevato in percentuale superiore al 10%. La freccia nera indica la posizione dell'amplicone di 356bp specifico di *C. incanus* (corsie 2-6, e).

#### 4.2.4 Scelta dei marcatori RAPD per i contaminanti del gruppo II

Tra i contaminanti più frequentemente individuati attraverso saggi microscopici in campioni commerciali di Origanum Mediterraneo sono stati identificati *Origanum majorana* e *Satureja montana* (tabella 1). Entrambe le specie appartengono alla stessa famiglia (Lamiaceae) ed il contaminante *O. majorana* è co-genere dei taxa regolamentari indicati dalla Ph. Eur. nella monografia '*Origani herba*'. Un'indagine effettuata con l'ausilio di marcatori molecolari genomici per l'identificazione e distinzione di queste due specie di contaminanti deve quindi considerare la grande vicinanza genetica con la droga in esame che le caratterizza.

Come già evidenziato, tutti i campioni di Origanum Mediterraneo presenti in commercio provengono dal bacino del Mediterraneo, area nella quale sono presenti ben 46 taxa del genere *Origanum* (figura 1). Lo stato della droga (essiccata, polverizzata o frantumata) rende estremamente laboriosa l'individuazione, tramite saggi microscopici, dei caratteri morfologici discriminanti le specie vegetali coinvolte e in maggior misura è difficoltoso distinguere tra i taxa di un unico genere.

Un approccio di indagine basato sull'analisi genomica esclude la dipendenza da caratteri discriminanti di tipo morfologico, consente di velocizzare i tempi necessari per lo screening di numeri elevati di campioni ma richiede, per essere sviluppato, il confronto fra il maggior numero possibile di genomi simili potenzialmente presenti nella miscela.

Per questi motivi si è reso necessario l'allestimento di un campo collezione del genere *Origanum* presso l'azienda 'Giardino delle erbe' di Casola Valsenio (RA), reperendo germoplasma dei principali taxa, di interesse commerciale e non, di differente origine geografica (*O. majorana* L., *O. onites* L., *O. vulgare* L., *O. vulgare* L. subsp. *vulgare*, *O. vulgare* L. subsp. *gracile* Ietsw., *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* Ietsw., *O. vulgare* L. subsp. *virens* Ietsw., *O. vulgare* L. subsp. *viride* Hayek, *O. heracleoticum* L.), allo scopo di avere a disposizione la maggior variabilità possibile all'interno del genere.

Quarantotto accessioni di questi taxa sono state seminate e coltivate in serra e quattro individui per ogni accessione, distinti da una lettera (A, B, C, D), sono stati trapiantati nel campo collezione (**tabella 5** del capitolo Materiali e Metodi).

L'analisi tramite PCR-RAPD è stata effettuata confrontando i profili di amplificazione dei genomi dei contaminanti del gruppo II, *Satureja montana* e *Origanum majorana*, con i profili di amplificazione di 35 accessioni dei principali taxa del genere *Origanum* presenti nel campo collezione allestito presso il 'Giardino delle erbe' di Casola Valsenio, ottenuti con 12 dei 20 primer RAPD a disposizione.

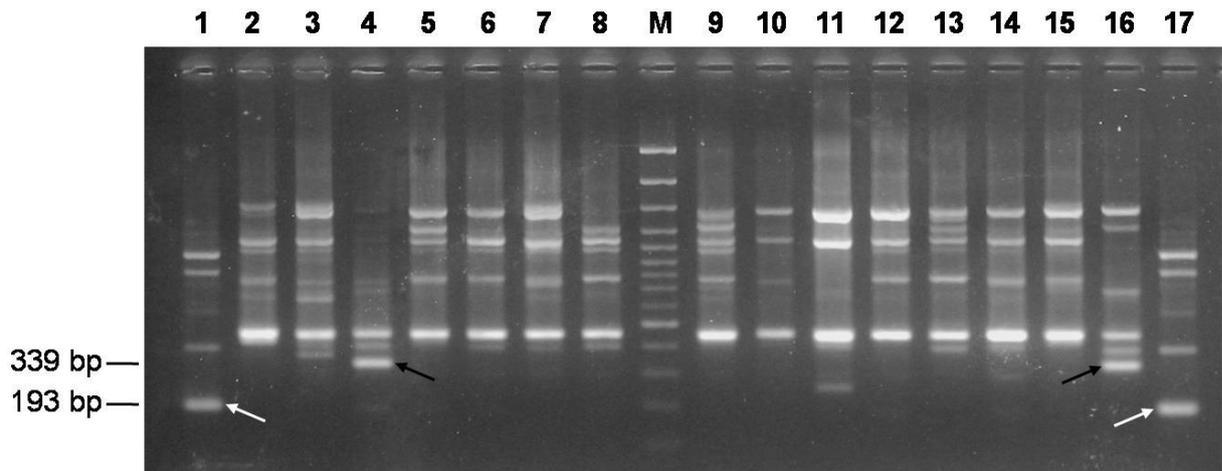
Per ogni primer RAPD, le bande presenti nei singoli profili relativi ai due contaminanti in esame, ed assenti in tutte le accessioni del genere *Origanum* confrontate, sono state riportate in tabella (**tabella 10**), così come era avvenuto per la ricerca dei marcatori specifici di ciascun contaminante del gruppo I.

**Tabella 10.** Lista dei primer RAPD utilizzati e delle bande di amplificazione specifiche per i contaminanti del gruppo II, *Origanum majorana* e *Satureja montana*, individuate con ciascuno di essi, caratterizzate per dimensioni molecolari (pb). Ogni amplicone individuato per ciascun contaminante è assente nel profilo di amplificazione RAPD dei taxa del genere *Origanum* utilizzati come controllo.

Primer	<i>Origanum majorana</i>	<i>Satureja montana</i>
OPA01	1461; 869	332
OPA03	-	-
OPA04	1120	-
OPA05	-	783
OPA09	339	193
OPB08	-	-
OPB10	690; 553	987; 751
OPB12	-	-
OPB13	-	-
OPB16	412	1606-
OPB19	-	-
OPB20	-	398-

- = Nessun amplicone specifico individuato.

In particolare, come mostrato in **figura 14**, il primer OPA09, ha consentito di individuare un amplicone di 339bp caratteristico dei profili delle sole accessioni appartenenti al taxon *O. majorana* (corsie 4, 16), e al contempo una banda di più basso peso molecolare (193bp) presente unicamente nelle reazioni dove è stato amplificato il DNA del contaminante *S. montana* (corsie 1, 17).



**Figura 14.** Analisi RAPD effettuata con il primer OPA09, di DNA estratto da alcune delle accessioni (indicate tra parentesi) del genere *Origanum* presenti nel campo collezione di Casola Valsenio, tra le quali *O. majorana*, e da *Satureja montana*. 1, 17, *S. montana*; 2, *O. heracleoticum* L. (55A); 3, *O. onites* (59A); 4, *O. majorana* (1A); 5, *O. v. subsp. vulgare* (14A); 6, *O. v. subsp. vulgare* (16A); 7, *O. v. subsp. vulgare* “compactum” (21A); 8, *O. v. subsp. viride* (22A); M, marcatore di dimensione molecolare; 9, *O. v. subsp. vulgare* “compactum” (30A); 10, *O. v. subsp. virens* (35A); 11, *O. v. subsp. virens* (40A); 12, *O. v. subsp. hirtum* (41A); 13, *O. v. subsp. viride* × *O. majorana* (42A); 14, *O. v. subsp. viride* (47A); 15, *O. v. subsp. hirtum* (51A); 16, *O. majorana* (58A). Le frecce nere indicano l’amplicone di 339bp caratteristico dei profili delle accessioni del taxon *O. majorana* (corsie 4, 16); Le frecce bianche segnalano la banda caratteristica di 193bp del profilo di *S. montana* (corsie 1, 17).

Attraverso il primer OPA09, è stato dunque possibile identificare la presenza delle due specie *O. majorana* e *S. montana* anche all’interno di miscele di *Origanum* contenenti questi due contaminanti, grazie all’identificazione delle bande caratteristiche delle due specie nel profilo di amplificazione del DNA genomico estratto dai campioni (dato non mostrato).

L’analisi dei campioni commercializzati di Origano Mediterraneo è stata subordinata alla trasformazione di questi frammenti RAPD specifici dei contaminanti del gruppo II, in una seconda categoria di marcatori molecolari genomici, come illustrato nella sezione successiva.



### **4.3 Sviluppo dei marcatori molecolari genomici SCAR**

La tecnica PCR-RAPD ha il limite di essere estremamente sensibile ai cambiamenti delle condizioni di reazione ed è perciò difficile riprodurre un determinato risultato in laboratori differenti, la trasferibilità del metodo di indagine è infatti fortemente correlata al mantenimento rigoroso di tutte le condizioni sperimentali nelle quali il risultato è stato ottenuto. Per ovviare a questo inconveniente, ogni polimorfismo arbitrario individuato con la tecnica RAPD può essere “irrobustito”, ovvero reso riproducibile e trasferibile in ogni condizione, convertendone gli elementi caratteristici in un secondo tipo di marcatore molecolare genomico altamente specifico, definito SCAR (Sequence Characterized Amplified Region).

#### **4.3.1 Isolamento e sequenziamento dei marcatori RAPD contaminante specifici e costruzione dei primer SCAR corrispondenti**

Lo sviluppo di marcatori genomici SCAR richiede la conoscenza delle sequenze di genoma destinate a divenire marcatrici di una particolare specie, a questo scopo sono stati selezionati per essere sequenziati 7 ampliconi RAPD (**tabella 11**), almeno uno per specie, tra quelli risultati caratteristici di ciascun contaminante vegetale di Origano Mediterraneo (**tabelle 8 e 10**).

Tabella 11. Lista degli ampliconi RAPD specifici, selezionati per essere convertiti in marcatori molecolari SCAR. Ogni amplicone è indicato per dimensioni molecolari (bp), sulla riga corrispondente al primer RAPD con il quale è amplificato e nella colonna corrispondente al taxon vegetale del quale è risultato specifico.

Primer RAPD	Taxon							
	<i>Cistus incanus</i>	<i>Rubus caesius</i>	<i>Rhus coriaria</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Origanum majorana</i>	<i>O. vu. subsp. hirtum</i>	<i>Origanum onites</i>	<i>Origanum vulgare</i>
OPA07	356				670 <sup>a</sup>	670	670	670
OPA09				193	339			
OPB13			355					
OPB02		231						
OPP10			310					

a = L'amplicone di 670bp, ottenuto con il primer OPA07, monomorfo per il genere *Origanum*, è stato isolato distintamente dai profili RAPD di ciascuno dei 4 taxa indicati.

Ciascun amplicone è stato escisso dal gel elettroforetico utilizzando un bisturi con lama sterile e i frammenti di DNA isolati sono stati eluiti e purificati dal gel di agarosio attraverso 'Quiaquick Gel Purification kit'. Ogni frammento è stato ligato nel vettore di clonaggio pGEM-T-Easy<sup>®</sup> e quindi utilizzato per trasformare il ceppo XL1B del batterio *Escherichia coli*. Le colonie batteriche trasformate sono state selezionate attraverso lo screening bianco-blu e la presenza dell'inserto è stata valutata attraverso PCR-Colony, utilizzando i primer For e Rev costruiti sulle sequenze del vettore plasmidico alle due estremità del sito di clonaggio. I frammenti delle corrette dimensioni sono stati quindi eluiti da gel e sequenziati attraverso il metodo di terminazione al 3' della catena nucleotidica, utilizzando 'CEQ 2000 DTCS Quick Start kit' con i primer For e Rev del vettore plasmidico.

Le sequenze ottenute sono state inviate alla banca dati informatica dbGSS/GenBank. Il numero di accessione in banca dati per la consultazione *in silico* di ciascuna sequenza è riportato nella **tabella 12**, in corrispondenza del nome attribuito a ciascun amplicone RAPD (tale nome è una sigla che fornisce indicazioni del primer RAPD, delle dimensioni molecolari dell'amplicone e della specie vegetale dalla quale è isolato). Dall'analisi BLAST delle sequenze non sono risultate omologie significative con sequenze nucleotidiche note.

**Tabella 12.** Numero di accessione in banca dati informatica db/GSS GenBank degli ampliconi RAPD sequenziati per essere convertiti in marcatori SCAR.

Specie	Amplicone RAPD	N° acc. db/GSS	Marcatore SCAR	N° acc. db/GSS
<i>Cistus incanus</i>	OPA07 <i>Ci</i> <sub>354</sub>	FI274974	Sc <i>Ci</i> <sub>230</sub>	-
<i>Rubus caesius</i> /spp.	OPB02 <i>Rc</i> <sub>232</sub>	FI274976	Sc <i>Rc</i> <sub>170</sub>	-
<i>Rhus coriaria</i>	OPB13 <i>Rh</i> <sub>350</sub>	FI274975	Sc <i>Rhc</i> <sub>292</sub>	-
<i>Rhus</i> spp.	OPP10 <i>Rhspp</i> <sub>310</sub> <sup>a</sup>	-	Sc <i>Rhspp</i> <sub>293</sub> <sup>c</sup>	Rh. typ.: GS887703
<i>Satureja montana</i>	OPA09 <i>Sm</i> <sub>193</sub>	GS885206	Sc <i>Sm</i> <sub>169</sub>	-
<i>Origanum majorana</i>	OPA09 <i>Om</i> <sub>335</sub>	GS885202	Sc <i>Om</i> <sub>257</sub>	-
<i>Origanum majorana</i>	OPA07 <i>Om</i> <sub>667</sub>	GS885201	Sc <i>Om</i> <sub>349</sub>	-
<i>Olea europaea</i>	OPB12 <i>Oe</i> <sub>390</sub>	GS885199	Sc <i>Oe</i> <sub>173</sub>	-
<i>Origanum</i> spp.	OPA07 <i>Ospp</i> <sub>670</sub> <sup>b</sup>	O. o.: GS885203 O. v.: GS885204 O. v. h.: GS885205	Sc <i>Ospp</i> <sub>382-386</sub>	-

a = Non è riportata in banca dati la sequenza dell'amplicone completo;

b = In banca dati sono presenti le sequenze dell'amplicone ottenute da ciascun taxa considerato del genere *Origanum*;

c = In banca dati è riportata la sequenza SCAR ottenuta da *Rhus thypina*.

Sulla sequenza di ciascun amplicone RAPD specie specifico, sono stati costruiti due oligonucleotidi (For e Rev) ad una distanza compresa tra le 150 e le 400bp, escludendo la sequenza dei primer RAPD originali, per essere utilizzati come coppia di primer SCAR specifica per il riconoscimento di ciascun contaminante. Nel processo di selezione delle sequenze di ciascun primer è stato considerato il contenuto in basi nucleotidiche C+G e la stabilità al 3' così come indicato da Vanichanon e collaboratori (2000).

Ciascuna coppia di primer SCAR è stata quindi selezionata per amplificare un frammento di genoma più breve rispetto all'amplicone RAPD originario, questo per agevolare ulteriormente l'amplificazione del marcatore a partire da DNA genomico che potrebbe risultare parzialmente degradato. Tale condizione è frequente quando si isola DNA da materiale vegetale essiccato e conservato per lungo tempo a temperature superiori ai 4°C, come spesso accade durante le fasi di commercializzazione delle droghe e delle spezie.

Per ogni coppia di primer è stata valutata la temperatura ottimale di appaiamento, attraverso esperimenti preliminari di amplificazione, nei quali la fase di annealing dei primer è stata condotta a varie temperature in un intervallo di  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  rispetto alla temperatura di appaiamento calcolata sulle sequenze oligonucleotidiche  $[4(\text{G}+\text{C})+2(\text{A}+\text{T})]$ , ed è stata stabilita la concentrazione ottimale di  $\text{MgCl}_2$  nel tampone di amplificazione valutando concentrazioni in un intervallo compreso tra 1 e 3mM (Roux, 1995). Le condizioni di reazione PCR risultate ottimali per l'amplificazione di ciascun marcatore SCAR contaminante-specifico, sono riportate in **tabella 13**, assieme al nome attribuito ad ogni marcatore SCAR (indicativo della specie vegetale per la quale è stato sviluppato e delle dimensioni molecolari dell'amplicone) e alla sequenza nucleotidica di ciascuna coppia di primer For e Rev.

La temperatura di annealing ottimale è risultata più bassa di quella calcolata per tutte le coppie di primer, senza tuttavia portare ad una diminuzione di specificità delle amplificazioni, e l'intervallo di concentrazione ottimale di magnesio è stato ridotto a due sole condizioni, 1.5 e 2mM, una o l'altra caratteristica di ciascuna coppia di primer. Per ogni marcatore di contaminazione, la reazione PCR ottimizzata ha sempre prodotto l'amplificazione di una banda unica e delle dimensioni attese, confermando l'affidabilità di tutte le coppie di primer SCAR selezionate.

**Tabella 13.** Coppie di primer SCAR individuate per ciascuna specie vegetale e nome attribuito ai marcatori specifici. È indicato: l'amplicone RAPD dal quale è derivato ciascun marcatore SCAR; la sequenza dei primer (For e Rev) per l'amplificazione di ciascun marcatore SCAR con temperatura di appaiamento calcolata sulla sequenza  $[4(G+C)+2(A+T)]$ ; la temperatura di appaiamento risultata ottimale per ciascuna coppia di primer; la concentrazione di  $MgCl_2$  risultata ottimale in PCR-SCAR; le dimensioni in bp del marcatore SCAR.

Specie	Amplicone RAPD	Marcatore SCAR	Sequenza primer SCAR (5'→3')	T annealing calcolata (°C)	T annealing ottimale (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Dimensioni SCAR (bp)
<i>Cistus incanus</i>	OPA07Ci <sub>354</sub>	ScCi <sub>230</sub>	For GAATGAGGGTGGTGTGTGG Rev AAAGAGATTGATAAAGATTCTCC	60 60	55	1.5	230
<i>Rubus</i> spp. <sup>a</sup>	OPB02Rc <sub>232</sub>	ScRc <sub>170</sub>	For AAGAATAAACTGATAGCCAAGC Rev TATACATCCCTGAGATAAATTGG	62 62	55	1.5	170
<i>Rhus coriaria</i>	OPB13Rhc <sub>350</sub>	ScRhc <sub>292</sub>	For AATGGTCTACGTGAATTAATCG Rev ATGTTTCATTACGAATGAGAAGG	62 62	60	1.5	292
<i>Rhus</i> spp. <sup>b</sup>	OPP10Rhsp <sub>310</sub>	ScRhsp <sub>293</sub>	For TCAAGATTCAATAACTTGGCG Rev AGCTTTCTCTCATAAAGTGCC	58 58	58	2.0	293
<i>Satureja montana</i>	OPA09Sm <sub>193</sub>	ScSm <sub>169</sub>	For AAGAAGATGTAAAGCATTCTGC Rev TTAACTAAGACAAGAACCGAGG	60 62	58	1.5	169
<i>Origanum majorana</i>	OPA09Om <sub>335</sub>	ScOm <sub>257</sub>	For ACCCAATTTTGCCACATAGG Rev TAATTTCTTTTCCCAGGCC	58 58	58	1.5	257
<i>Origanum majorana</i>	OPA07Om <sub>667</sub>	ScOm <sub>349</sub>	For GCTCAGTATTCTCAGCCTCC Rev CGACGCTCATTTCAGTCCC	62 62	62	1.5	349
<i>Olea europaea</i>	OPB12Oe <sub>390</sub>	ScOe <sub>173</sub>	For AATGTTCATAAAATGGATAAGGG Rev CAAACTGCAGAACACAAGTCG	60 62	55	2.0	173
<i>Origanum</i> spp. <sup>c</sup>	OPA07Osp <sub>670</sub>	ScOsp <sub>382-386</sub>	For TGACACTGAACGTCACG Rev GGGTGGGAAAAGAAGAG	52 52	55	1.5	382-386

a = la coppia di primer SCAR ottenuta dal sequenziamento di un frammento di genoma della specie *Rubus caesius* è risultata genere specifica;

b = la coppia di primer SCAR ottenuta dal sequenziamento di un frammento di genoma dalla specie *Rhus thypina* è risultata genere specifica e riconosce anche la specie *Cotinus coggygria* (sin. *Rhus cotinus*);

c = la coppia di primer SCAR è costruita sulle regioni conservate di frammenti di genoma omologhi di 4 taxa distinti del genere *Origanum*.

#### 4.3.2 Saggi di specificità, sensibilità e validazione dei marcatori SCAR selezionati

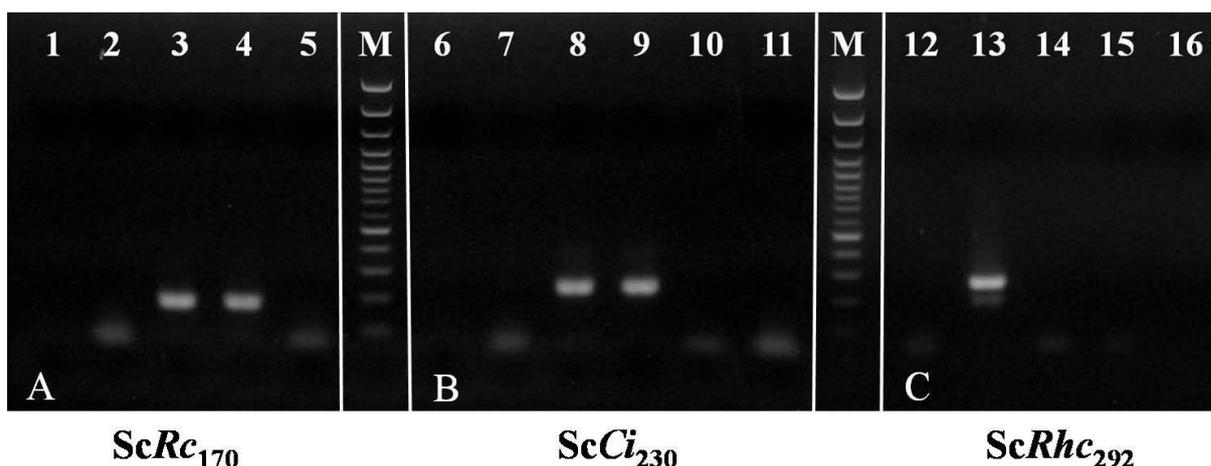
La specificità dei marcatori SCAR selezionati è stata confermata saggiando ogni coppia di primer contaminante-specifica su diversi taxa del genere *Origanum* e su alcune specie filogeneticamente vicine alla specie contaminante per la quale ciascun marcatore era stato sviluppato.

##### Contaminanti del gruppo I

In **figura 15** sono mostrate le amplificazioni PCR ottenute con le tre coppie di primer SCAR ScRc<sub>170</sub>, ScCi<sub>230</sub> e ScRhc<sub>292</sub>, specifiche rispettivamente per, *Rubus caesius*, *Cistus incanus* e *Rhus coriaria*. Ogni coppia di primer è stata saggiata, in reazioni incrociate, sugli altri contaminanti del gruppo I. Inoltre, la coppia di primer SCAR ScRc<sub>170</sub> è stata utilizzata per amplificare anche il DNA estratto da *Rubus idaeus* (corsia 4), specie co-genere del contaminante per il quale è stata selezionata, e *Fragaria vesca* (corsia 5), appartenente alla famiglia delle Rosaceae; la coppia di primer ScCi<sub>230</sub> è stata posta in reazione PCR con il DNA estratto da *Cistus ladanifer* (corsia 9), *Cistus* sp. (corsia 10) ed *Helianthemum* sp. (corsia 11), appartenenti alla famiglia delle Cistaceae; la coppia di primer ScRhc<sub>292</sub> su DNA estratto da *Rhus typhina* (corsia 15) e *Cotinus coggygria* [sin. *Rhus cotinus*] (corsia 16), appartenenti alla famiglia delle Anacardiaceae.

A seguito delle amplificazioni PCR, la coppia di primer SCAR per il marcatore ScRc<sub>170</sub> è risultata amplificare il genere *Rubus* (*R. caesius* e *R. idaeus*, corsie 3, 4) ma non *Fragaria vesca* (corsia 5), ScCi<sub>230</sub> è identificato in due taxa del genere *Cistus* (*C. incanus* e *C. ladanifer*, corsie 8, 9) dei tre considerati, ma non in *Helianthemum* sp. (corsia 11) e il marcatore ScRhc<sub>292</sub> è risultato specifico del solo taxon del genere *Rhus* per il quale è stato isolato (*R. coriaria*, corsia 13). Nessuna delle tre coppie di primer SCAR per i contaminanti del gruppo I ha prodotto amplificati aspecifici quando utilizzata su diversi taxa di origano (*O. onites*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *O. vulgare* subsp. *hirtum*) (dato non mostrato), né in reazioni incrociate effettuate sugli altri contaminanti del gruppo (A: corsie 1, 2; B: corsie 6, 7; C: corsie 12, 14) o su DNA estratto da vegetali appartenenti alla stessa famiglia della specie “marcata”, ma di genere differente (A: corsia 5; B: corsia 11; C: corsia 16).

Secondo questi risultati è pressoché nullo il rischio di falsi positivi nella identificazione della presenza dei tre contaminanti.



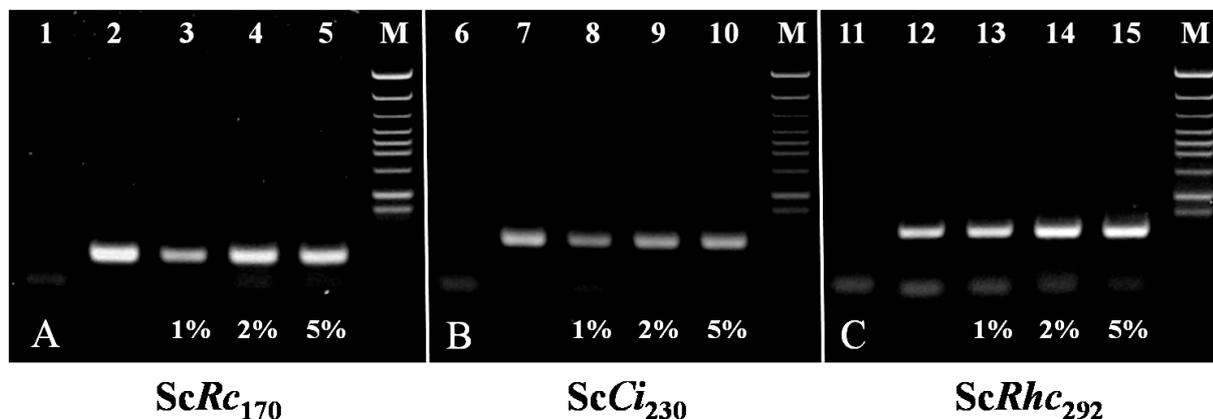
**Figura 15.** Saggio di specificità dei marcatori SCAR dei contaminanti del gruppo I. **A-** PCR effettuata con la coppia di primer  $ScRc_{170}$  specifica per *Rubus caesius*; **B-** Reazione effettuata con la coppia di primer  $ScCi_{230}$  specifica per *Cistus incanus*; **C-** Amplificazione compiuta con la coppia di primer  $ScRhc_{292}$  specifica per *Rhus coriaria*. Per escludere amplificati aspecifici, ogni specie è stata posta in PCR anche con i primer specifici degli altri contaminanti: *R. caesius* (corsie 3, 7, 14), *C. incanus* (corsie 1, 8, 12), *R. coriaria* (corsie 2, 6, 13). Ogni coppia di primer SCAR è stata inoltre saggiata su alcune specie vegetali filogeneticamente vicine alla specie bersaglio. La coppia di primer  $ScRc_{170}$  è stata testata su *Rubus idaeus* (corsia 4) e *Fragaria vesca* (corsia 5) [Rosaceae]; la coppia di primer  $ScCi_{230}$  su *Cistus ladanifer* (corsia 9), *Cistus* sp. (corsia 10), *Helianthemum* sp. (corsia 11) [Cistaceae]; la coppia di primer  $ScRhc_{292}$  su DNA estratto da *Rhus typhina* (corsia 15) e *Cotinus coggygria* (corsia 16) [Anacardiaceae]. M, marcatore di peso molecolare (bp).

La sensibilità di rilevazione dei contaminanti del gruppo I attraverso i marcatori SCAR è stata successivamente confermata effettuando per ciascuna coppia di primer contaminante-specifica l'amplificazione di DNA estratto da miscele artificiali *Origanum*/contaminante, così come era stato fatto per i marcatori RAPD.

In **figura 16** è mostrato il saggio di sensibilità dei marcatori SCAR individuati per i contaminanti del gruppo I. Per ogni coppia di primer sono stati posti in reazione i DNA estratti da tre miscele artificiali di *O. vulgare* subsp. *hirtum*, nelle quali il contaminante bersaglio dell'amplificazione era stato aggiunto in percentuali (p/p) dell'1, 2 e 5%.

Per ogni serie di reazioni il contaminante è risultato nettamente individuabile anche se in miscela all'1% (*R. caesius*, A: corsia 3; *C. incanus* B: corsia 8; *R. coriaria*, C: corsia 13). Tale dato risulta importante alla luce delle conoscenze derivanti dalle indagini farmacognostiche, che hanno individuato in ciascun campione di Origano Mediterraneo analizzato la presenza contemporanea di più di un contaminante vegetale. Il limite di contaminazione indicato dalla

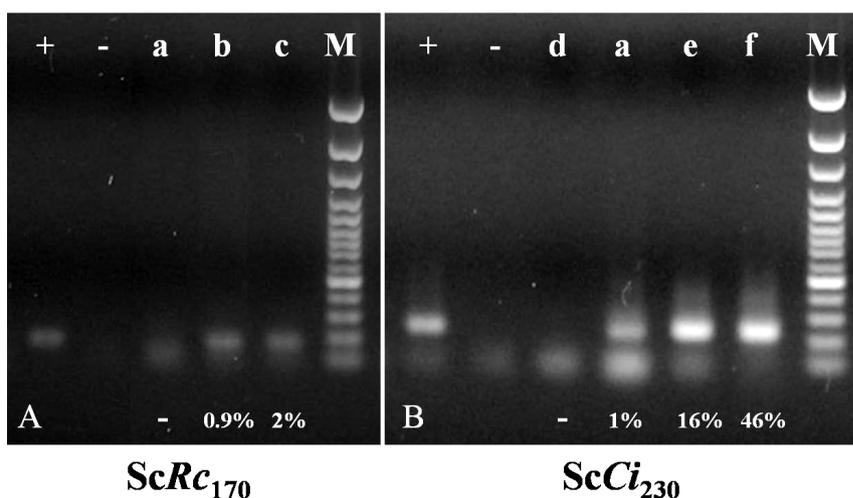
Ph. Eur. non è infatti riferito ad ogni singola specie, ma alla somma di tutto ciò che è estraneo alle specie consentite.



**Figura 16.** Saggio di sensibilità dei marcatori SCAR. Amplificazione di miscele artificiali di *O. vulgare* subsp. *hirtum* e specie contaminanti del gruppo I. Le foglie essiccate di ciascun contaminante sono state mescolate in tre differenti concentrazioni (indicate nella parte inferiore della figura) alle foglie essiccate di *Origanum*, prima dell'estrazione del DNA genomico. **A-** PCR effettuata con la coppia di primer *ScRc*<sub>170</sub> su miscele *Origanum/Rubus caesius* (corsie 3, 4, 5); **B-** Reazione effettuata con la coppia di primer *ScCi*<sub>230</sub> su miscele *Origanum/Cistus incanus* (corsie 8, 9, 10); **C-** Amplificazione compiuta con la coppia di primer *ScRhc*<sub>292</sub> su miscele *Origanum/Rhus coriaria* (corsie 13, 14, 15). Per ogni serie di reazioni, il DNA puro di *O. vulgare* subsp. *hirtum* è stato utilizzato come controllo negativo (corsie 1, 6, 11), mentre il DNA puro di ciascuna specie contaminante come controllo positivo: *R. caesius* (corsia 2); *C. incanus* (corsia 7); *R. coriaria* (corsia 12). M, marcatore di peso molecolare (bp).

I marcatori SCAR sono stati quindi validati attraverso l'analisi di campioni di Origano Mediterraneo di composizione nota a seguito del saggio microscopico (**tabella 9**).

In **figura 17** sono riportati i risultati delle analisi effettuate con le coppie di primer SCAR specifiche per il contaminante *R. caesius* (*ScRc*<sub>170</sub>, pannello A) e *C. incanus* (*ScCi*<sub>230</sub>, pannello B). I campioni considerati contenevano i contaminanti in esame in diverse percentuali e in tutte le miscele dove il saggio microscopico ha indicato la presenza di uno dei due contaminanti, lo specifico marcatore SCAR è risultato chiaramente amplificato (*R. caesius*, A: corsie b, c; *C. incanus* B: corsie a, e, f).



**Figura 17.** Validazione dei marcatori molecolari SCAR ScRc<sub>170</sub> e ScCi<sub>230</sub> su campioni di Origano Mediterraneo di composizione nota (corsie a, b, c, d, e, f) (tabella 9). La percentuale (p/p) delle specie contaminanti bersaglio delle amplificazioni per ogni campione è riportata alla base di ciascun pannello. **A-** PCR effettuata con la coppia di primer ScRc<sub>170</sub> specifica per *Rubus caesius*; **B-** Reazione effettuata con la coppia di primer ScCi<sub>230</sub> specifica per *Cistus incanus*. Per ogni serie di reazioni, il DNA di *O. vulgare* subsp. *hirtum* è stato utilizzato come controllo negativo (corsie -), mentre il DNA di ciascuna specie contaminante come controllo positivo (corsie +). M, marcatore di peso molecolare (bp).

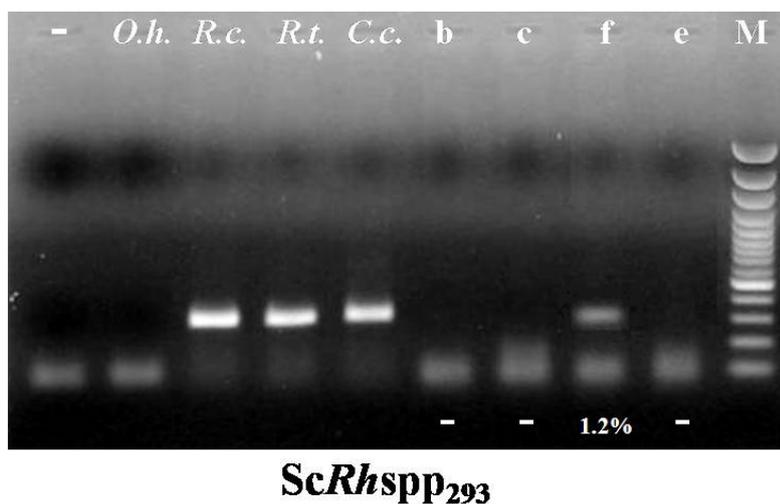
Come confermato dai test di specificità, i marcatori SCAR sviluppati per l'identificazione di *C. incanus* e *R. caesius* si sono rivelati efficaci anche per il riconoscimento di taxa differenti all'interno degli stessi due generi, questo dato è estremamente importante per l'efficacia dell'analisi. Infatti, nel corso dell'indagine farmacognostica nella quale erano stati riconosciuti i principali contaminanti vegetali dei preparati frantumati di Origano Mediterraneo, la classificazione al livello della specie di ciascun genere rinvenuto era in parte risultata aleatoria. In particolare, è risultato impossibile riconoscere nei frammenti dei contaminanti *Rubus* e *Rhus*, tutti i caratteri tassonomici indispensabili per l'attribuzione ad un'unica specie.

Sebbene la distribuzione della specie *Rhus coriaria* sia sovrapponibile geograficamente all'area di produzione principale dell'Origano Mediterraneo e la commercializzazione dei frutti della stessa, come spezia con il nome di Sumac, possa fornire un'ulteriore conferma della compresenza delle due droghe vegetali in uno stesso circuito di produzione, è comunque documentato un ampio uso in alimentazione e medicina tradizionale di più di una specie all'interno di questo genere (Rayne e Mazza, 2007).

Per questo motivo per il contaminante *Rhus*, oltre al marcatore *ScRhc*<sub>292</sub> specifico per *Rhus coriaria*, è stato individuato anche un secondo marcatore SCAR, *ScRhsp*<sub>293</sub>, in grado di riconoscere più taxa all'interno del genere (**tabella 13**).

Come illustrato nella **figura 18**, la coppia di primer SCAR *ScRhsp*<sub>293</sub>, diversamente da *ScRhc*<sub>292</sub>, nel saggio di specificità è risultata in grado di riconoscere in PCR entrambi i taxa del genere *Rhus* posti in reazione, *R. coriaria* e *R. thypina* (corsie *R.c.*, *R.t.*) ed anche la specie *Cotinus coggygia* (corsia *C.c.*), appartenente anch'essa alla famiglia delle Anacardiaceae e precedentemente inclusa all'interno del genere *Rhus* con il nome di *Rhus cotinus*.

In **figura 18** è anche mostrata la validazione di questo secondo marcatore del contaminante *Rhus* attraverso l'analisi di miscele commerciali di Origano Mediterraneo di composizione nota.



**ScRhsp<sub>293</sub>**

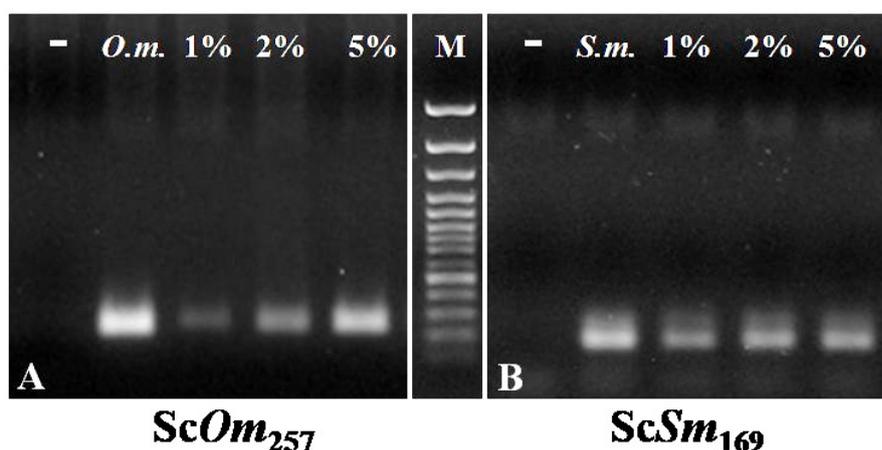
**Figura18.** Validazione del marcatore molecolare SCAR *ScRhsp*<sub>293</sub> su campioni di Origano Mediterraneo di composizione nota (corsie b, c, f, e) [**tabella 9**]. Per ogni campione la percentuale (p/p) della specie contaminante bersaglio dell'amplificazione è riportata alla base dell'immagine. In reazione sono stati considerati due controlli negativi, il primo ottenuto dall'amplificazione in assenza di DNA (corsia -), il secondo mettendo in reazione DNA di *O. vulgare* subsp. *hirtum* (corsia *O.h.*), mentre il controllo positivo è rappresentato dal DNA della specie contaminante *Rhus coriaria* (corsia *R.c.*). La coppia di primer SCAR è stata inoltre saggiata su alcune specie vegetali filogeneticamente vicine alla specie bersaglio, *Rhus thypina* (corsia *R.t.*) e *Cotinus coggygia* (corsia *C.c.*) [Anacardiaceae]. M, marcatore di peso molecolare (bp).

Contaminanti del gruppo II

Così come per i contaminanti del gruppo I, i saggi di specificità, sensibilità, e validazione sono stati compiuti anche per i marcatori SCAR sviluppati per i contaminanti del gruppo II.

Come mostrato in **figura 19**, le coppie di primer SCAR ScOm<sub>257</sub> (pannello A) e ScSm<sub>169</sub> (pannello B), specifiche rispettivamente per *O. majorana* e *S. montana* (**tabella 13**), sono in grado di rilevare i contaminanti bersaglio in miscele artificiali con *O. vulgare* subsp. *hirtum* anche se questi sono presenti solo all'1% (p/p).

Come le precedenti, anche queste due coppie di primer SCAR consentono quindi il riconoscimento attraverso PCR di ciascun contaminante per il quale sono state sviluppate, anche se presente sotto al limite del 2% indicato dalla Ph. Eur.



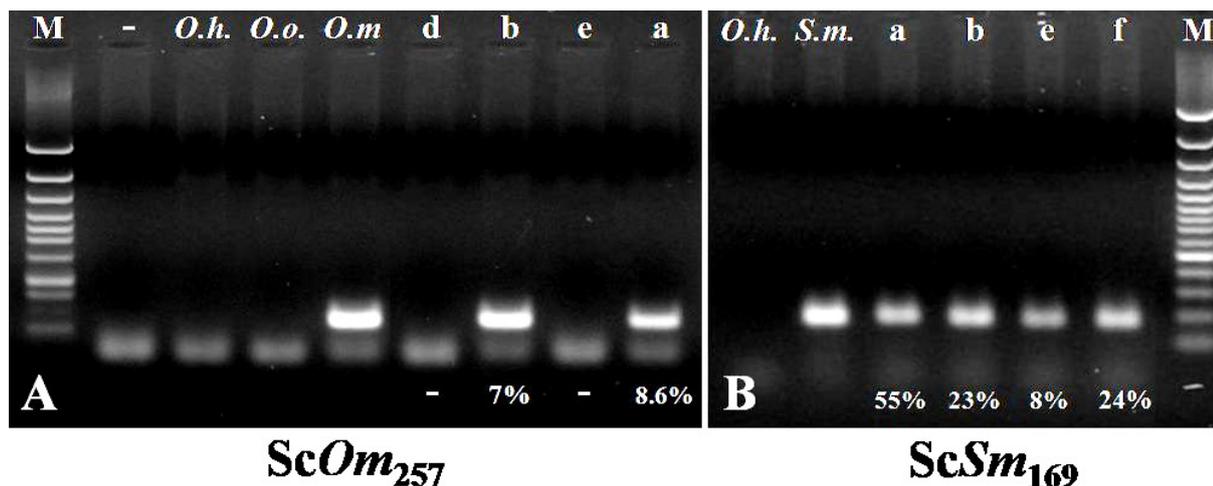
**Figura 19.** Analisi PCR-SCAR di miscele artificiali di *O. vulgare* subsp. *hirtum* e specie contaminanti del gruppo II. Le foglie essiccate di ciascun contaminante sono state mescolate in tre differenti concentrazioni (indicate nella parte superiore della figura) alle foglie essiccate di *Origanum*, prima dell'estrazione del DNA genomico. **A-** PCR effettuata con la coppia di primer ScOm<sub>257</sub> su miscele *O. vulgare* subsp. *hirtum*/*O. majorana*; **B-** Reazione effettuata con la coppia di primer ScSm<sub>169</sub> su miscele *Origanum*/*S. montana*. Per entrambe le serie di reazioni, il DNA di *O. vulgare* subsp. *hirtum* (corsie -) è stato utilizzato come controllo negativo, mentre il DNA puro di ciascuna specie contaminante come controllo positivo: *O. majorana* (corsia *O.m.*); *S. montana* (corsia *S.m.*). M, marcatore di peso molecolare (bp).

La validazione dei marcatori SCAR ScSm<sub>169</sub> e ScOm<sub>257</sub> è proseguita su miscele commerciali di composizione nota (**tabella 9**).

In **figura 20** sono mostrati i risultati dell'amplificazione PCR. I due marcatori SCAR specifici per i contaminanti del gruppo II rivelano nettamente la presenza delle specie bersaglio in tutti

i campioni dove erano stati precedentemente identificate (*Origanum majorana*, A: corsie b, a; *Satureja montana*, B: corsie a, b, e, f).

Come controlli negativi dell'amplificazione con la coppia di primer SCAR *ScOm*<sub>257</sub>, sono stati considerati i DNA dei due taxa *O. vulgare* subsp. *hirtum* e *O. onites* (figura 20 pannello A: corsie *O.h.*, *O.o.*). L'assenza di amplificazioni aspecifiche per tali taxa co-genere della specie contaminante, confermano la specie-specificità del marcatore SCAR per *O. majorana*.



**Figura 20.** Validazione dei marcatori molecolari SCAR *ScOm*<sub>257</sub> (pannello A) e *ScSm*<sub>169</sub> (pannello B) su campioni di Origanum Mediterraneo di composizione nota (corsie a, b, d, e, f) [tabella 9]. Per ogni campione la percentuale (p/p) della specie contaminante bersaglio dell'amplificazione è riportata alla base dell'immagine. Per le reazioni con *ScOm*<sub>257</sub> in reazione sono considerati tre controlli negativi: il primo è costituito dall'amplificazione in assenza di DNA (corsia -), il secondo e il terzo dalla reazione rispettivamente in presenza del DNA di *O. vulgare* subsp. *hirtum* (corsia *O.h.*) e del DNA di *O. onites* (corsia *O.o.*). Per le reazioni con *ScSm*<sub>169</sub> il controllo negativo è stato ottenuto mettendo in reazione il DNA di *O. vulgare* subsp. *hirtum* (corsia *O.h.*). Il controllo positivo è stato ottenuto mettendo in reazione il DNA estratto dalle specie contaminanti bersaglio (*O. majorana*, A: corsia *O.m.*; *S. montana*, B: corsia *S.m.*). M, marcatore di peso molecolare (bp).

Data la vicinanza filogenetica del contaminante *O. majorana* con gli altri taxa del genere riconosciuti come Origanum Mediterraneo, si è cercato di ampliare il numero di marcatori a disposizione per il rilevamento di questa specie.

Dai profili di amplificazione RAPD ottenuto con il primer OPA07 (figura 7) era emersa una banda di circa 670bp, monomorfica per tutti gli individui appartenenti al genere *Origanum*, compreso il contaminante *O. majorana* (tabella 11).

Tale banda, è stata eluita per i 4 taxa *O. majorana*, *O. vulgare*, *O. vulgare* subsp. *hirtum* e *O. onites*, clonata e sequenziata. Dal confronto delle sequenze attraverso il programma ClustalW 1.82 (Chenna *et al.*, 2003) è stato possibile individuare regioni discriminanti *O. majorana* dagli altri taxa e regioni di sequenza altamente conservate per tutti i taxa del genere *Origanum* considerati (figura 21). Sulle prime è stata ricavata una nuova coppia di primer SCAR specifica per il contaminante *O. majorana* (ScOm<sub>349</sub>), sulle seconde è stata costruita una coppia di oligonucleotidi For e Rev (ScOsp<sub>382-386</sub>) in grado di ‘marcare’ l’intero genere *Origanum* (tabella 13).

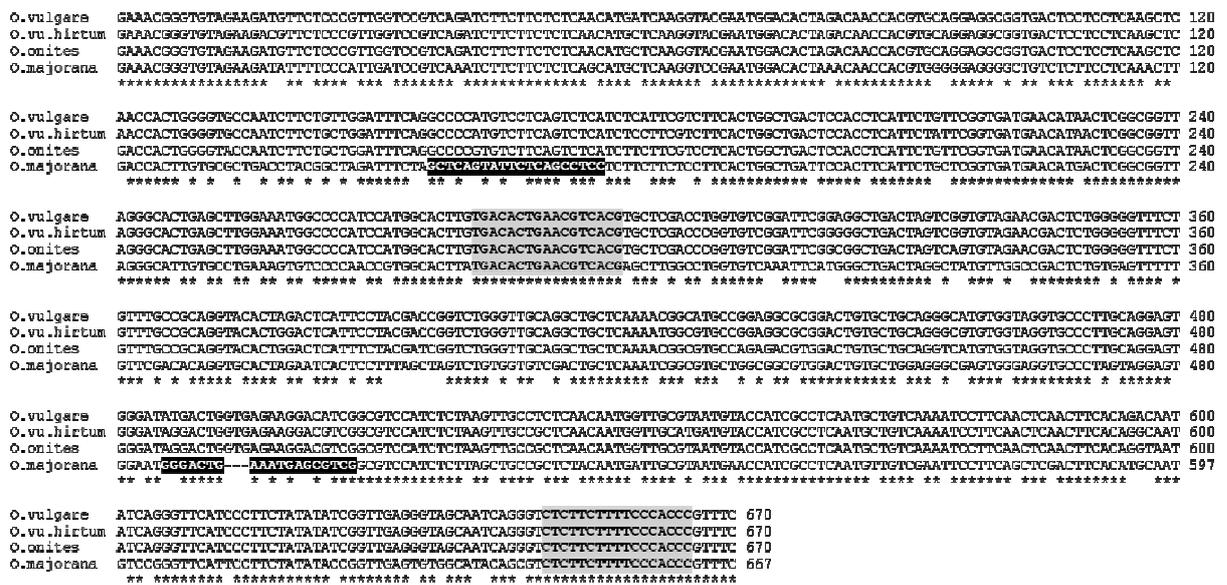
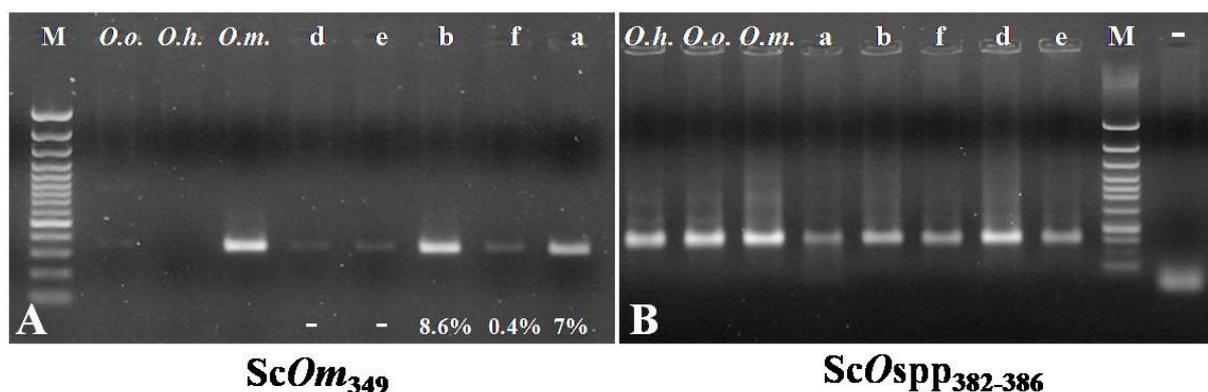


Figura 21. Confronto tra le sequenze del frammento RAPD OPA07<sub>670</sub>, isolato dai profili di amplificazione dei taxa *O. vulgare*, *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. onites* e *O. majorana*, effettuato attraverso il programma ClustalW 1.82. I nucleotidi conservati sono indicati con un asterisco (\*). Sono evidenziate in nero le regioni della sequenza di *O. majorana* sulle quali è stata costruita la coppia di primer SCAR ScOm<sub>349</sub>, in grigio le regioni conservate sulle quali è stata costruita la coppia di primer SCAR genere-specifica ScOsp<sub>382-386</sub>. Quest’ultima coppia di primer amplifica in *O. majorana* un frammento tre paia di basi più corto rispetto agli altri taxa di origano presi in esame.

A seguito dell’analisi PCR-SCAR di campioni noti di Origano Mediterraneo, con il marcatore ScOm<sub>349</sub> costruito sulla sequenza di *O. majorana* (figura 22 pannello A), l’amplicone caratteristico del marcatore è risultato ben evidente in tutti i campioni dove l’analisi farmacognostica aveva rilevato la presenza del contaminante (pannello A: corsie b, f, a), ma una leggera amplificazione è stata ottenuta anche in quei campioni dove *O. majorana* non era

stato identificato (A: corsie d, e), ponendo qualche dubbio sulla effettiva specie-specificità di questo marcatore.



**Figura 22.** Analisi attraverso i marcatori SCAR ScOm<sub>349</sub> (specifico per il contaminante *O. majorana* - pannello A) e ScOspp<sub>382-386</sub> (specifico per l'intero genere *Origanum* - pannello B) di campioni di Origano Mediterraneo di composizione nota (corsie a, b, d, e, f) [tabella 9]. Nel pannello A la percentuale (p/p) della specie contaminante *O. majorana*, bersaglio dell'amplificazione è, per ogni campione commerciale, riportata alla base dell'immagine; in reazione sono considerati due controlli negativi, il primo è stato ottenuto utilizzando come template il DNA estratto da *O. onites* (corsia *O.o.*), il secondo utilizzando DNA di *O. vulgare* subsp. *hirtum* (corsia *O.h.*); il controllo positivo è stato ottenuto amplificando il DNA puro della specie contaminante (corsia *O.m.*). Nel pannello B, il controllo negativo è costituito dall'amplificazione in assenza di DNA (corsia -); come controlli positivi sono considerati tre taxa del genere *Origanum* (corsie *O.h.*, *O.o.*, *O.m.*). M, marcatore di peso molecolare (bp).

Migliore è il risultato della prova di validazione del marcatore genere-specifico. Come mostrato nel pannello B della **figura 22**, la coppia di primer SCAR ScOspp<sub>382-386</sub> produce un amplificato netto in tutti i campioni dove è presente almeno un taxon del genere *Origanum* (pannello B, corsie *O.h.*, *O.o.*, *O.m.*, a, b, d, e, f).

Tale coppia di primer può essere inserita efficacemente, in uno screening routinario di autenticazione attraverso marcatori genetici dei campioni di Origano Mediterraneo. Questo costituisce infatti un ottimo controllo interno del metodo di analisi, perché è in grado di confermare in maniera veloce una efficace estrazione del DNA genomico dai campioni, ovvero garantire la buona riuscita del passaggio più soggetto a variazioni del protocollo di autenticazione. Infatti la presenza dell'amplificato caratteristico del genere *Origanum* è conferma di integrità del campione di DNA posto in reazione e rafforza il risultato di presenza o assenza di ciascuna contaminazione ottenuto attraverso i marcatori SCAR, svincolando gli esiti delle analisi da qualsiasi dubbio relativo all'integrità del materiale genetico utilizzato.

4.3.2 *Olea europaea*

Durante le fasi dello sviluppo dei marcatori molecolari genomici SCAR, sono stati reperiti 5 nuovi campioni provenienti dal mercato all'ingrosso e sono stati sottoposti all'analisi PCR utilizzando i marcatori genomici individuati per i contaminanti, in attesa di avere i risultati dei saggi farmacognostici. Il risultato delle due serie di analisi è mostrato in **tabella 14**.

**Tabella 14.** Analisi qualitativa di campioni commerciali di Origano Mediterraneo. Ogni campione è stato analizzato per l'identificazione dei contaminanti vegetali, sia tramite marcatori molecolari genomici SCAR che con saggio microscopico farmacognostico (–: contaminante non rilevato; +: contaminante rilevato; +/-: rilevamento di difficile attribuzione).

Contaminante	Campioni									
	$\alpha$		$\beta$		$\chi$		$\delta$		$\epsilon$	
	PCR-SCAR	Analisi microscopica	PCR-SCAR	Analisi microscopica						
<i>Rubus</i> spp.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. incanus</i>	–	–	–	–	+	+/-	–	–	+	+/-
<i>Rhus coriaria</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Rhus</i> spp.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. montana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>O. majorana</i>	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+
? <sup>a</sup>		+		+						

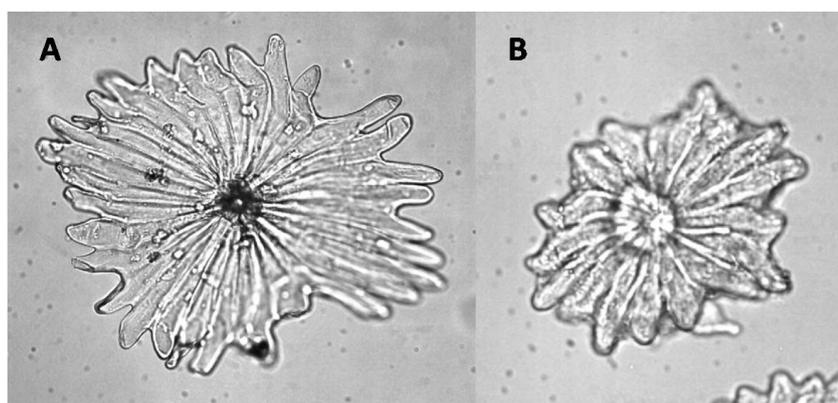
a = Il vegetale individuato dal saggio microscopico nei campioni  $\alpha$  e  $\beta$  non è riconducibile a ad uno dei principali contaminanti.

I risultati ottenuti dal riconoscimento microscopico riproducono i dati ottenuti attraverso PCR-SCAR utilizzando le coppie di primer individuate per i contaminanti *Rubus*, *Cistus*, *Rhus*, *O. majorana* e *S. montana*: in nessun campione sono rilevati i contaminanti *Rubus* e *Rhus*; tutti i campioni presentano forte contaminazione con *S. montana*; i campioni  $\chi$  e  $\epsilon$  sono

contaminati anche con *O. majorana* e *Cistus*. Per quest'ultima contaminazione, il saggio attraverso marcatori molecolari SCAR ha dato un risultato più netto rispetto all'identificazione incerta del saggio microscopico, dovuta alla forte frantumazione dei frammenti di contaminante.

Le analisi farmacognostiche hanno però individuato nei campioni  $\alpha$  e  $\beta$  la presenza di una nuova specie vegetale non riconducibile ad uno dei principali contaminanti identificati in precedenza.

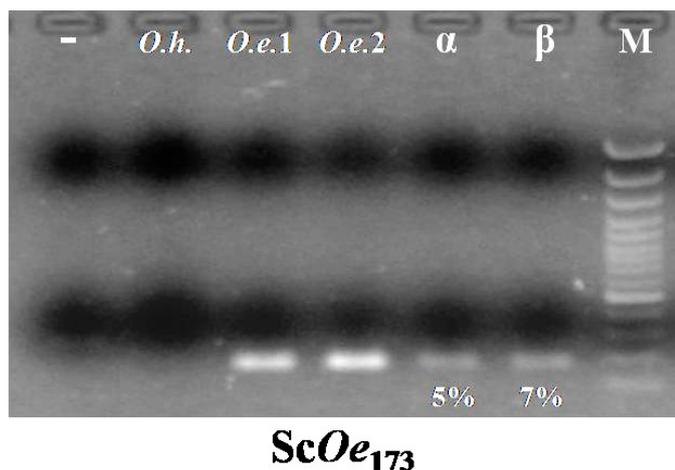
I frammenti di foglia rinvenuti presentavano forti adattamenti xerofili (un'abbondante cuticola, lamina fogliare spessa e tomentosa nella pagina inferiore). Analisi farmacognostiche più approfondite hanno consentito di isolare dai frammenti di contaminante dei tricomi peltati presenti sulla pagina inferiore. Dal confronto microscopico con campioni di erbario (**figura 23**) il nuovo contaminante è stato attribuito al genere *Olea*.



**Figura 23.** Comparazione di fotografie al microscopio ottico (ingrandimento 100 $\times$ ) di tricomi peltati. **A:** Tricoma isolato dalla pagina inferiore di frammento fogliare rinvenuto attraverso saggio farmacognostico dai campioni di Origano Mediterraneo  $\alpha$  e  $\beta$ . **B:** Tricoma isolato dalla pagina fogliare inferiore di un campione di erbario di *Olea europaea* L.

Per confermare questa ipotesi il DNA isolato da due accessioni della specie *Olea europaea* (una appartenente alla cultivar Moraiolo *O.e.1*, l'altra appartenente ad un genotipo non caratterizzato ma proveniente dal Montenegro *O.e.2*) sono stati inclusi nel corso dell'analisi RAPD effettuata per l'individuazione di ampliconi caratterizzanti i contaminanti del gruppo II, *O. majorana* e *S. montana*, (dato non mostrato). Dal profilo elettroforetico ottenuto con il primer RAPD OPB12 dei DNA di *Olea* è stato isolato un frammento di circa 400bp, monomorfo per i due genotipi, e che, clonato e sequenziato, ha consentito di costruire la coppia di primer SCAR ScOe<sub>173</sub> specifica per *Olea europaea* indicata in **tabella 13**.

Dall'analisi PCR-SCAR del DNA estratto dai campioni di Origano Mediterraneo  $\alpha$  e  $\beta$  per l'identificazione del marcatore *ScOe<sub>173</sub>*, è risultata la banda di amplificazione marcatrice di *Olea europea* (**figura 24** corsie *O.e.1*, *O.e.2*,  $\alpha$ ,  $\beta$ ), confermando la presenza e l'identità stessa del nuovo contaminante rinvenuto. Anche in questo caso il marcatore è stato validato verificandone la mancata reazione aspecifica su DNA proveniente da alcuni taxa del genere *Origanum*.



**Figura 24.** Amplificazione PCR utilizzando la coppia di primer SCAR *ScOe<sub>173</sub>* di DNA isolato dai campioni di Origano Mediterraneo  $\alpha$  e  $\beta$  (**tabella 14**). Alla base dell'immagine è riportata la percentuale (p/p) della specie contaminante ignota derivata dal saggio microscopico. In reazione sono considerati due controlli negativi, il primo costituito dall'amplificazione in assenza di DNA (corsia -), il secondo mettendo in reazione il DNA di *O. vulgare* subsp. *hirtum* (corsia *O.h.*). Due accessione della specie bersaglio dell'amplificazione, *O. europea*, sono i controlli positivi (corsie *O.e.1*, *O.e.2*). M, marcatore di peso molecolare (bp).

La nuova coppia di primer SCAR specifica per *Olea europea* è quindi stata inclusa nel set per il rilevamento molecolare genomico dei contaminanti nei preparati di Origano Mediterraneo.



#### 4.4 Amplificazione PCR-SCAR con additivi

Il meccanismo di interferenza nelle analisi molecolari genomiche, esercitati dai metaboliti secondari eventualmente co-isolati durante l'estrazione del DNA, possono essere raggruppati in tre categorie, in base al livello al quale agiscono. L'appartenenza ad una categoria non esclude l'altra e l'inibizione dell'analisi si esercita spesso in più di una via attraverso interazioni chimiche, enzimatiche o fisiche spesso poco note e indistinguibili le une dalle altre (Wilson, 1997).

L'effetto degli inibitori eventualmente presenti si può esercitare:

- A livello dell'estrazione del DNA, rendendo inefficace l'isolamento degli acidi nucleici.
- A livello degli acidi nucleici, degradandoli o legandosi ad essi e rendendoli indisponibili per reazioni di analisi successive (digestione enzimatica, PCR).
- Interferendo direttamente con l'enzima (DNA polimerasi, enzima di restrizione), degradandolo o impedendo l'interazione con il DNA.

Per ovviare a questi limiti, quando si vuole effettuare un'analisi di campioni vegetali ricchi di sostanze derivanti dal metabolismo secondario attraverso un'amplificazione PCR, possono essere messe in atto differenti strategie:

- Ottimizzare la preparazione del campione di DNA.
- Ottimizzare le condizioni di amplificazione PCR in relazione alla natura del DNA stampo.
- Una combinazione di entrambe.

Nella prima parte di questo studio si è tentato di soddisfare il primo punto, sviluppando un protocollo di estrazione del DNA genomico che fosse comune a tutti i campioni oggetto di studio (campioni di origano Mediterraneo prelevato nel periodo balsamico e campioni dei più frequenti vegetali contaminanti lo stesso, entrambe le categorie di campioni sono state considerate sia nello stato fresco che essiccato), stabilendo come fattore discriminante che il DNA isolato fosse amplificabile in reazione PCR. Come visualizzato nella **tabella 7**, si è comunque sempre verificata la condizione che alcuni campioni di DNA non risultassero direttamente analizzabili attraverso PCR, ma necessitassero di ulteriori lunghe e dispendiose procedure di purificazione.

In questa parte del lavoro, avendo acquisito una più ampia conoscenza delle possibili caratteristiche dei campioni oggetto di studio ed in particolare al fine di consentire l'analisi attraverso i marcatori specifici SCAR di qualsiasi campione nella maniera più veloce ed efficace possibile, l'interesse è stato rivolto all'ottimizzazione delle condizioni di amplificazione PCR.

Con l'aumentare esponenziale delle analisi nelle quali è stata applicata la metodica PCR e con il continuo progredire delle conoscenze dallo sviluppo della tecnica (Mullis *et al.*, 1986; Mullis e Faloona, 1987) ad oggi, sono stati apportati miglioramenti e sviluppate numerose varianti, riguardo la natura dell'enzima utilizzato in reazione, la procedura operativa, la strumentazione utilizzata, così come la composizione del tampone di reazione.

In numerosi studi, di caso in caso a seconda della natura del campione da sottoporre all'analisi, alla formulazione di base del tampone di reazione PCR [Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, con o in alternativa a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] sono stati aggiunti altri composti (additivi) che si sono dimostrati in grado di avvantaggiare l'amplificazione delle sequenze bersaglio in particolari situazioni di inefficienza delle condizioni standard. Questi additivi, definiti in letteratura come coadiuvanti, 'enhancer' o 'facilitators' dell'amplificazione, possono esercitare la loro azione a vari livelli della reazione PCR, aumentando o diminuendo la stabilità termica del DNA stampo o dell'ibrido DNA-primer, operando sulla frequenza di errore della DNA polimerasi, modificando la specificità della reazione e attenuando o rimuovendo le interferenze dovute a eventuali sostanze inibenti presenti nel DNA estratto da determinati campioni biologici (Pomp e Medrano, 1991).

Questi coadiuvanti della reazione PCR possono essere raggruppati in 5 categorie in base alla loro natura (Abu Al-Soud, 2000; Rådström *et al.*, 2003; 2006):

- Proteine:

BSA (albumina da siero bovino) e gp32 (ssDNA-binding protein codificata dal gene 32 del batteriofago T4). L'aggiunta di BSA o gp32 alla miscela di amplificazione stabilizza la Taq DNA polimerasi aumentandone l'efficienza e bloccandone la degradazione da parte di enzimi proteolitici eventualmente presenti nella soluzione di DNA stampo (Kreder, 1996; Powell, 1994). È stato dimostrato inoltre che la BSA può adsorbire i contaminanti fenolici e impedire il loro effetto inibente in PCR (Kreder, 1996; Henegariu *et al.* 1997; Nagai *et al.*, 1998; Abu Al-Soud e Rådström, 2001; Ralser *et al.*, 2006; Rohland e Hofreiter, 2007; Adlimoghadam *et al.*, 2008).

- Solventi organici:

Formammide e DMSO (dimetilsolfossido).

Aumentano la resa di amplificato in PCR facilitando la denaturazione del DNA quando ricco in coppie G-C e riducendo le amplificazioni aspecifiche dovute alla formazioni di eventuali strutture secondarie negli acidi nucleici (Sarkar *et al.*, 1990; Pomp e Medrano, 1991; Masoud *et al.*, 1992; Kitade *et al.*, 2003).

- Detergenti non ionici:

Tween 20 e Triton X-100. Aggiunti in PCR aumentano la resa di amplificato e possono ridurre alcune amplificazioni aspecifiche. Esercitano probabilmente un effetto preventivo sulla formazione di strutture secondarie e sulla rinaturazione del DNA stampo, particolarmente frequenti se è costituito da sequenze brevi (Bachmann *et al.*, 1990; Demeke e Adams, 1992; Simon *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 1996; Adlimoghadam *et al.*, 2008). Il detergente Tween 20 previene inoltre l'aggregazione della polimerasi, ne stimola l'attività e reduce la frequenza di terminazione precoce della reazione attraverso meccanismi non ancora ben compresi (Innis *et al.*, 1988).

- Composti biologicamente compatibili:

Betaina e glicerolo. Il glicerolo è in genere presente nel tampone di mantenimento degli enzimi utilizzati in biologia molecolare. In reazione PCR il glicerolo, così come la betaina, aumenta la specificità abbassando la temperatura di denaturazione degli acidi nucleici e facilitando le interazioni fra i domini enzimatici. Sono entrambi efficaci nell'amplificazione di DNA particolarmente ricco in coppie di basi G-C (Innis *et al.*, 1988; Henke *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 1998).

- Polimeri:

PEG (polietilenglicole) e PVP (polivinilpirrolidone). Il PEG facilita l'amplificazione di DNA poco concentrato promuovendo l'associazione macromolecolare tra DNA e polimerasi ed è in grado di agevolare la reazione in maniera analoga ai solventi organici (Pomp e Medrano, 1991). Il PVP reverte gli effetti inibenti causati dei polifenoli in PCR (Koonjul *et al.*, 1999; Horne *et al.*, 2004).

Per campioni di DNA particolarmente eterogenei, difficoltosi da amplificare in PCR, sono spesso considerati gli effetti cumulativi esercitati dall'aggiunta di più di un additivo contemporaneamente.

In considerazione dell'elevato costo che hanno in genere i solventi organici e i composti biologicamente compatibili, lo studio si è indirizzato sulle tipologie di additivi relativamente poco costosi e facilmente reperibili in un laboratorio di analisi molecolare: la proteina BSA, i detergenti anionici Tween 20 e Triton X-100 e il polimero PVP. Questa scelta è stata effettuata anche in vista di un possibile sviluppo commerciale di questi saggi, contesto nel quale il rapporto efficacia/costo ha un peso consistente soprattutto quando i campioni da analizzare sono assai numerosi.

La BSA è stata scelta per l'ampio spettro di azione che sembra esercitare a vari livelli, come riportato anche in un lavoro molto recente da King e collaboratori (2009), che evidenziano come l'additivo abbia effetto in PCR su inibizioni sia esercitate a livello dell'enzima che a livello della disponibilità degli acidi nucleici.

I detergenti anionici vengono indicati da Rådström e collaboratori come particolarmente efficaci per contrastare gli effetti inibenti l'amplificazione PCR derivati da contaminanti polisaccaridici vegetali.

Il PVP per l'azione antiossidante dei composti fenolici, già verificata durante la procedura di estrazione del DNA genomico.

In laboratorio sono state condotte prove di amplificazione con aggiunta al tampone standard di PCR (vedi sezione Materiali e Metodi), di varie concentrazioni di ciascuno dei coadiuvanti selezionati, anche in maniera combinata. E' stata quindi indagata la capacità degli stessi di ristabilire l'amplificazione in campioni di composizione nota quando la reazione è risultata fortemente inibita in condizioni standard. I risultati ottenuti sono stati confrontati e confermati effettuando l'analisi PCR, con l'aggiunta degli additivi opportuni, su campioni di DNA già amplificabili in condizioni normali, per i quali è risultato invariato il profilo di amplificazione in precedenza individuato.

Si è dimostrata particolarmente efficace nel promuovere la reazione PCR-SCAR la combinazione di additivi BSA e Tween 20, aggiunti in reazione rispettivamente alla percentuale dello 0.4%(p/v) e dello 0.5%(v/v). Il detergente Triton X-100 ha dato risultati paragonabili a quelli ottenuti con il Tween 20, mentre il polimero PVP non ha portato alcun vantaggio alla reazione PCR a nessuna delle concentrazioni testate, 1%, 2% e 4%(p/v) (dati non mostrati).

È stata quindi riformulata la miscela di amplificazione PCR-SCAR.

Miscela di amplificazione SCAR, reazione con additivi BSA e Tween 20:

DNA	20-100ng
Tampone	[75mM Tris-HCl, pH 9.0; 50mM KCl; 20mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]
MgCl <sub>2</sub>	1.5-2mM
dNTP	200μM
Primer SCAR For	12.5pmol
Primer SCAR Rev	12.5pmol
BSA	0.4% (p/v)
Tween 20	0.5% (v/v)
Taq DNA Polimerasi	1U
Acqua sterile	
Volume totale	25μl

La nuova composizione è stata utilizzata per tutte le analisi SCAR successive, indipendentemente dalla natura del DNA analizzato ed ha dimostrato una notevole efficacia, consentendo di eliminare eventuali procedure aggiuntive di purificazione del DNA stampo e notevolmente più veloce lo screening dei campioni. Sempre in virtù di un possibile utilizzo su ampia scala del protocollo, questa ottimizzazione dei tempi risulta di particolare rilevanza.

## 4.5 Analisi degli oli essenziali

Come riportato in **tabella 2** dell'introduzione, il genere *Origanum* presenta un'ampia variabilità dal punto di vista fitochimico. La droga che può essere commercializzata con il nome di origano è selezionata esclusivamente tra i taxa che producono oli essenziali ricchi in monoterpenoidi fenolici, cui sono ascritte anche le principali attività biologiche e farmacologiche. Uno dei parametri principali fissati dalla Ph. Eur. per la commercializzazione di preparati con il nome di origano (*Origanum herba*) è proprio la concentrazione dei composti fenolici nell'olio essenziale, stabilendo per questo un limite minimo di contenuto in carvacrolo e/o timolo del 1.5% (v/v).

L'allestimento di un campo collezione del genere *Origanum*, per il compimento delle analisi genetiche necessarie ad isolare i marcatori genomici caratterizzanti i principali contaminanti vegetali rinvenuti nei preparati commerciali di Origano Mediterraneo, ha rappresentato anche un'ottima occasione per avere una "popolazione" *ex situ* dei principali taxa del genere, tutti nelle medesime condizioni ambientali. Stante l'elevata plasticità del metabolismo secondario di queste specie, l'uniformità delle condizioni colturali è sì condizione ininfluenza per le analisi genetiche, ma risulta particolarmente rilevante per le caratterizzazioni fitochimiche. In letteratura sono numerosi gli studi effettuati sulla composizione degli oli essenziali di taxa all'interno del genere *Origanum*, ma in quasi tutti i casi viene riportato lo studio di una, al massimo due specie o sottospecie, in popolazioni fortemente localizzate (Russo *et al.*, 1998; Skoula *et al.*, 1999; Lukas *et al.*, 2009).

Il reperimento di genotipi di *Origanum* per l'allestimento del campo collezione è un processo tuttora in corso allo stato attuale del lavoro. Sebbene per le analisi genetiche il materiale presente sia pienamente utile, per la caratterizzazione fitochimica lo studio è ancora in una fase molto preliminare.

Solo per le accessioni messe a dimora nella primavera del 2007 è stato possibile effettuare almeno un campionamento della porzione aerea nel periodo balsamico e pertanto i dati riguardanti gli oli essenziali fino ad ora disponibili si riferiscono esclusivamente alla produzione dell'anno 2008. È da ricordare che per quanto riguarda l'origano la produzione di oli essenziali si stabilizza a partire dal secondo anno di coltivazione in campo (Marzi, 1997)

Un'analisi accurata degli oli essenziali richiederebbe inoltre il confronto fra i campioni raccolti in almeno tre annate di produzione, termine che risulta oltre l'orizzonte di chiusura del triennio del dottorato.

Nei campioni di oli essenziali fino ad ora analizzati risultano assenti tutti quelli ascrivibili alle accessioni dei taxa *O. onites*, *O. heracleoticum* e *O. majorana*, messi a dimora nel 2008.

Per ogni accessione nel campo collezione sono presenti quattro individui (A, B, C, D), tali individui non sempre hanno la medesima età perché in alcuni casi si è reso necessario il reintegro di alcuni di essi.

Nel periodo giugno-luglio 2008 sono stati raccolti campioni di 72 individui presenti nel campo collezione, appartenenti a 33 accessioni differenti. Quando è stato possibile per ogni accessione il campionamento è stato effettuato per tutti e 4 gli individui/repliche.

Ogni campione è stato sottoposto a distillazione in corrente di vapore e l'olio essenziale estratto è stato pesato; la resa in olio è risultata piuttosto variabile anche all'interno delle varie accessioni.

Gli oli essenziali sono stati quindi analizzati quali-quantitativamente per via gascromatografica.

Per ciascun campione i componenti volatili dell'olio essenziale sono stati raggruppati nelle cinque categorie chimiche principali indicate da Skoula e Harborne (2002) (vedi Introduzione):

1. composti 'tipo cimene' (Cim);
2. composti 'tipo sabinene' (Sab);
3. monoterpenoidi aciclici (Ac);
4. composti 'tipo bornano' (Bor);
5. sesquiterpenoidi (Sesq).

I dati così ottenuti da ciascun campione sono stati utilizzati per effettuare l'analisi delle funzioni discriminanti canoniche) attraverso il programma di analisi statistica SPSS-17.

L'analisi è stata effettuata raggruppando i dati ottenuti dai 72 individui campionati nei 6 taxa del genere *Origanum* di appartenenza:

<i>O. vulgare</i>	gruppo 1;
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gruppo 2;
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	gruppo 3;
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>viride</i>	gruppo 4;
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	gruppo 5;
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>gracile</i>	gruppo 6.

L'analisi discriminante delle funzioni discriminanti canoniche consente di separare i gruppi *O. vulgare* subsp. *hirtum* (3), *O. vulgare* subsp. *virens* (5) e *O. vulgare* subsp. *gracile* (6), dai gruppi *O. vulgare* (1) e *O. vulgare* subsp. *vulgare* (2) in base alle prime due funzioni discriminanti canoniche che nel loro insieme spiegano il 99.5% della varianza (**tabella 15**, **figura 25**). Il gruppo *O. vulgare* subsp. *viride* (4) sembra invece possedere caratteristiche intermedie.

**Tabella 15.** Riepilogo delle funzioni discriminanti canoniche.

Funzione	Autovalori			Correlazione canonica
	Autovalore	% di varianza	% cumulata	
<b>1</b>	1.418 <sup>a</sup>	92.2	92.2	.766
<b>2</b>	.114 <sup>a</sup>	7.4	99.5	.319
<b>3</b>	.007 <sup>a</sup>	.4	100.0	.082
<b>4</b>	.000 <sup>a</sup>	.0	100.0	.015

a=Per l'analisi sono state usate le prime 4 funzioni discriminanti canoniche.

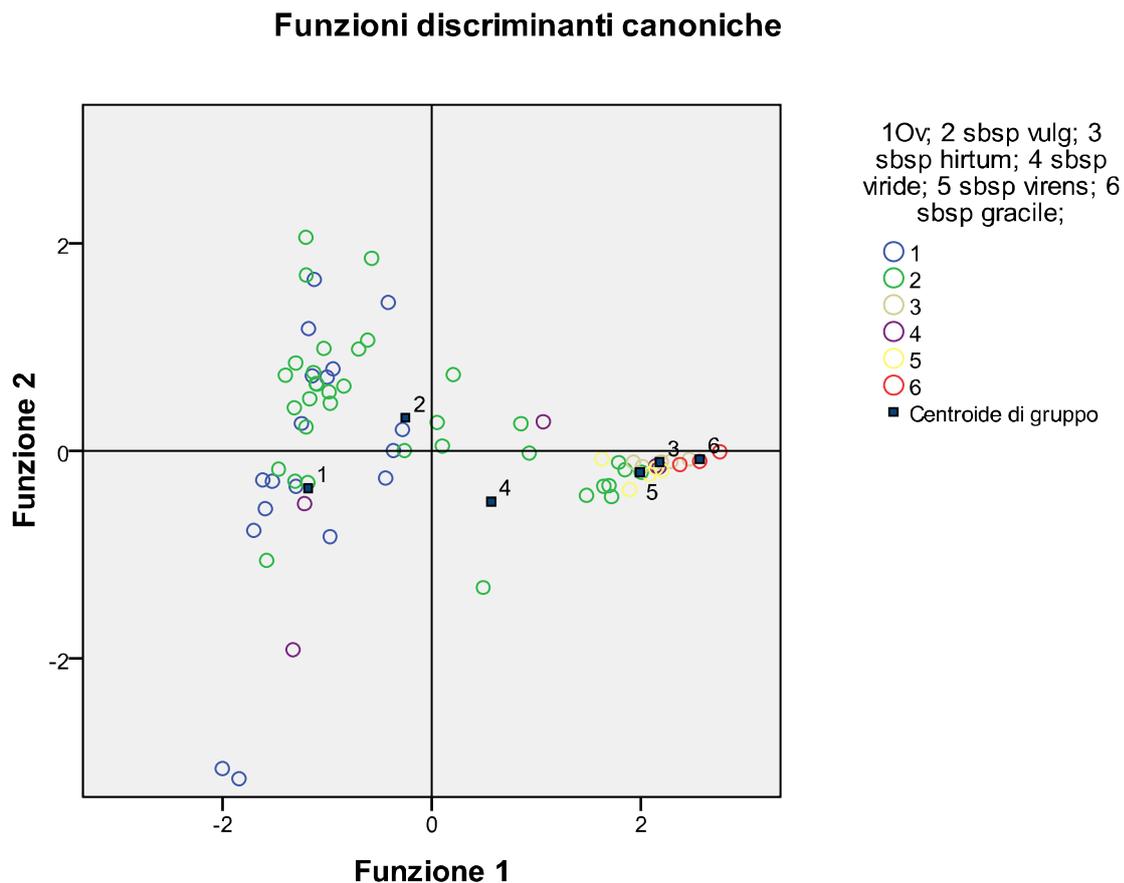
Var	Funzione			
	1	2	3	4
<b>Cim</b>	.990*	-.125	-.040	-.051
<b>Sesq<sup>b</sup></b>	-.730*	-.250	-.018	-.636
<b>Ac</b>	-.160	-.768*	-.186	.591
<b>Sab</b>	-.244	.575	-.769*	.136
<b>Bor</b>	-.626	.354	.636*	.280

Correlazioni comuni entro gruppi tra variabili discriminanti e funzioni discriminanti canoniche standardizzate.

Variabili ordinate in base alla dimensione assoluta della correlazione entro la funzione.

\*=Correlazione assoluta più grande tra ciascuna variabile e qualsiasi funzione discriminante.

b=Questa variabile non viene usata nell'analisi.



**Figura 25.** Grafico FD1× FD2.

L'analisi della varianza effettuata attraverso il test di Kruskal-Wallis (vedi Materiali e Metodi), conferma l'esistenza di differenze significative all'interno dei taxa a carico della resa in olio essenziale e della percentuale di composti 'tipo cimene', 'tipo bornano' e sesquiterpeni negli oli (**Tabella 16**).

**Tabella 16.** Analisi della varianza (Test di Kruskal-Wallis <sup>a</sup>).

	<b>Cim</b>	<b>Sab</b>	<b>Ac</b>	<b>Bor</b>	<b>Sesq</b>	<b>resa</b>
Chi-quadrato	37.771	9.281	9.349	32.079	33.938	28.222
df	5	5	5	5	5	5
Sig. Asint.	.000	.098	.096	.000	.000	.000

a= Variabile di raggruppamento: 1-*O. vulgare*; 2-subsp. *vulgare*; 3-subsp. *hirtum*; 4-subsp. *viride*; 5-subsp. *virens*; 6-subsp. *gracile*.

Per individuare le differenze, esistenti fra i taxa sono stati applicati confronti multipli della statistica parametrica, nello specifico il test di Tukey Kramer per campioni disomogenei (Soliani *et al.*, 2005). L'analisi ha consentito di distinguere 3 raggruppamenti in base alla percentuale di composti 'tipo cimene' presenti nell'olio essenziale, in particolare il gruppo *O. vulgare* possiede il più basso contenuto in composti timolo/carvacrolo, seguito dal taxon *O. vulgare* subsp. *vulgare* e dal taxon *O. vulgare* subsp. *viride*, mentre i taxa *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. vulgare* subsp. *virens* e *O. vulgare* subsp. *gracile* ne possiedono una percentuale significativamente maggiore (**tabella 17**).

**Tabella 17.** Variabile **Cim** (Test di Tukey Kramer <sup>a, b</sup>).

	N	Sottoinsieme per $\alpha = 0.5$		
		1	2	3
1 <i>O. vulgare</i>	19	11.0532		
2 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	35	30.4397	30.4397	
4 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>viride</i>	5		51.7420	
5 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	5			83.1860
3 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	5			87.1640
6 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>gracile</i>	3			95.8733
Sig.		.701	.611	.933

Sono visualizzate le medie per i gruppi di sottoinsiemi omogenei.

a=Utilizza dimensione campionaria media armonica = 5.914.

b=Poiché le dimensioni dei gruppi non sono uguali, verrà utilizzata la media armonica delle dimensioni dei gruppi. Non vengono garantiti i livelli di errore Tipo I.

Differenze significative sono state riscontrate anche a livello dei dei composti ‘tipo bornano’ [contenuto significativamente più elevato nei taxa *O. vulgare* e *O.vulgare* subsp. *vulgare*] (**tabella 18**), e dei composti sesquiterpenici (**tabella 19**) [contenuto significativamente più elevato nei taxa *O. vulgare* e *O.vulgare* subsp. *vulgare*, significativamente più basso nei taxa ad alta percentuale di composti tipo cimene].

**Tabella 18.** Variabile **Bor** (Test di Tukey Kramer <sup>a, b</sup>).

	N	Sottoinsieme per $\alpha = 0.5$		
		1	2	3
6 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>gracile</i>	3	.3767		
3 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	5	2.7800		
5 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	5	4.2860		
4 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>viride</i>	5	13.6940	13.6940	
2 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	35		28.5531	28.5531
1 <i>O. vulgare</i>	19			34.5774
Sig.		.688	.580	.985

Sono visualizzate le medie per i gruppi di sottoinsiemi omogenei.

a=Utilizza dimensione campionaria media armonica = 5.914.

b=Poiché le dimensioni dei gruppi non sono uguali, verrà utilizzata la media armonica delle dimensioni dei gruppi. Non vengono garantiti i livelli di errore Tipo I.

**Tabella 19.** Variabile **Sesq** (Test di Tukey Kramer <sup>a, b</sup>).

	N	Sottoinsieme per $\alpha = 0.5$		
		1	2	3
6 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>gracile</i>	3	1.5833		
3 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	5	4.7560		
5 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	5	7.2920		
4 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>viride</i>	5		22.0720	
2 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	35		27.1431	27.1431
1 <i>O. vulgare</i>	19			38.3047
Sig.		.976	.986	.695

Sono visualizzate le medie per i gruppi di sottoinsiemi omogenei.

a=Utilizza dimensione campionaria media armonica = 5.914.

b=Poiché le dimensioni dei gruppi non sono uguali, verrà utilizzata la media armonica delle dimensioni dei gruppi. Non vengono garantiti i livelli di errore Tipo I.

Per quanto riguarda la resa in olio i taxa risultati significativamente più produttivi sono anche quelli più ricchi in composti ‘tipo cimene’: *O. vulgare* subsp. *viride*, *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. vulgare* subsp. *virens*, con l’unica eccezione del taxon *O. vulgare* subsp. *gracile*, che pur avendo un olio essenziale estremamente ricco in timolo (95.87%) presenta una resa piuttosto bassa (**tabella 20**). I gruppi 3, e 5 sono quindi caratterizzati da una resa elevata e da una abbondante presenza di monoterpenoidi fenolici e loro precursori (Cim) fra i composti volatili dell’olio essenziale, confermando i dati che si trovano in letteratura per questi taxa (Skoula e Harborne, 2002.).

Per tutte le variabili considerate il taxon *O. vulgare* subsp. *viride* (4) mostra caratteristiche intermedie fra i due raggruppamenti (1-2) [*O. vulgare*; *O. vulgare* subsp. *vulgare*] e (3-5-6) [*O. vulgare* subsp. *hirtum*; *O. vulgare* subsp. *virens*; *O. vulgare* subsp. *gracile*].

**Tabella 20.** Variabile **Resa** (Test di Tukey Kramer <sup>a, b</sup>).

	N	Sottoinsieme per $\alpha = 0.5$		
		1	2	3
1 <i>O. vulgare</i>	19	.2679		
2 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	35	.5714		
6 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>gracile</i>	3	.8467	.8467	
4 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>viride</i>	5		1.5120	1.5120
3 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	5			1.6820
5 <i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	5			1.9120
Sig.		.701	.564	.917

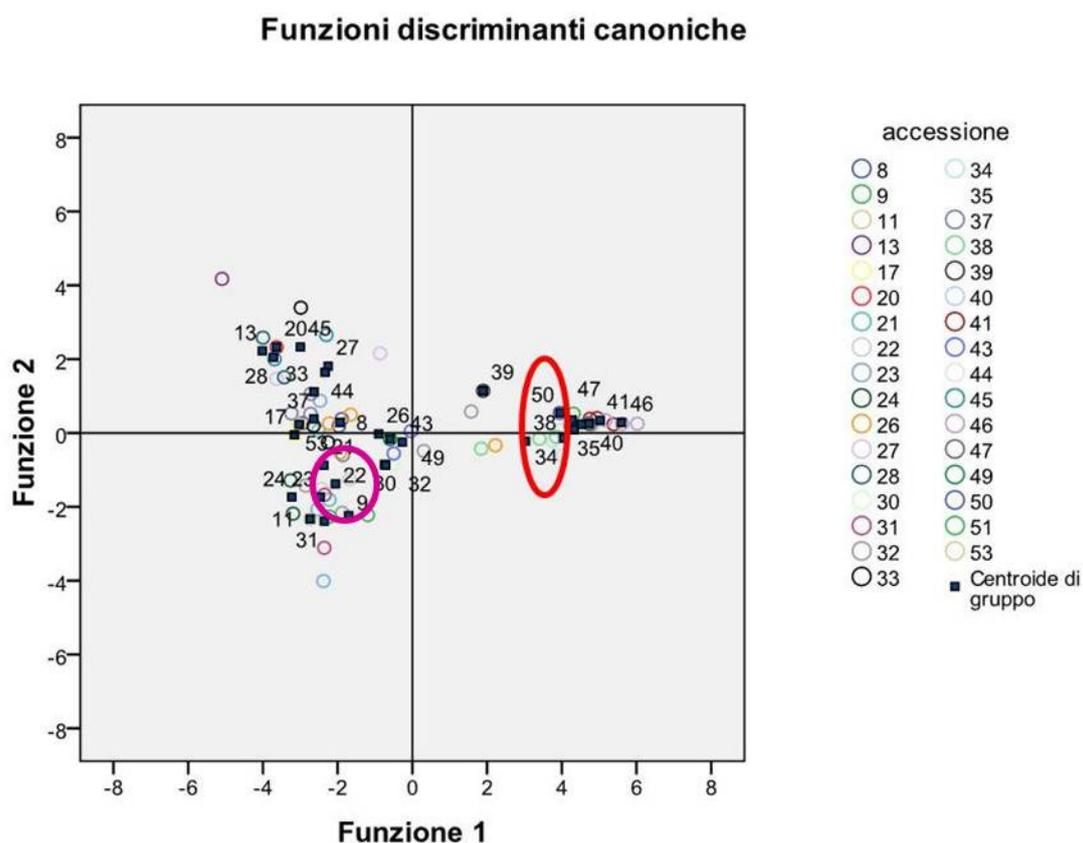
Sono visualizzate le medie per i gruppi di sottoinsiemi omogenei.

a=Utilizza dimensione campionaria media armonica = 5.914.

b=Poiché le dimensioni dei gruppi non sono uguali, verrà utilizzata la media armonica delle dimensioni dei gruppi. Non vengono garantiti i livelli di errore Tipo I.

Dalla **figura 25** risulta evidente che sebbene i centroidi indicativi dei gruppi 1 (*O. vulgare*) e 2 (*O. vulgare* subsp. *vulgare*) risultino molto distanti dai centroidi dei gruppi 3 (*O. vulgare* subsp. *hirtum*), 5 (*O. vulgare* subsp. *virens*) e 6 (*O. vulgare* subsp. *gracile*), alcuni individui appartenenti al gruppo 2 (rappresentati da cerchi verdi) tendono a distribuirsi con gli altri gruppi (3, 5, 6).

Una seconda analisi delle funzioni discriminanti canoniche (**figura 26**) effettuata considerando i singoli campioni non più raggruppati nei sei taxa utilizzati per l'analisi precedente, mostra che questi individui 'anomali' appartengono a 3 accessioni (circondate in rosso in **figura 26**) tutte appartenenti al taxon *O. vulgare* subsp. *vulgare* [34-*O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Albania; 38-*O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Italia; 50-*O. vulgare* subsp. *vulgare* provenienza Italia] (vedi elenco accessioni in Materiali e metodi).



**Figura 26.** Grafico FD1×FD2.

Tutti gli individui appartenenti a queste accessioni mostrano elevata resa in olio (compresa fra 0.83 e 3.56%) ed elevata percentuale di timolo/carvacrolo (compresa fra 66.86 e 79.81%), più vicine alle medie riscontrate per i taxa *O. vulgare* subsp. *hirtum*; *O. vulgare* subsp. *gracile*; *O.*

*vulgare* subsp. *virens* (**tabella 19**, Resa; **tabella 16**, Cim) che a quelle del taxon al quale sono state attribuite. Dal punto di vista morfologico questi individui mostrano caratteristiche leggermente diverse da quelle tipiche della sottospecie *vulgare*, ad esempio i fiori sono bianchi anziché rosa e le brattee verdi anziché violette, è quindi possibile che la denominazione con cui questi semi ci sono pervenuti dalle banche di germoplasma consultate non fosse propriamente corretta.

Viceversa, il centroide corrispondente ad una accessione di *O. vulgare* subsp. *viride* [22 *O. vulgare* subsp. *viride* provenienza Italia, circondato di viola in **figura 26**] tende a raggrupparsi con le accessioni dei gruppi 1 e 2. Gli individui appartenenti a questa accessione contengono una bassa percentuale di composti ‘tipo cimene’ (circa 12%) e bassa resa (0,39%), più simili a quelle del gruppo 1 (*O. vulgare*) che a quelle dell’ipotetico gruppo di appartenenza. Anche in questo caso le differenze riscontrate a livello chimico sono confermate da caratteristiche morfologiche (fiori rosa e brattee purpuree) non conformi a quelle descritte in letteratura per la sottospecie *viride*, generalmente caratterizzata da fiori bianchi e brattee verdi.

Analisi successive ci consentiranno di chiarire meglio l’attribuzione di questi individui all’interno dei corretti taxa.

Tutti gli individui attribuiti ai taxa, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; *O. vulgare* subsp. *virens*; *O. vulgare* subsp. *gracile* tendono invece a raggrupparsi intorno al corretto centroide di gruppo anche in questa seconda analisi, non dando adito a dubbi di errata attribuzione delle accessioni.

L’analisi volta alla caratterizzazione chimica degli individui presenti nel campo collezione è comunque estremamente preliminare e dovrà essere integrata con le accessioni mancanti nei primi campionamenti.



## 5 CONCLUSIONI

Lo scenario che emerge dall'analisi dei campioni commerciali evidenzia un'elevata eterogeneità ed una frequente contaminazione, talora configurabile come una vera e propria adulterazione fraudolenta, dell'Origano Mediterraneo reperibile sul mercato europeo. Si suggerisce pertanto una particolare attenzione all'autenticazione di questa droga da parte dei commercianti all'ingrosso europei e da parte delle autorità preposte al controllo. Lo sviluppo di un metodo molecolare affidabile per la individuazione degli adulteranti potrebbe consentire di velocizzare il controllo di qualità di Origano Mediterraneo soprattutto quando si debba analizzare un numero elevato di campioni, andando a complementare e convalidare altri approcci.

In questo lavoro di Dottorato sono stati individuati otto marcatori SCAR che consentono di identificare alcuni fra i contaminanti rinvenuti con maggior frequenza nei campioni commerciali di origano (*Cistus incanus*, *Rubus* sp., *Rhus coriaria*, *Origanum majorana* e *Satureja montana*) ed un contaminante (*Olea europea*) finora non segnalato ma riscontrato con frequenza nelle campionature più recenti. Il metodo elaborato permette un rapido ed accurato controllo di qualità dei campioni di origano. La elevata specificità dei marcatori SCAR facilita la trasferibilità del protocollo descritto fra vari laboratori. Le ridotte dimensioni degli ampliconi ottenibili con ciascuna coppia di primer rappresenta un ulteriore vantaggio rendendo i marcatori SCAR individuati per ciascun contaminante applicabili a campioni commerciali essiccati in cui il DNA potrebbe risultare, almeno parzialmente, degradato a causa dell'essiccazione e degli incerti tempi di conservazione. Il metodo è affidabile e presenta un limite di rilevamento dell'1% per singolo contaminante. L'aggiunta di BSA e di un detergente non ionico, come il Tween 20 o il Triton X-100 nel tampone di amplificazione, favorisce enormemente la reazione PCR anche su DNA proveniente da campioni commerciali essiccati che non producevano alcuna resa quando amplificati utilizzando il tampone standard e rappresenta un upgrade metodologico significativo. Questo approccio consente di evitare laboriosi passaggi di purificazione e di velocizzare in maniera considerevole le analisi dei campioni. Il metodo elaborato fornisce pertanto un valido supporto alle analisi tradizionali e può essere utilizzato per lo screening preliminare di un elevato numero di lotti, consentendo

## **Conclusioni**

di scartare immediatamente i campioni sospetti e restringendo pertanto il numero di campioni da sottoporre alle analisi di tipo farmacognostico.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Abolmaaty A., Gu W., Witkowsky R., Levin R. E. 2007. The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples. *Journal of Microbiological Methods*. 68:349-352.

Abu Al-Soud W. e Rådström P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(2):485-493.

Abu Al-Soud, W. 2000. Optimisation of diagnostic PCR: A study of PCR inhibitors in blood and sample pretreatment. *Doctoral thesis*. Department of Applied Microbiology, Lund University, Lund, Sweden.

Adams R. P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.

Adams R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.

Adlimoghadam A., Hedayati M. H., Siadat S. D., Ahmadi H., Nejati M., Vandyousefi J., Norouzian D. 2008. Optimization of PCR conditions for detection of human *Brucellosis* from human serum samples. *Research Journal of Microbiology*. 3(5):352-358.

Afsharypour S., Sajjadi S. E., Erfan-Manesh M. 1997. Volatile constituents of *Origanum vulgare* ssp. *viride* (syn. *O. heracleoticum*) from Iran. *Planta Medica*. 63(2):179-80.

Agaward M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their application in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27:617-631.

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.

American Spice Trade Association (ASTA). Spice Adulteration. *White Paper*. Online: <http://www.astaspice.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3395> (accesso Agosto, 2008).

## Bibliografia

Angelini L. G., Carpanese G., Cioni P. L., Morelli I., Macchia M., Flamini G. 2003. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:6158–6164.

Arnold N., Bellomaria B., Valentini G., Arnold H. J. 1993. Comparative study of the essential oils from three species of *Origanum* growing wild in the eastern Mediterranean region. *Journal of Essential Oil Research*. 5:71-77.

Arras G. (1988). Antimicrobial activity of various essential oils against some citrus fruit disease agents. In: Goren R. e Mendel K. (Eds.). Citriculture. Vol. 2. Cultural Practices, Diseases and Nematodes. Proceedings of the Sixth International Citrus Congress, Middle-East. TelAviv, Israel. 6-11 March 1988.

Ayanoglu F., Ergül A., Arslan M. 2006. Assessment of genetic diversity in Turkish oregano (*Origanum onites* L.) germplasm by AFLP analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 81:45-50.

Azizi A., Wagner C., Honermeier B., Friedt W. 2009. Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. *Plant Systematics and Evolution*. 281:151-160.

Bachmann B., Lüke W., Hunsmann G. 1990. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Research*. 18(5):1309.

Baričević D. e Bartol T. 2002. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* genus. In: Kintzios S. E. (Ed.). *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*, 1st Ed. CRC Press: London, UK. 177-213.

Başer K. H. C., Tumen G., Ozek T., Kurkcuoglu M. 1992. Composition of the essential oil of *Origanum sipyleum* of Turkish origin. *Journal of Essential Oil Research*. 4:139–142.

Beckmann J. S. e Soller M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica*. 35: 111-124.

Beckmann J. S. e Soller M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. In: B. J. Mifflin (Ed.). *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. Oxford Press, Oxford. Vol. 3.

- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Costa, J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*. 106:132–139.
- Beziæ N., Šamaniaë I., Dunkiaë V., Besendorfer V., Puizina J. 2009. Essential oil composition and Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence variability of four South-Croatian *Satureja* species (Lamiaceae). *Molecules*. 14:925-938.
- Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G., Piattelli M. 1993. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*. 8 (6):331-337.
- Boscherini G., Morgante M., Rossi R., Vendramin G. G. 1994. Allozyme and chloroplast DNA variation in italian and greek population of *Pinus leucodermis*. *Heredity* 73:284-290
- Bouchra C., Achouri M., Hassani L. M. I., Hmamouchi M. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*. 89:165–169.
- Bucci G., Vendramin G. G., Lelli L., Vicario F. 1997. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes *Theoretical and Applied Genetics*. 95:1138–1146.
- Buziashvili I. S., Komissarenko N. F., Kolesnikov D. G. 1970. Polyphenolic compounds of *Rhus coriaria*. Flavonoids. *Chemistry of Natural Compounds*. 6(5):641-642.
- Calpouzos L. 1954. Botanical aspects of oregano. *Economic Botany*. 8:222-233.
- Campanini E. 1998. Dizionario di fitoterapia e piante medicinali. Tecniche Nuove (Ed.). Milano, Italia.
- Cheng K. T., Tsay H. S., Chen C. F., Chou T. W. 1998. Determination of the components in a Chinese prescription, Yu-Ping-Feng San by RAPD analysis. *Planta medica*. 64: 563-565.
- Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J. D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31(13):3497-3500.

## Bibliografia

Colin M. E., Ducos de Lahitte J., Larribau E., Boue T. 1989. Activity of essential oils of Lamiaceae on *Ascosphaera apis* and treatment of an apiary. *Apidologie*. 20 (3):221-228.

Collins F. S., Brooks L. D., Charkravarti A. 1998. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research*. 8:1229-1231.

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.

Daferera D. J., Ziagos B. N., Polissiou M. G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*. 22:39-44.

Daouk R. K., Dagher S. M., Sattout E. J. 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*. 58:1147-1149.

Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1:19-21.

Demeke T. e Adams R. P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*. 12(3):332-334.

Doyle J. J. e Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19:11-15.

Doyle J. J. e Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.

Dudai N., Poljakoff-Mayber A., Mayer A. M., Putievsky E., Lerner H. R. 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*. 25:1079-1089.

Echeverrigaray S., Fracaro F., Zacaria, J. 2005. RAPD based genetic relationships between population of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33:409-417.

El-Gengaihi S., Taha H. S., Kamel A. M. 2006. In vivo and in vitro comparative studies of *Origanum* species. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 4:127-134.

Ellsworth D. L., Rittenhouse K. D., Honeycutt R. L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*. 14:214-217.

- el-Sissi H. I., Ishak M. S., el-Wahid M. S. 1972. Polyphenolic components of *Rhus coriaria* leaves. *Planta Medica*. 21(1):67-71.
- el-Sissi H. I., Ishak M. S., el-Wahid M. S. 1972. Polyphenolic components of *Rhus coriaria* leaves. *Planta Medica*. 21(1):67-71.
- Esen G., Azaz A. D., Kurkcuglu M., Baser K. H. C., Tinnaz A. 2007. Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letswaart from the Marmara region, Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. 22, 371–376.
- Fang G., Hammar S., Rebecca R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*. 13:52–56.
- Fischer N., Nitz S. e Drawert F. 1987. Original flavour compounds and the essential oil composition of marjoram (*Majorana hortensis* Moench). *Flavour and Fragrance Journal*. 2: 55-61.
- Fleisher A. e Fleisher Z. 1988. Identification of biblical hyssop and origin of the traditional use of oregano-group in the Mediterranean region. *Economic Botany*. 42:232-241.
- Fleisher A. e Sneer N. 1982. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 33:441-446.
- Fracaro F., Zacaria J., Echeverrigaray S. 2005. RAPD based relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33:409-417.
- Geuna F., Hartings H., Scienza A. 1998. A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16(1):61-67.
- Ghosh R., Paul S., Ghosh S. K., Roy A. 2009. An improved method of DNA isolation suitable for PCR-based detection of begomoviruses from jute and other mucilaginous plants. *Journal of Virological Methods*. 159:34–39.
- Gounaris Y., Skoula M., Fournaraki C., Drakakaki G., Makris A. 2002. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum × intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30(3):249-258.

## Bibliografia

Graham J., Squire G. R., Marshall B., Harrison R. E. 1997. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPD markers. *Molecular Ecology*. 6:4001-1008.

Guzmán B. e Vargas P. 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37:644-660.

Haley S. D., Afanador L. K., Kelly J. D. 1994. Selection for monogenic resistance traits with coupling-and repulsion-phase RAPD markers. *Crop Science*. 34:1061–1066.

Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 23(3):504-511.

Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S. A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 25:3957-3958.

Hernandez P., Martin A., Dorado, G. 1999. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for introgression and marker-assisted selection of wheat. *Molecular Breeding*. 5:245-253.

Horne E. C., Kumpatla S. P., Patterson K. A., Gupta M., Thompson S. A. 2004. Improved high-throughput sunflower and cotton genomic DNA extraction and PCR fidelity. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22(1):83-84.

Iestwaart J. H. 1980. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae) Ph.D. Thesis. Leiden Botanical Series 4. The Hague. Leiden University Press. Leiden.

Innis M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H., Brow M. A. D. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85:9436-9440.

Ismaiel A. A. 1988. The inhibition of *Clostridium botulinum* growth and toxin production by essential oils of spices. *Dissertation Abstracts International*. 48(10):2834.

Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malceschii A., Marmiroli N., Aert R., Volckaert G., Rueda T., Linacero R.,

- Vazques A., Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European Laboratories. *Molecular Breeding*. 3:381-390.
- Kanazawa K., Kawasaki H., Samejima K., Ashida H., Danno G. 1995. Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against dietary carcinogen, Trp-P-2 are galangin and quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43:404-409.
- Katsiotis A., Hagidimitriou M., Drossou A., Pontikis C., Loukas M. 2003. Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. *Euphytica*. 132:279-286.
- Katsiotis A., Nikoloudakis N., Linos A., Drossou A., Constantinidis T. 2009. Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. *Scientia Horticulturae*. 121:103-108.
- Kaufmann M. e Wink M. 1994. Molecular systematics of the Nepetoideae (family Labiatae): phylogenetic implications from rbcL gene sequences. *Zeitschrift für Naturforschung*. 49:635-645.
- Kim C. S., Lee C.H., Shin J. S., Chung Y. S., Hyung N. I. 1997. A simple and rapid method of isolation of high quality genomic DNA from fruit trees an conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*. 25:1085-1086.
- King C. E., Debruyne R., Kuch M., Schwarz C., Poinar H. N. 2009. A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *BioTechniques*. 47:941-949.
- Kintzios S. E. 2002. Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios, S. E. (Ed.) *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*, 1st Ed. CRC Press: London, UK. pp. 3-10.
- Kitade Y., Ootsuka S., Iitsuka O., Saga N. 2003. Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) gene. *Journal of Applied Phycology*. 15:555-557.
- Kizil S. e Uyar F. 2006. Antimicrobial activities of some thyme (*Thymus*, *Satureja*, *Origanum* and *Thymbra*) species against important plant pathogens. *Asian Journal of Chemistry*. 18:1455–1461.
- Klocke E., Langbehn J., Grewe C., Pank F. 2002. DNA Fingerprinting by RAPD on *Origanum majorana* L. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. The Haworth Herbal Press; Binghamton, NY. Vol. 9:171-176.

## Bibliografia

- Koitaishi R., Suzuki T., Kawaz T., Sakai A., Kuroiwa H., Kuroiwa T. 1997. 1,8-Cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*. 110:1–6.
- Kokkini S. 1996. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In: Padulosi S. (Ed.). Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. 8-12 May 1996. CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.
- Kokkini S. e Vokou D. 1989. Carvacrol-rich plants in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*. 4:1-7.
- Kokkini S., Vokou D., Karousou R. 1991. Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece. *Botanika Chronika*. 10:337-346.
- Kongkiatngam P., Waterway M. J., Fortin M. G., Coulman B. E. 1995. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. *Euphytica*. 84:237–246.
- Koonjul P.K., Brandt W. F., Farrant J. M., Lindsey G. G. 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research*. 27(3):915-916.
- Kreader C. A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:1102-1106.
- Križman M., Jakše J., Baričević D., Javornik B., Prošek M. 2006. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. *Acta Agriculturae Slovenica*. 87:427-433.
- Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S., Boskou D. 1993. Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 197:20-23.
- Lawrence B. M. 1984. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfumer and Flavorist*. 9:41-51.
- Lee S. O., Choi G. J., Jang K. S., Lim H. K., Cho K. Y., Kim J. C. 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against post-harvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*. 23:97–102.

- Levene H. 1960. In: Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling, I. Olkin et al. eds., Stanford University Press. pp. 278-292.
- Li Y. X., Su Z. X., Chen F. 2002. Rapid extraction of genomic DNA from leaves and bracts of dove tree (*Davidia involucrata*). *Plant Molecular Biology Reporter*. 20:185-185.
- Lukas B., Schmiederer C., Franz C., Novak J. 2009. Composition of Essential Oil Compounds from Different Syrian Populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae) *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 57:1362-1365.
- Maas J. L. 1977. Pollen ultrastructure of Strawberry and other Small-fruit Crops. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 102(5):560-571.
- Mader E., Lukas B., Novak J. 2008. A strategy to setup codominant microsatellite analysis for High-Resolution-Melting-Curve-Analysis (HRM). *BMC Genetics*. 9:69-76.
- Madsen H. L., Bertelsen G., Skibsted L. H. 1997. Antioxidative activity of spices and spice extracts. In: Risch S. J. e Ho C. T. (Eds.). Spices. Flavour chemistry and antioxidant properties. American Chemical Society. Washington DC. 1997.
- Maliyakal E. J. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*. 20:2381.
- Marieschi M., Torelli A., Poli F., Sacchetti G., Bruni R. 2009. RAPD-based method for quality control of Mediterranean oregano and its contribution to pharmacognostic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:1835-1840.
- Marzi V. 1997. Agricultural practices for oregano. In: Padulosi S. (ed.). Oregano. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996, Valenzano (Bari), Italy. 61-67.
- Masoud S. A., Johnson L. B., White F. F. 1992. The sequence within two primers influences the optimum concentration of dimethyl sulfoxide in the PCR. *Genome Research*. 2:89-90.
- McDermott J. M., Brandle U., Dutly F., Haemmerli U. A., Keller S., Muller K. E., Wolf M. S. 1994. Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR and VNTR markers. *Phytopathology*. 84:1316-1321.

## Bibliografia

Michiels A., Van den Ende W., Tucker M., Van Riet L., Van Laere A. 2003. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*. 315:85-89.

Milos M., Mastelic J., Jerkovic I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compound from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*. 71:79-83.

Moure A., Cruz J. M., Franco D., Domínguez J. M., Siniero J., Domínguez H., Nùñez M. J., Parajò J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72:145-171.

Muller-Riebau F., Berger B., Yegen O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 43:2262–2266.

Mullis K. B. e Faloona F. A. 1987. Specific syntesis of DNA in vitro via a Polymerase catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymolgy*. 155: 335-350.

Mullis K. B., Faloona F. A., Scharf S. J., Saiki S. K., Horn G. T., Erlich H. A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51: 263-273.

Murray M. G. e Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8:4321-4325.

Nagai M., Yoshida A., Sato N. 1998. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 44(1):157-163.

Neeraj J., Shasany A. K., Singh S., Singh Khanuja S. P., Kumar S. 2008. SCAR markers for correct identification of *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus fraternus*, *Phyllanthus debilis* and *Phyllanthus urinaria* used in scientific investigations and dry leaf bulk herb trade. *Planta Medica*. 74: 296-301.

Nieri P., Adinolfi B., Morelli I., Breschi M. C., Simoni G., Martinotti E. 2003. Genetic characterization of the three medicinal *Echinacea* species using RAPD analysis. *Planta Medica*. 69: 685-686.

Nishida N., Tamotsu S., Nagata N., Saito C., Sakai A. 2005. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA

synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *J. Chem. Ecol.* 31:1187–1203.

Novak J., Lukas B., Bolzer K., Grausgruber-Gröger S., Degenhardt J. 2008. Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* Expressed Sequence Tag. *Molecular Ecology Resources.* 8:599-601.

Olivier G. W. 1996. The world market of oregano. In: Padulosi S. (Ed.). Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. 8-12 May 1996. CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.

Oregano Monograph 01/2005:1880. 2005. In: European Pharmacopoeia. 5<sup>th</sup> edition. Strasbourg, Council of Europe. pp.2155-2156.

Padmalatha K. e Prasad M. N. V. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology.* 5(3):230-234.

Padulosi, S., editor. 1997. Oregano. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 14. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy.

Pan H., Yang C., Wei Z., Jiang J. 2006. DNA extraction of birch leaves by improved CTAB method and optimization of its ISSR system. *Journal of Forestry Research.* 17:298-300.

Pandey R. N., Adams R. P., Flournoy L. E. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter.* 14:17-22.

Paran I. e Michelmore R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet.* 85:985-999.

Paster, N., Juven B. J., Shaaya E., Menasherov M., Nitzan R., Weisslowicz H., Ravid U. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Appl. Microbiol.* 11(1):33-37.

Paster, N., Menasherov M., Ravid U., Juven B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection.* 58 (1):81-85.

## Bibliografia

Pateraki I. e Kanellis A. K. 2004. Isolation of high-quality nucleic acids from *Cistus creticus* ssp. *creticus* and other medicinal plants. *Analytical Biochemistry*. 328:90-92.

Pignatti S. 1982. Flora d'Italia. Vol. 1, 2 e 3. Edagricole, Bologna.

Pomp D. e Medrano J. F. 1991. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 10:58-59.

Porebski S., Bailey G. L., Baum B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15:8-15.

Powell H. A., Gooding C. M., Garret S. D., Lund B. M., McKee R.A. 1994. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 18, 59-61.

Puchooa D. 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*. 3(4):253-255.

Quiros C. F. 1975. Exine pattern of a hybrid between *Lycopersicum esculentum* and *Solanum pennellii*. *The Jour. Heredity*. 66: 45-47.

Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Dahlenborg M., Löfström C. 2003. Pre-PCR Processing of Samples. In: Sachse K. e Frey J. (Eds.). PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. Vol. 216.

Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Lövenklev M., Löfström C. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology*. 26:133-146.

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.

Ralser M., Querfurth R., Warnatz H. J., Lehrach H., Yaspo M. L., Krobisch S. 2006. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 347:747-751.

- 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.
- Rayne S. e Mazza G. 2007. Biological activities of extracts from Sumac ( *Rhus* spp.): A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 62:165-175.
- Richards E., Reichardt M., Rogers S. 1994. Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: Ausubel M. A., Brent R., Kingston R., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Eds.). *Current Protocol in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc., USA. Vol 2.3.
- Rogers S. O. e Bendich A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. 5:69-76.
- Rohland N. e Hofreiter M. 2007. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques*. 42:343-352.
- Rout G. R., Samal S., Nayak S., Nanda R. M., Lenka P. C., Das P. 2002. An alternative method of plant DNA extraction of cashew (*Anacardium occidentale* L.) for Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Gartenbauwissenschaft*. 67(3):114-118.
- Roux K. H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*. 4:185-194.
- Ruberto G., Biondi D., Mel R., Piattelli M. 1993. Volatile flavour components of Sicilian *Origanum onites* L. *Flavour and Fragrance Journal*. 8:197-200.
- Russo M., Galletti G. C., Bocchini P., Carnacini A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian Oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 46:3741-3746.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sansavini S. e Pancaldi M. 1998. *Biotechnologie delle colture frutticole*. CLUEB. Bologna.
- Sarkar G., Kapelner S., Sommer S. S. 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research*. 18:7465.
- Schlotterer C. e Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20:2211-2215.

## Bibliografia

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18:233–234.

Scortichini M. e Rossi M. P. 1989. In vitro activity of some essential oils toward *Erwinia amylovora* (Burril). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 24 (3-4):423-431.

Scortichini M. e Rossi M. P. 1993. In vitro behaviour of *Erwinia amylovora* towards some natural products showing bactericidal activity. *Acta Horticulturae*. 338:191-198.

Shaaya E., Ravid U., Paster N., Juven B., Zisman U., Pissarev V. 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored- product insects. *Journal of Chemical Ecology*. 17(3):499-504.

Simon M. C., Gray D. I., Cook N. 1995. DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(3):822-824.

Skoula M. e Harborne J. B. 2002. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. In: Kintzios S. E. (Ed.). *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*, 1st Ed. CRC Press: London, UK, 2002; pp. 67-108.

Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G. Johnson C. B. 1999. A chemosystematic investigation of the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry*. 52:649-657.

Sokal R. R. e Rohlf F. J. 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*, 3rd ed., W. H. Freeman and Company, New York. pp. 423–427.

Sokmen M., Serkedjleva J., Dalerer, D., Gulluce M., Pollsslou M., Tape B., Akpulat H.A., Sahin F., Sökmen A. 2004. In vitro antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:3309–3312.

Sokovic M., Tzakou O., Pitarakoli D., Couladis M. 2002. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung/Food*. 46(5):317–320.

Soliani L., Sartore F., Siri E. 2005. *Manuale di Statistica per la Ricerca e la Professione. Statistica univariata e bivariata, parametrica e non parametrica, nelle discipline ambientali e biologiche*. Accesso gratuito sul sito web: <http://www.dsa.unipr.it/soliani>

- Soylu E. M., Soylu S., Kurt S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*. 161:119–128.
- Soylu S., Yigitbas H., Soylu E. M., Kurt S. 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*. 103:1021–1030.
- Sözen E. e Poyraz İ. 2008. Rapid and high quality DNA isolation from *Origanum onites* for RAPD and ISSR analysis. *Zeitschrift für Naturforschung*. 63: 595-598.
- Struhl K. 1989. Ribonucleases. In: Ausubel M. A., Brent R., Kingston R., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Eds.). *Current Protocol in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc., USA. Vol. 3.13.3.
- Tainter D. R. e Grenis A. T. 2001. Spices and Seasonings: a food technology handbook. Wiley-VCH. New York, 2001.
- Tautz D. e Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 12:4127–4138.
- Thompson D. P. 1996. Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection*. 59, 412–415.
- Tibbits J. F. G., McManus L. J., Spokevicius A. V., Bossinger G. 2006. A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA from mature trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 24:81-91.
- Tingey S. V. e Del Tufo J. P. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology*. 101: .349-352.
- Tsao R., Zhou T. 2000. Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research*. 12(1):113–121.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (Eds.). 1980. Flora Europea. 5. Cambridge.
- Vanichanon A., Blake N. K., Martin J. M., Talbert L. E. 2000. Properties of sequence-tagged-site primer sets influencing repeatability. *Genome*. 43: 47–52.

## Bibliografia

Varma A., Padh H., Shrivastava N. 2007. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*. 2(3):386-392.

Vokou D., Kokkini S., Bessiere J. M. 1993. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*. 21:287-295.

Vokou, D., Kokkini S., Bessiere J. M. 1988. *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece. Distribution, volatile oil yield, and composition. *Economic Botany*. 42:407-412.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23:4407-4414.

Vroh Bi I., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G., du Jardin P. 1996. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding*. 115:205-206.

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

Welsh J. e McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18: 7213-7218.

Wenz H. M., Robertson J. M., Menchen S., Oaks F., Demorest D. M., Schiebler D., Rosenblum B. B., Wike C., Gilbert D. A., Efcavitch J. W. 1998. High precision genotyping by denaturing polyacrylamide electrophoresis. *Genome Research*. 8:69-80.

Werker E., Putievsky E., Ravid U. 1985. The essential oil and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Annals of Botany*. 55:793-801.

Werker E., Ravid U., Putievsky E. 1985. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany*. 34:31-45.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535.

- Wilson I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10):3741-3751.
- Wolf H. T., Zündorf I., Winckler T., Bauer R., Dingermann T. 1999. Characterization of *Echinacea* species and detection of possible adulteration by RAPD analysis. *Planta Medica*. 65: 773-774.
- World Health Organization. The International Pharmacopoeia (4<sup>th</sup> Ed.) 2006. WHO Press, Geneva. Switzerland.
- Yadava R. N. e Khare M. K. 1995. A triterpenoid from *Majorana hortensis*. *Fitoterapia*. 66(2):185.
- Yanishlieva N. V., Marinova E. M., Gordon M. H., Raneva V. G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64:59-66.
- Yaniv Z., Dafni A., Friedman J., Palevitch D. 1987. Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*. 19:145–151.
- Yia T., Millerb A. J., Wena J. 2004. Phylogenetic and biogeographic diversification of *Rhus* (Anacardiaceae) in the Northern Hemisphere. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33:861-879.

## **Bibliografia**

## **Ringraziamenti**

Ringrazio il Prof. Alberto Bianchi per avermi dato l'opportunità di fare questa esperienza appassionante e soprattutto per la fiducia ed il supporto che mi ha dimostrato in questi tre anni di dottorato.

Ringrazio ANNA e RENATO, i miei RELATORI, per la guida, i consigli, le conoscenze e l'immenso aiuto in questi anni di lavoro.

Ringrazio tutti coloro che hanno collaborato attivamente al progetto:

il Prof. Gianni Sacchetti e la Dott.ssa Immacolata Maresca del Dipartimento di Biologia ed Evoluzione dell'Università di Ferrara;

il Prof. Ferruccio Poli del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale dell'Università di Bologna;

il Dott. Sauro Biffi, direttore del 'Giardino delle Erbe' di Casola Valsenio.

Corrado Zanni e Maria Luigia Borghi del Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale dell'Università di Parma

Ed infine tutti gli amici della sezione Botanica che per me sono stati una vera famiglia e questo non ha prezzo, Tom, Deborah, Enrico, Ada, Anna (MC), Anna (L), Manu, Rossano e Michele.

GRAZIE.