





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2010-V



## FRONTIERE DELLA TRACCIABILITÀ MOLECOLARE E SICUREZZA DEI PRODOTTI ALIMENTARI

Firenze, 18 marzo 2010



EDIZIONI POLISTAMPA

*Con il contributo di*



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2011  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»  
Anno 2010 - Serie VIII - Vol. 7 (186° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa  
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze  
Tel. 055 737871 (15 linee)  
[info@polistampa.com](mailto:info@polistampa.com) - [www.polistampa.com](http://www.polistampa.com)  
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-0895-0

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

CLAUDIO PERI <i>Strumenti gestionali e indicatori molecolari per la tracciabilità di filiera dei prodotti alimentari</i>	7
VALERIA TERZI, CATERINA MORCIA, GIORGIA CARLETTI, A. MICHELE STANCA <i>Sulle tracce dei geni per qualificare la filiera pasta</i>	13
FEDERICO VITA, VALENTINA LUCAROTTI, EMANUELE ALPI, FRANCESCA FANUCCHI, AMEDEO ALPI <i>Caratterizzazione del tartufo bianco (Tuber magnatum Pico) tramite analisi proteomica del carpoforo</i>	23
ANTONIETTA MELLO, PAOLA BONFANTE <i>Un genoma di nicchia per tracciare il tartufo: dalla rizosfera alla tavola</i>	35
AMALIA BARONE, LUIGI MONTI <i>La genomica per la valorizzazione della filiera del pomodoro</i>	47
M. STELLA GRANDO, RITA VIGNANI, MONICA SCALI, MADDALENA SORDO, ELISA PAOLUCCI, SILVIA LORENZI, JACOPO BIGLIAZZI, FLAVIA M. MOREIRA, RICCARDO VELASCO, MAURO CRESTI <i>Tracciabilità su base molecolare dell'intera filiera vitivinicola</i>	59
LUCIANA BALDONI, ROBERTO MARIOTTI, NICOLÒ G.M. CULTRERA <i>Tracciabilità molecolare degli oli di oliva: dalla ricerca all'applicazione</i>	71

SERGIO LANTERI, EZIO PORTIS, ALBERTO ACQUADRO, CINZIA COMINO,  
GIOVANNI MAUROMICALE, ROSARIO MAURO, SARA LOMBARDO,  
MARIA CADINU, GIAN MARIO MALLICA, LIMBO BAGHINO

*Dal DNA alla tavola: valorizzazione e tracciabilità  
della filiera carciofo*

CLAUDIO PERI\*

## Strumenti gestionali e indicatori molecolari per la tracciabilità di filiera dei prodotti alimentari

### OBIETTIVI DELL'INTERVENTO

Richiamare i concetti fondamentali sulla tracciabilità; individuare le potenzialità e i limiti dell'approccio molecolare; fornire qualche spunto e orientamento alle ricerche di tracciabilità molecolare.

### IL PUNTO DI PARTENZA: LE DOMANDE DEL CONSUMATORE

Le due domande più immediate nel determinare le preferenze e i comportamenti del consumatore sono: “questo prodotto mi piace o no?” e: “il prezzo che ho pagato ha un rapporto accettabile con la qualità che percepisco?”.

A queste due domande di primo impatto, ne possono seguire alcune altre di secondo impatto, con diversa enfasi e diversa partecipazione emotiva, come ad esempio: “quale è l'origine di questo prodotto?” oppure “nella sua produzione sono state applicate tecniche in sintonia con i miei principi?”.

Alla fine c'è sempre una domanda di riserva, che nessuno formula esplicitamente ma tutti presuppongono implicitamente e che diventa la domanda essenziale nel caso che il prodotto si riveli una frode o addirittura sia pericoloso per la salute. Tale domanda è: “nel caso che il prodotto si riveli difettoso o ingannevole o addirittura pericoloso, a chi posso chiederne conto?”.

Questa ultima domanda è quella alla quale la tracciabilità deve poter rispondere e che ha spinto il legislatore a proporre la tracciabilità come requisito

\* *Università degli Studi di Milano*

obbligatorio per tutti i beni di consumo, dai servizi ai prodotti di ogni tipo, alimentari compresi.

La conclusione importante di questo ragionamento è che la tracciabilità non deve essere tanto intesa come tracciabilità dei prodotti e della loro storia, ma piuttosto come tracciabilità delle responsabilità. Ne consegue dunque che la tracciabilità è prima di tutto un problema di gestione.

#### TRACCIABILITÀ DI FILIERA

Se la tracciabilità è un problema di gestione inteso a tutelare il consumatore da frodi e rischi, allora l'unica tracciabilità che ha senso è quella che si applica a tutta la filiera "dal campo alla tavola". Frodi e rischi sono infatti eventualità che si possono verificare in ogni punto e in ogni momento della filiera.

#### I DUE STRUMENTI DI GESTIONE DELLA TRACCIABILITÀ

Dovendo identificare le responsabilità di ogni passaggio della filiera, gli strumenti fondamentali di gestione della tracciabilità sono due: i) il monitoraggio ininterrotto e documentato dei flussi materiali e, ii) la gestione di tali flussi per lotti o *batches*. Un lotto o *batch* è una unità omogenea di prodotto, cioè una porzione di prodotto che ha la stessa storia e la stessa identità.

In ogni momento della storia del prodotto, di ogni lotto iniziale o intermedio o finale dobbiamo conoscere l'identità (che cosa), l'ubicazione (dove), la quantità (quanto).

#### I DUE APPROCCI ALLA DOCUMENTAZIONE DELLA TRACCIABILITÀ

Le due espressioni "stessa storia" e "stessa identità" suggeriscono i due approcci fondamentali alla documentazione della tracciabilità: i) uno strumento contabile e gestionale che descrive la storia dei lotti in tutti i passaggi, dal campo alla tavola, e ii) uno strumento analitico che descrive l'identità del prodotto nei diversi passaggi e nelle diverse trasformazioni dal campo alla tavola.

Dei due approcci il primo è il più importante (approccio guida) poiché se potessimo garantire il completo e perfetto monitoraggio dei flussi materiali, la tracciabilità delle responsabilità sarebbe perfettamente definita. Il secondo approccio invece è di per sé insufficiente (approccio di supporto) poiché nes-



sun certificato di analisi può garantire la rintracciabilità delle responsabilità e metterci al riparo da eventuali frodi o rischi.

Questa osservazione è particolarmente appropriata al caso dei rischi per la sicurezza poiché con le analisi si ricerca la presenza di fattori di rischio conosciuti e probabili, mentre di quelli improbabili, che non sono mai stati segnalati e che sono di fatto i più pericolosi, la ricerca analitica ovviamente (e giustamente) non si occupa. Il caso di specie più clamoroso è quello della mucca pazza, la cui esperienza condusse alla necessità di rendere obbligatoria la tracciabilità documentale delle carni bovine che è il primo caso di tracciabilità di filiera imposto dal legislatore.

#### LE DUE FINALITÀ DELLA TRACCIABILITÀ DI FILIERA

L'applicazione della tracciabilità per ragioni di sicurezza è il primo e più urgente obiettivo della tracciabilità, ma ce n'è un secondo altrettanto importante riguardante l'uso della tracciabilità come strumento di controllo dei processi produttivi e di contrasto delle frodi.

Ci si può domandare infatti quale valore e credibilità possano avere dichiarazioni riguardanti la qualità dei prodotti oppure l'applicazione di particolari tecnologie (ad esempio: l'agricoltura biologica, i metodi di ecosostenibilità, la carbon footprint, le regole del benessere animale, ecc.), oppure la rivendicazione di un'origine o quella dell'uso di una particolare materia prima, ecc., se non si può dimostrare documentalmente la veridicità di tali rivendicazioni. Ancora di più è da domandarsi quale sia l'affidabilità di un controllo di processo nel quale l'applicazione di condizioni operative critiche non sia supportata da una perfetta conoscenza dei bilanci materiali nei punti critici.

La tracciabilità dei flussi materiali è il supporto indispensabile di qualunque sistema di controllo dei processi e dunque di qualunque garanzia del processo e del prodotto.

In questa seconda accezione la tracciabilità di filiera può avere interesse anche con riferimento a un segmento della filiera e come assicurazione dei clienti interessati a tale segmento. Può costituire un vantaggio competitivo rispetto ad altri fornitori concorrenti.

#### LA MOTIVAZIONE ETICA

Accennerò per ultimo a un aspetto meno rilevante per il tema di questa giornata di studio e tuttavia significativo nel determinare la decisione di un'azienda di

adottare una precisa, sistematica e documentata tracciabilità del processo che si svolge sotto la propria responsabilità. È la motivazione etica che gli esperti di sistemi di gestione della qualità descrivono con la “regola della trasparenza”:

“dichiaro ciò che intendo fare  
faccio ciò che ho dichiarato  
documento ciò che ho fatto”

Si tratta in sostanza di dare una prova concreta dell’elemento fondante di ogni garanzia e di ogni fiducia nella relazione fra fornitore e cliente e cioè la credibilità del fornitore, la sua “qualità morale”.

#### I DUE SCOPI DELLA TRACCIABILITÀ MOLECOLARE

In questo contesto penso che la tracciabilità molecolare possa avere due scopi diversi e dunque possa essere trattata con due approcci diversi: il primo è quello della definizione della identità molecolare di un prodotto, funzionale alla rivendicazione di aspetti significativi della qualità nutrizionale o sensoriale e della sicurezza; il secondo è quello della definizione di indicatori molecolari capaci di supportare la tracciabilità documentale con l’inequivocabile caratterizzazione dei lotti.

Vi prego di dare un adeguato rilievo all’aggettivo “inequivocabile”: non ci basta dire che un lotto è “probabilmente” uguale o diverso da un altro lotto, abbiamo bisogno di certezza, altrimenti tutto il riferimento alla responsabilità, che è la ragione della tracciabilità, salta. La responsabilità di una frode o di un danno deve essere certa perché si determinino le condizioni di una sanzione.

Sul primo punto e cioè quello della ricerca di molecole utili o dannose e della caratterizzazione di un “profilo” della qualità utile alla ottimizzazione dei prodotti e dei processi, non dirò nulla perché è un problema che esula dai temi di questa giornata. Dirò invece qualcosa sul secondo punto, che riguarda la tracciabilità molecolare come strumento utile al monitoraggio dei flussi materiali e come supporto alla tracciabilità documentale per la identificazione delle responsabilità.

#### L’APPLICAZIONE PRATICA DELLA TRACCIABILITÀ MOLECOLARE

La tracciabilità molecolare deve essere lo strumento tecnico di supporto allo strumento documentale. In altri termini deve documentare la coerenza e la

veridicità di quanto viene affermato dalla documentazione dei flussi e dei bilanci materiali in modo che la rivendicazione di una identità sia provata con ragionevole coerenza dai dati quantitativi e da quelli qualitativi che li supportano.

La messa a punto di una procedura di tracciabilità comprende pertanto le seguenti fasi:

1. una descrizione del processo produttivo con un *flow-sheet* per lotti. È così raro vedere, nei documenti tecnici, dei *flow-sheet* per lotti che mi domando se chi parla di tracciabilità abbia davvero capito di cosa si tratta. Un *flow-sheet* per operazioni, che è quello con cui vengono generalmente descritti i processi, consente di effettuare analisi che riguardano la qualità o la sicurezza dei prodotti, ma non la tracciabilità.
2. Un'analisi di tali *flow sheet* per lotti per individuare i punti critici per la tracciabilità, cioè i punti nei quali si può avere una perdita di identità del prodotto:
  - o per ragioni tecniche (miscelazioni, trasformazioni...);
  - o per errore involontario;
  - o per frode.
3. Una valutazione del rischio di perdita della tracciabilità e, di conseguenza:
4. La messa a punto di misure preventive consistenti nella combinazione di registrazioni di dati e nel loro rafforzamento o nella loro certificazione con un adeguato supporto analitico.

Il supporto analitico deve essere appropriato alla esigenza della certificazione di identità e cioè: i) inequivocabile, ii) relativamente semplice e poco costoso per poter essere applicato come strumento routinario nel controllo del processo, iii) a prova di frode.

Inoltre, e questa indicazione è fondamentale per coloro che svolgono ricerche in questo ambito, l'approccio della ricerca in questo campo deve essere basato sul criterio della falsificazione secondo l'epistemologia di Popper. Non hanno interesse i metodi che mettono in evidenza differenze fra prodotti a rischio di identità, ma i metodi che mettono in evidenza differenze non falsificabili. Per questo l'atteggiamento dei ricercatori non dovrebbe essere di cercare le differenze, che è un compito che tutti possono svolgere con poca fatica e nessuna utilità, ma quello di cercare di realizzare imitazioni fraudolente capaci di sfuggire alla identificazione con i metodi analitici noti. Stimolando così la messa a punto di metodi analitici nuovi, capaci di resistere alla falsificazione delle prove.

È un approccio in negativo, fatto nell'ottica dei frodatori, per confermare o per confutare i metodi applicati da coloro che li perseguono. E non è detto affatto che da questo approccio emergano come più adatti metodi sofisticati o complessi. Certe volte la combinazione di due o tre dati analitici assolutamente routinari e facili da verificare si rivela uno strumento assai più solido e sicuro di caratterizzazione dell'identità di un prodotto rispetto a un metodo molto sofisticato. Si deve chiedere al ricercatore di non lasciarsi entusiasmare dalla bellezza o dalle potenzialità del metodo, ma di tenersi solidamente ancorato a un criterio di utilità e di applicabilità nelle situazioni concrete.

La procedura che ho brevemente descritto può diventare una linea guida per la valutazione della qualità della ricerca che viene fatta in questo settore.

Possiamo ridurre la valutazione di una ricerca in questo settore a due domande:

1. (conoscenza del problema) Il ricercatore ha analizzato il processo per identificare i punti a rischio di perdita della tracciabilità? Ha stabilito una graduatoria in base alla probabilità di tale perdita? È in grado di descrivere le cause probabili (dunque più frequenti) della perdita di identità? E, in secondo luogo:
2. (conoscenza del metodo) Il ricercatore ha cercato di mettere a punto il sistema analitico più appropriato per certificare la identità del prodotto in ciascuno dei punti a rischio? Ha pensato il metodo come supporto alla tracciabilità documentale? Ha considerato la possibilità che in diversi punti della filiera sia opportuno adottare metodi diversi? Ha sottoposto tale sistema analitico a prove di falsificazione per valutarne la solidità?

Se la risposta è sì a tutte e due gli interrogativi, la ricerca è molto utile.

Se la risposta è sì a uno solo dei due punti, la ricerca non è immediatamente utile, ma è certamente interessante.

Se la risposta è no a tutti e due gli interrogativi, la ricerca non è né utile né interessante. Forse è interessante in altri contesti, ma non in quello della tracciabilità.

VALERIA TERZI\*, CATERINA MORCIA\*, GIORGIA CARLETTI\*,  
A. MICHELE STANCA\*\*

## Sulle tracce dei geni per qualificare la filiera pasta

La produzione agricola italiana è caratterizzata da una grande diversificazione e una parte consistente di essa è di grande prestigio nazionale e internazionale. Il marchio “made in Italy” e “Italian Food” è oggi indice di garanzia in tutto il mondo, a fronte di un reale problema di forte concorrenza attraverso la contraffazione. È quindi necessario rafforzare la competitività delle produzioni italiane non solo dal punto di vista quantitativo, ma principalmente tenendo conto della qualità e tipicità dei prodotti. La cultura dei sistemi di qualità e della relativa certificazione si sta conseguentemente diffondendo rapidamente nel mondo agricolo, per offrire le necessarie garanzie agli operatori del settore e ai consumatori, e al tempo stesso salvaguardare il valore di mercato delle produzioni tipiche e di qualità. Sono stati promossi eccellenti esempi del “Made in Italy” tramite soprattutto la creazione di marchi DOP, IGP, DOC e DOCG. Tutto ciò richiede l’applicazione di moderne tecnologie capaci di garantire le produzioni nazionali durante il percorso di filiera, ma anche di produrre nuovi alimenti sempre più rispondenti alle esigenze della moderna società nel rispetto della tipicità territoriale.

La valutazione della qualità e sicurezza di materie prime e alimenti può attualmente avvantaggiarsi di innovativi strumenti d’indagine molecolari che sono in grado, da una parte, di affiancare e rafforzare le metodiche ufficiali, ma soprattutto possono rispondere in modo flessibile alle nuove esigenze di tracciabilità e certificazione di autenticità, intesa come rispondenza di un prodotto a criteri stabiliti in termini di contenuto, origine e processo produttivo (Woolfe and Primrose, 2004). In particolare, con il termine tracciabilità

\* CRA-GPG, Centro di Ricerca per la Genomica, Fiorenzuola d’Arda (PC)

\*\* Facoltà di Agraria, Università di Modena e Reggio Emilia



Fig. 1 Le metodiche di tracciabilità molecolare sono applicabili a diversi step del processo di filiera della produzione di pasta italiana

molecolare vengono indicate metodiche genomiche, proteomiche e metabolomiche capaci di dare indicazioni su diverse caratteristiche di una produzione agraria o di un prodotto agroalimentare, quali sicurezza e qualità, valore nutrizionale, autenticità (Terzi et al., 2008).

Il fingerprinting molecolare è applicabile a tutti i livelli delle filiere di produzione agroalimentari (fig. 1), partendo dalla caratterizzazione della diversità genetica presente in ecotipi, accessioni o cultivar (Siret et al., 2002; Pasqualone et al., 2004; Foroni et al., 2007) fino ad arrivare alla tracciabilità e rintracciabilità delle materie prime e dei prodotti nelle fasi di trasformazione, confezionamento e distribuzione degli agroderivati.

#### SULLE TRACCE DEI GENI PER LO SVILUPPO DI NUOVE VARIETÀ DI FRUMENTI: IL MIGLIORAMENTO GENETICO ASSISTITO DA MARCATORI MOLECOLARI

L'individuazione di marcatori molecolari associati a caratteri d'interesse agronomico e qualitativo ha segnato numerosi successi nell'ambito del miglioramento genetico di piante agrarie, in particolare in riferimento a caratteri,

sostenuti da uno o pochi geni, quali resistenze a patogeni. Questo ha aperto la strada al pyramiding di più geni utili attraverso la Marker Assisted Selection (MAS) che, svincolando la selezione dagli effetti ambientali, ottimizza l'intero processo di selezione (fig. 2). L'immediato futuro punta verso il "breeding by design", che prevede la progettazione del fenotipo finale e la sua realizzazione mirata con un esteso uso di marcatori molecolari e di informazioni genetiche. Problematiche particolari possono trovare risposta nello sviluppo di varietà transgeniche o cisgeniche, che portano geni non altrimenti introducibili attraverso incrocio e selezione. Gran parte dei caratteri oggetto di selezione sono tuttavia caratteri complessi o QTL (Quantitative Trait Loci): la sfida della biologia vegetale è quindi quella di utilizzare gli strumenti delle scienze omiche e della fisiologia per arrivare alla dissezione del QTL in geni singoli, che possano essere quindi facile oggetto di selezione. A questo proposito, l'approccio classicamente sfruttato per identificare i geni responsabili di caratteri quantitativi è quello di mappare tali geni in popolazioni segre-

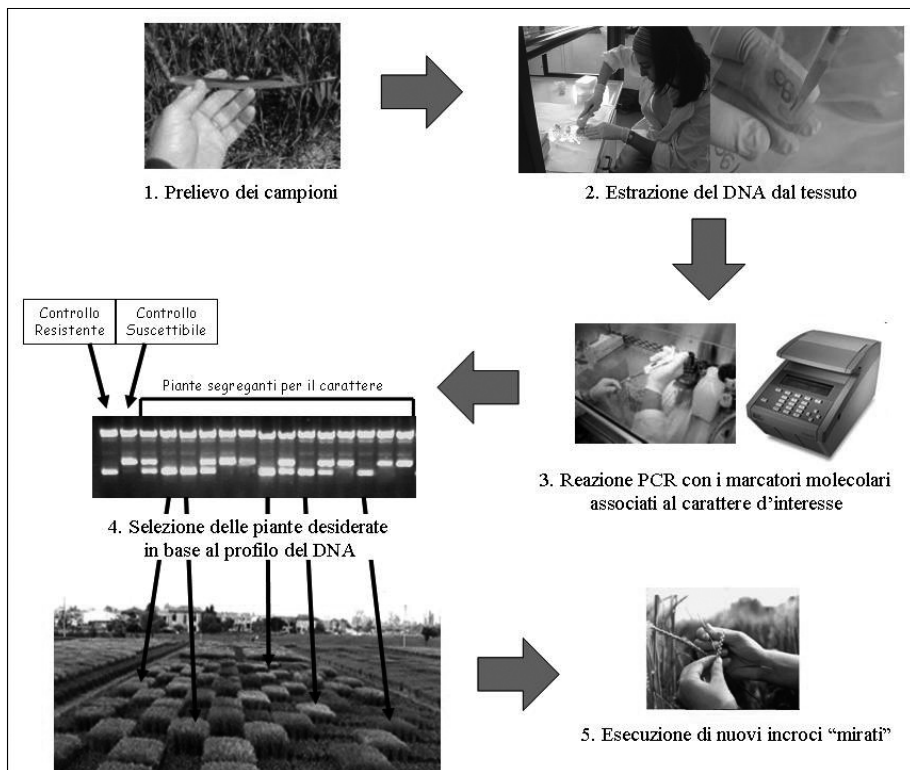


Fig. 2 Schema esemplificativo dell'impiego di MAS (Marker Assisted Selection) per l'ottenimento di nuove varietà di cereali. (per gentile concessione del dr. Enrico Francia)

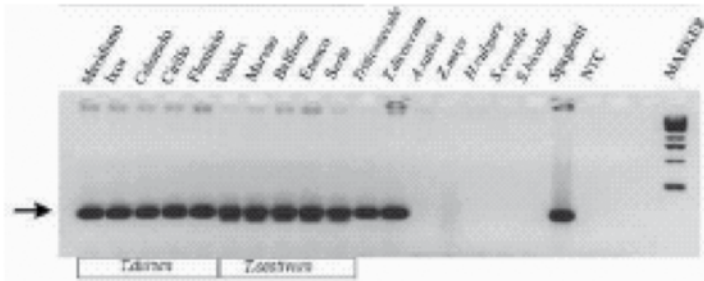
ganti. Un approccio avanzato che inizialmente è stato applicato soprattutto nell'ambito della genetica umana, consiste nella mappatura per associazione, che permette di utilizzare popolazioni naturali, o comunque non derivanti da incrocio controllato. L'analisi per associazione o mappatura basata su *linkage disequilibrium* (LD) è stata recentemente applicata anche a diverse piante agrarie e può rappresentare un progresso sostanziale rispetto agli approcci tradizionali. Questa strategia fornisce una risoluzione del carattere in esame molto maggiore, in quanto consente di analizzare polimorfismi generatisi in diversi background genetici attraverso migliaia di eventi di ricombinazione. La mappatura per associazione può essere condotta con due approcci distinti, uno, "genome-wide", in cui l'intero genoma è sondato per mezzo di marcatori molecolari per identificare regioni associate con un particolare fenotipo, l'altro basato sull'analisi di geni candidati per un determinato carattere. Strategie di questo genere presuppongono la disponibilità di ampie collezioni di germoplasma e rappresentano perciò il punto d'incontro e di complementazione delle attività di conservazione e valorizzazione di risorse genetiche con le strategie del breeding avanzato. L'individuazione inequivocabile di alleli utili presenti in singoli genotipi rappresenta il miglior utilizzo del germoplasma delle diverse specie conservato nelle banche genetiche.

#### TRACCIABILITÀ DI SPECIE E DI GENOTIPO

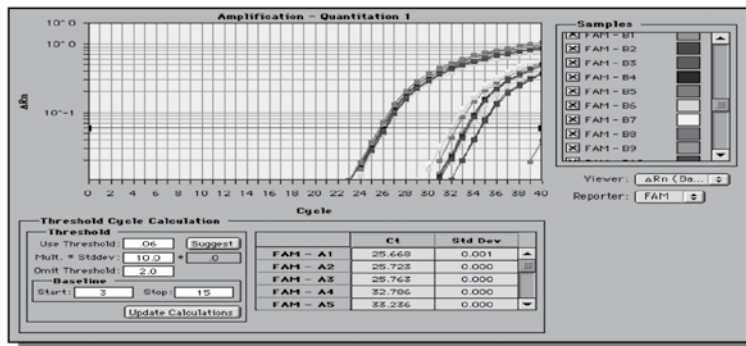
La tracciabilità molecolare può essere applicata alla valutazione della presenza di specie vegetali e animali in materie prime e prodotti finiti (Terzi et al., 2003; Terzi et al. 2004a; Terzi et al. 2008). Questo ha rilevanti applicazioni ai fini della qualità di un alimento e della sua sicurezza d'uso. Importante è infatti considerare che, oltre a prodotti di origine animale quali crostacei, uova, latte e pesci, alcune piante comunemente usate nelle produzioni alimentari quali la soia, la frutta secca a guscio, il sesamo, il sedano e diversi cereali, possono essere responsabili di allergie e intolleranze alimentari. La normativa relativa all'etichettatura dei cibi è perciò promossa a livello nazionale e internazionale per informare sulla composizione dell'alimento, facilitando così la scelta ed evitando alimenti verso i quali il consumatore potrebbe essere sensibile o allergico. È perciò oggi possibile utilizzare tecniche di DNA profiling per verificare la presenza in un prodotto finito di specie vegetali potenzialmente allergeniche, ma anche verificare la composizione di una pasta alimentare sia in termini di specie cerealicole presenti (fig. 3), che in termini di varietà (fig. 4) (Faccioli et al., 1999; Terzi et al., 2003; Terzi et al., 2004b; Terzi et al.,



## Metodo proposto, basato sulla reazione qPCR, per la tracciabilità e quantificazione del DNA di frumento tenero nella filiera pasta



A



B

Fig. 3 La legislazione italiana stabilisce la soglia del 3% come massima contaminazione consentita di frumento tenero in semole destinate alla produzione di pasta. Le classiche tecnologie analitiche basate sull'identificazione di specifiche isoforme di proteine di riserva della cariosside possono essere attualmente affiancate da tecniche di tracciabilità molecolare, capaci di garantire una quantificazione inequivocabile delle due specie di frumenti sui diversi prodotti della filiera pasta. Il sistema analitico indicato in figura sfrutta la presenza di un marcatore del DNA specificamente presente in varietà di frumento tenero e assente in varietà di frumento duro (A). L'identificazione e quantificazione di tale tratto di DNA può dare informazioni sulla eventuale presenza di frumento tenero contaminante in semole e sui livelli percentuali della contaminazione (B)

2007a). Tra le tecnologie attualmente impiegate, la qPCR, che consente non solo l'identificazione, ma anche la quantificazione della sequenza nucleotidica target è quella d'elezione in diverse applicazioni.

L'identificazione di SNP (Single Nucleotide Polymorphism) utili per il fingerprinting, può essere attualmente realizzata con molteplici tecniche, che

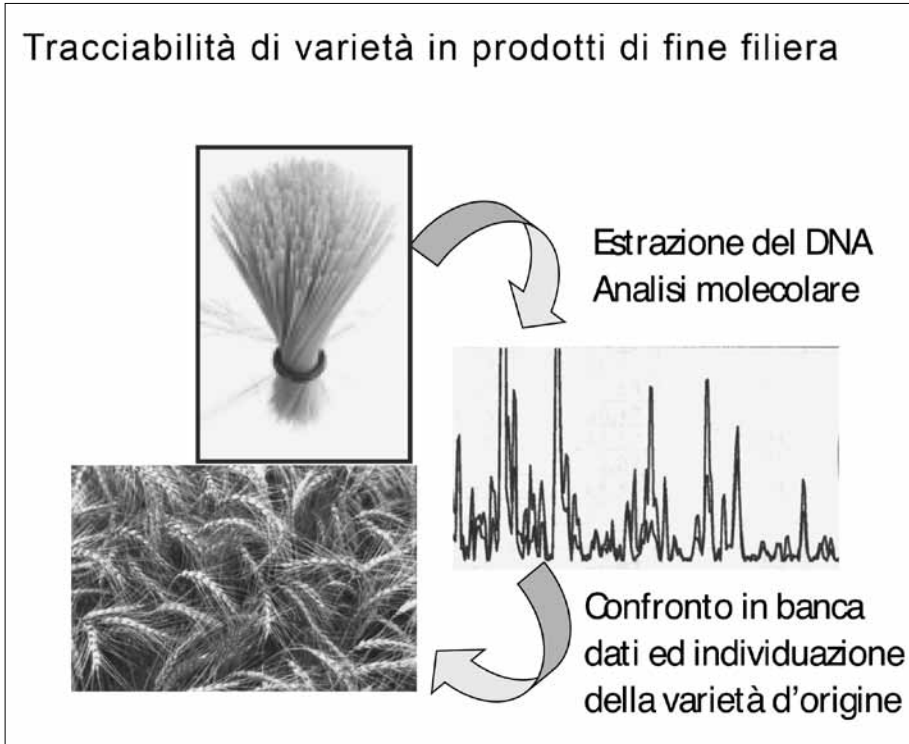


Fig. 4 La tracciabilità molecolare può essere applicata alla certificazione di autenticità di pasta monovarietale (Terzi et al., 2004b)

spaziano dal pyrosequencing all'HRM-PCR (High resolution Melting-PCR), mentre gli approcci tecnologici basati su ibridazione, quali il Lab-on-Chip, i DNA microarray, i biosensori a nano particelle e i chip dotati di vari tipologie di sonde assicurano un'alta produttività. Indispensabili per lo sviluppo di approcci di tracciabilità basati sull'analisi degli acidi nucleici sono infine le banche dati di sequenze nucleotidiche e proteiche pubblicamente disponibili e gli strumenti bioinformatici che ne consentono l'utilizzo.

#### LA SALUBRITÀ DELLE PRODUZIONI CEREALICOLE E LE PROBLEMATICHE DI FUSARIOSI

Grande attenzione è rivolta alla verifica della qualità microbiologica delle produzioni agroalimentari e degli alimenti: tecniche di diagnostica molecolare sono attualmente in forte espansione per la valutazione della presenza di mi-

croorganismi pericolosi per la salute dell'uomo e degli animali ai diversi livelli della filiera di produzione, partendo dai possibili contaminanti in campo e arrivando ai patogeni "food-borne". Una priorità è il miglioramento delle strategie di controllo, monitoraggio e riduzione della presenza di micotossine. Sono, queste, molecole prodotte da funghi filamentosi quali *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Alternaria* (Schollenberger et al., 2005), che possono contaminare vari segmenti della filiera produttiva dell'alimento, portando all'accumulo di tricoteceni, aflatossine, ocratossine, fumonisine, etc. a effetto devastante sulla salute. I problemi connessi alla presenza di micotossine vanno dal fatto che queste molecole sono attive nell'alimento anche quando la muffa che le ha prodotte è stata eliminata, fino al rischio di "carry over", con il loro trasferimento all'uomo attraverso i derivati dell'industria zootecnica (Leung et al., 2006). È chiaro come un'efficace strategia di controllo del problema micotossine deve essere supportata, tra le altre cose, anche da un'intensa at-

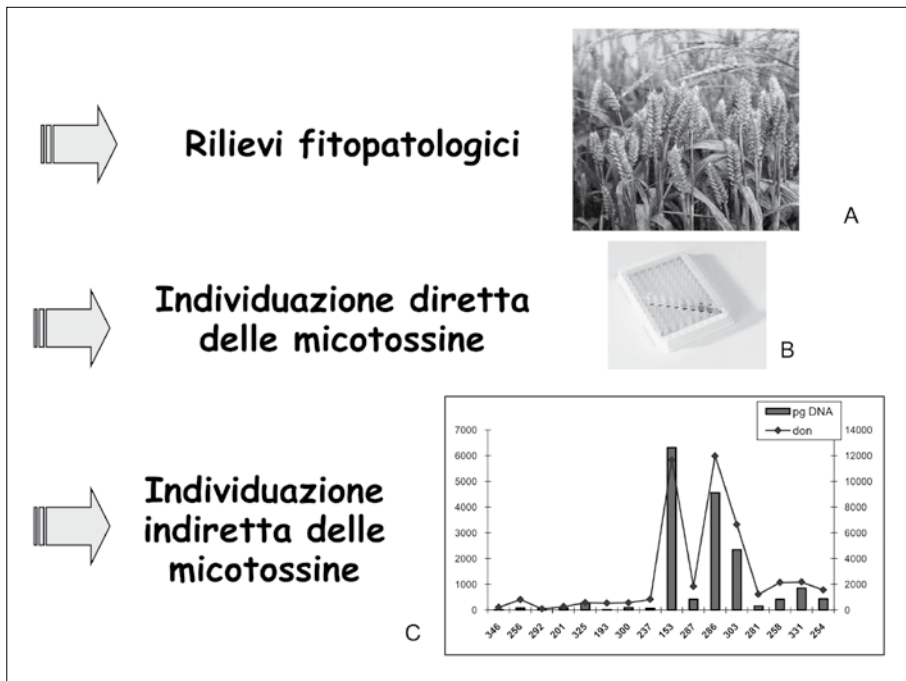


Fig. 5 Strategie dirette (rilievi fitopatologici, caratterizzazione chimica e immunoenzimatica della eventuale presenza di micotossine) e indirette (individuazione, caratterizzazione e quantificazione di DNA fungino) per il monitoraggio di fusariosi in produzioni cerealicole. A=cereali colpiti da fusariosi; B=pietra ELISA per la rilevazione del contenuto in micotossine su base immunoenzimatica; C=grafico che mostra la correlazione, in diversi campioni di frumento, tra il contenuto in deossinivalenolo (don) e la quantità di DNA di *Fusarium* presente

tività di vigilanza che però necessita di sistemi innovativi di identificazione e quantificazione degli agenti contaminanti (fig. 5). In questo senso la tracciabilità molecolare rappresenta una via particolarmente promettente (Terzi et al., 2007b; Rossi et al., 2007).

#### CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In conclusione, le nuove conoscenze della genomica possono trovare interessanti sbocchi applicativi nel settore agroalimentare. Le diverse classi di marcatori molecolari, dispersi nel genoma o a posizione di mappa nota, possono infatti essere utili per individuare e caratterizzare sia le materie prime, che i prodotti di fine filiera. A questo si aggiungono i marcatori funzionali o perfetti che, disegnati direttamente su sequenze geniche codificanti per importanti tratti agronomici o qualitativi, possono avere un'utilità particolare per individuare e tracciare materie prime vegetali, ma anche animali, dotate di combinazioni alleliche particolarmente favorevoli. In particolare, nel settore della diagnostica, la disponibilità di sistemi che consentano non solo di tracciare, ma anche di quantificare la presenza di fitopatogeni, offre nuovi strumenti conoscitivi per il monitoraggio delle produzioni e per lo studio dell'interazione pianta-patogeno. D'altra parte, la realizzazione di un sistema integrato di tracciabilità di specie vegetali, animali e microbiche, potrebbe rispondere alle esigenze di certificazione di autenticità per produzioni di particolare pregio e potrebbe contribuire a innalzare i livelli qualitativi, a tutto vantaggio del consumatore.

#### RINGRAZIAMENTI

Lavoro svolto nell'ambito del progetto MiPAF "Qualitec".

#### RIASSUNTO

La produzione agricola italiana è caratterizzata da una grande diversificazione ed una parte consistente di essa è di grande prestigio nazionale ed internazionale, basandosi sulla qualità e tipicità dei prodotti. La "protezione dei marchi" attraverso la tracciabilità rappresenta una importante strategia per gli operatori che lavorano correttamente, così come per il consumatore. La valutazione della qualità e sicurezza di materie prime ed alimenti può attualmente sfruttare la "tracciabilità molecolare", termine con cui vengono indicate me-

todiche genomiche, proteomiche e metabolomiche capaci di dare indicazioni su diverse caratteristiche di una produzione agraria o di un prodotto agroalimentare, quali sicurezza e qualità, origine geografica, valore nutrizionale, autenticità. Si riportano esempi di applicazioni di saggi molecolari per la tracciabilità di caratteristiche qualitative e relative alla sicurezza alimentare nella filiera frumento duro-pasta.

#### ABSTRACT

Tracking genes of high relevance for the quality and safety of pasta chain. Italian agro-food production is characterised by great diversification and by high quality levels. Traceability is therefore an important strategy supporting both producers and consumers. With the term “molecular traceability” several genomic, proteomic and metabolomic strategies are indicated that are able to give information on quality, safety, origin, nutritional values, authenticity of agro-food products. In this paper, some examples of molecular traceability applications along pasta chain production are reported.

#### BIBLIOGRAFIA

- FACCIOLI P., PECCHIONI N., STANCA A.M., TERZI V. (1999): *Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for barley malt fingerprinting*, «Journal of Cereal Science», 29, pp. 257-260.
- FORONI I., RAO R., WOESTE K. AND GALLITELLI M. (2007): *Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento' landrace*, «Journal of Horticultural Science & Biotechnology», 80, pp. 49-53.
- LEUNG M.C., DIAZ-LLANO G. AND SMITH T.K. (2006): *Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies*, «J Agric Food Chem», 54, pp. 9623-35.
- PASQUALONE A., MONTEMURRO C., CAPONIO F. AND BLANCO A. (2004): *Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 52, pp. 1068-1071.
- ROSSI V., TERZI V., MOGGI F., MORCIA C., FACCIOLI P., HAIDUKOWSKI M., PASCALE M. (2007): *Assessment of fusarium infection in wheat heads using a quantitative polymerase chain (qpcr) assay*, «Food Additives And Contaminants», 24 (10), pp. 1121-1130, DOI 10.1080/02652030701551818.
- SCHOLLENBERGER M., MULLER H.M., RUFLE M., SUCHY S., PLANCK S. AND DROCHNER W. (2005): *Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany*, «Int J Food Microbiol», 97, pp. 317-326.
- SIRET R., GIGAUD O., ROSEC J.P. AND THIS P. (2002): *Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 50, pp. 3822-3827.
- TERZI V., MALNATI M., BARBANERA M., STANCA A.M., FACCIOLI P. (2003): *Development of analytical systems based on real time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta*, «Journal of Cereal Science», 38, pp. 87-94.

- TERZI V., INFASCELLI F., TUDISCO R., RUSSO G., STANCA A.M., FACCIOLI P. (2004): *Quantitative detection of Secale cereale by real time PCR amplification*, «Food Science and Technology» (LWT), 37, pp. 239-246.
- TERZI V., MORCIA C., GIOVANARDI D., D'EGIDIO M.G., STANCA A.M., FACCIOLI P. (2004b): *DNA-based analysis for authenticity assessment of monovarietal pasta*, «European Food Research and Technology», 219 (4), pp. 428-431, DOI 10.1007/s00217-004-0965-7.
- TERZI V., MORCIA C., STANCA A.M., KUCERA L., FARES C., CODIANNI P., DI FONZO N., FACCIOLI P. (2007a): *Assessment of genetic diversity in emmer (Triticum dicoccon Schrank) x durum wheat (Triticum durum Desf.) derived lines and their parents using mapped and unmapped molecular markers*, «Genetic Resources and Crop Evolution», 54 (7), pp. 1613-1621. DOI 10.1007/s10722-006-9173-6.
- TERZI V., MORCIA C., FACCIOLI P., FACCINI N., ROSSI V., CIGOLINI M., CORBELLINI M., SCUDELLARI D., DELOGU G. (2007b): *Fusarium DNA traceability along the bread production chain*, «International Journal of Food Science and Technology», doi10.1111/j.1365-2621.2006.01344.x.
- TERZI V., MORCIA C., FACCIOLI P. (2008): *Molecular traceability in the post-genomic era: an application of DNA technology to food science*, in *Food Science and Technology: New Research*, L.V. GRECO, M.N. BRUNO eds., Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 211-241.
- WOOLFE M., PRIMROSE S. (2004): *Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*, «Trends in Biotechnology», 22, pp. 222-226.

FEDERICO VITA\*, VALENTINA LUCAROTTI\*, EMANUELE ALPI\*\*,  
FRANCESCA FANUCCHI\*, AMEDEO ALPI\*

## Caratterizzazione del tartufo bianco (*Tuber magnatum* Pico) tramite analisi proteomica del carpoforo\*\*\*

### INTRODUZIONE

I tartufi sono funghi ascomiceti ipogei appartenenti al genere *Tuber*. Conosciuti anche con il termine di ectomicorrize (Trappe, 1979), sono organismi eterotrofi la cui unità di base è rappresentata dalle ife, necessarie per la formazione di strutture più complesse come il micelio e il corpo fruttifero, detto anche ascocarpo, formatosi come conseguenza dell'attivazione della fase sessuale nel ciclo biologico (Peterson et al., 1994). I funghi del genere *Tuber* (fig. 1) prediligono condizioni climatiche caratterizzate da primavere calde umide, estati secche intervallate da temporali e inverni temperati. Generalmente entrano in simbiosi con piante forestali quali *Quercus*, *Alnus*, *Castanea*, *Populus*, *Salix* tra le angiosperme e *Pinus* e *Abies* tra le gimnosperme (Read, 1995). I *Tuber* più conosciuti e studiati sono: *Tuber magnatum* Pico, detto anche tartufo bianco; *Tuber borchii* Vittadini o *Tuber albidum* Pico, detto anche bianchetto o marzuolo; *Tuber aestivum* Vittadini, detto anche tartufo d'estate o scorzone o tartufo uncinato; *Tuber melanosporum* Vittadini, detto anche tartufo nero di Norcia e Spoleto o tartufo nero pregiato. L'ascocarpo rappresenta la parte edule del fungo ed è caratterizzato da particolari qualità organolettiche, in primo luogo l'aroma, che ne fanno un alimento pregiato e ricercato, nonché molto costoso, con quotazioni che possono arrivare fino ai 4000 €/Kg per le varietà più pregiate (Mello, 2006); tuttavia, come riportato dalle quotazioni della borsa del tartufo di Alba ([www.albatartufi.com](http://www.albatartufi.com)), i

\* Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università degli Studi di Pisa

\*\* DiBiT2-hSR, San Raffaele Scientific Institute, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Unità di Spettrometria di Massa Biomolecolare, Milano

\*\*\* Progetto finanziato dalla Provincia di Pisa

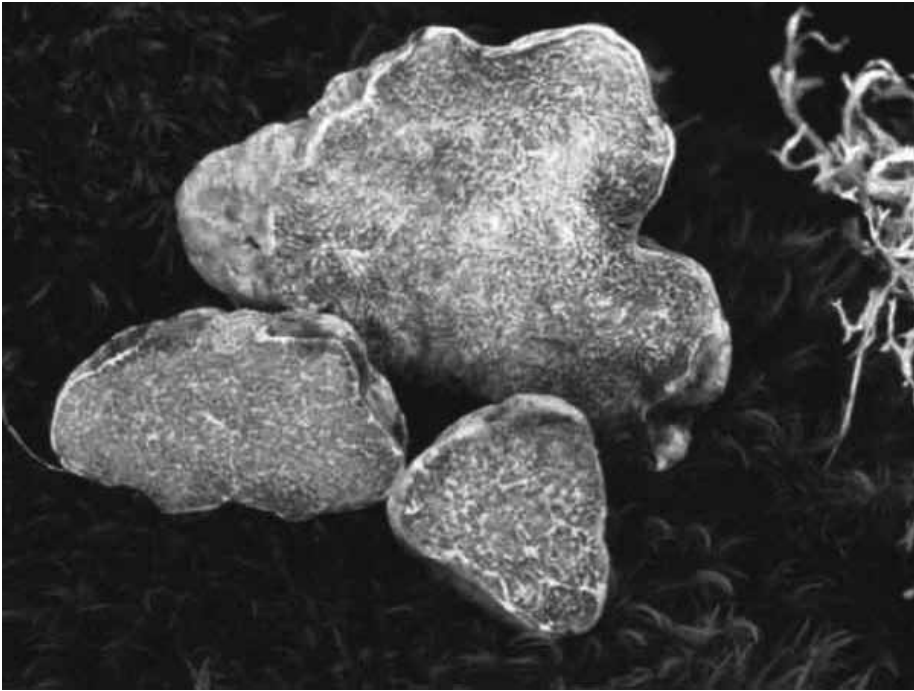


Fig. 1 *Carpoforo di Tuber magnatum Pico*

prezzi aggiornati al dicembre 2008 si attestavano sui 2500 €/Kg. Nel corso della stagione il prezzo e la qualità dei tartufi sono soggetti a periodiche fluttuazioni di mercato, legate alla qualità e disponibilità del prodotto, variabile e poco costante nel tempo. Particolarmente importanti dal punto di vista economico risultano essere le varietà di *Tuber magnatum* Pico che produce corpi fruttiferi bianchi; è il più pregiato ed è spesso richiesto in quantità superiori a quelle raccolte negli habitat naturali, in grado di svilupparsi in una ristretta gamma di condizioni chimico-fisiche del suolo, prediligendo determinati pedoambienti.

Sul territorio italiano è presente, in particolare, in alcune aree caratterizzate da un'importante vocazione produttiva, come le località di San Miniato (e limitrofe) in Toscana, Alba e Asti in Piemonte e di Acqualagna nelle Marche. La produzione del tartufo bianco in Toscana si estende nel fiorentino e nel pisano, principalmente nelle località di San Miniato, di Montaione e del Mugello, caratterizzate dalla presenza di terreni argillosi e ricchi di potassio, sufficientemente aerati, ma non troppo permeabili, ideali per la crescita e lo sviluppo di tale varietà di tartufo.



## LE METODOLOGIE TRADIZIONALI DI CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA

Le metodologie tradizionali di classificazione tassonomica, basate sulla morfologia dell'ascocarpo e sull'analisi microscopica, si dimostrano sempre più spesso inadeguate nel poter dare una identificazione certa riguardo a esemplari della stessa specie, ma sviluppatasi in areali differenti. Al contrario, le metodologie molecolari basate sulla tecnica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) hanno consentito l'identificazione di circa una decina di specie di tartufo, utilizzando test specifici quali l'amplificazione delle regioni ITS (*Internal Transcribed Spacers*), che permettono la diagnosi molecolare in una sola reazione PCR (Bertini, 1998). Con questa tecnica è stato, ad esempio, dimostrato che tartufi classificati come appartenenti a *T. aestivum* e *T. uncinatum* sulla base di dati morfologici, prelevati in otto differenti Stati europei, sono in realtà la stessa specie (Wedden, 2005). Quindi questo tipo di marcatori può essere utilizzato per una possibile certificazione delle varie specie di *Tuber*; ma le stesse metodiche non possono essere impiegate anche per identificare tartufi pregiati in relazione alle aree di crescita e di raccolta, tutelando la tipicità della loro produzione. Quest'ultimo aspetto è fondamentale per la valorizzazione effettiva del prodotto in tutti quei casi in cui esso è di elevato pregio se derivante da un particolare territorio. Purtroppo, mentre il problema dell'appartenenza a una specie può essere considerato in via di soluzione, più difficile appare, al momento, la certificazione dell'area di provenienza per linee appartenenti alla stessa specie. Una metodologia molecolare che può prestarsi alla certificazione degli alimenti è rappresentata dalla proteomica, che permette di caratterizzare specifici profili di proteine presenti esclusivamente nel materiale prodotto in un determinato ambiente. Infatti mentre il corredo genomico risulta sostanzialmente identico in tutti i prodotti appartenenti alla stessa specie, l'espressione genica (e cioè il profilo proteico) risulta fortemente influenzata da molteplici fattori, quali l'ambiente di crescita oppure lo stadio di sviluppo dell'organismo stesso. Il presupposto scientifico è rappresentato dalla produzione di proteine specifiche da parte dell'interazione dell'organismo in questione con l'ambiente inteso in senso lato. Si può aggiungere che, ormai da tempo, la teoria che supponeva come a ogni gene corrispondesse una sola proteina, si è dimostrata erronea. Anche nella specie umana si considera che a ciascun gene corrispondono mediamente quattro proteine (Ast, 2005); in alcune specie vegetali (ad es. *Arabidopsis thaliana*) il numero di proteine ottenibili da alcuni geni può essere anche più elevato. Pur rimanendo aperta la complessa questione del rapporto tra numero di geni e di proteine in un organismo, l'interazione tra un particolare ambiente e il genoma (nella fattispecie il genoma di *Tuber*) può generare proteine specifiche. Que-

ste proteine, una volta individuate, possono rappresentare *marker* specifici del luogo di produzione del tartufo in oggetto e consentirne l'identificazione. La tracciabilità di un prodotto (tradotta in inglese dal termine univoco *traceability*) viene spesso confusa tra due termini molto simili: rintracciabilità e tracciabilità, che facilmente traggono in errore non solo il consumatore, ma anche gli addetti ai lavori. Con il termine rintracciabilità si intende la capacità di seguire un prodotto alimentare, a partire dalle materie prime utilizzate per la sua produzione fino ad arrivare al consumatore finale, mentre con il termine tracciabilità è invece intesa la capacità di risalire all'origine del prodotto, al momento cioè del suo costituirsi iniziale, di conoscerne la storia, la composizione, le caratteristiche e, più in generale, una serie di informazioni che il consumatore vuole conoscere. Conoscere l'origine degli alimenti è un'esigenza sempre più sentita negli ultimi anni, in particolar modo per i prodotti caratterizzati da un elevato valore economico o per i quali il mercato di qualità è una componente rilevante e strettamente correlata con l'origine del prodotto stesso. Negli ultimi anni sono state importate in Europa, a basso costo, varie quantità di *T. indicum* morfologicamente simile al più pregiato *T. melanosporum*, ma con modeste qualità organolettiche e con un valore commerciale 6-10 volte inferiore. Tale immissione ha comportato turbative di mercato e rischi di frodi a carico dei consumatori. Pertanto, oltre all'esigenza di distinguere le specie tra di loro, appare sempre più necessario ottenere parametri che consentano di individuare linee diverse appartenenti alla stessa specie. Considerando l'elevato valore economico del prodotto, risulta perciò necessaria la presenza di una metodologia scientifica capace di distinguere in maniera univoca le varietà di pregio dalle altre.

#### LA PROTEOMICA: UNA NUOVA METODOLOGIA MOLECOLARE PER LA CERTIFICAZIONE DEGLI ALIMENTI

La proteomica – intesa come l'insieme delle tecnologie e degli approcci sviluppati per studiare il proteoma – mira a catalogare tutte le proteine espresse da una cellula in ogni momento del suo ciclo vitale. Il termine PROTEOMA è stato coniato nel 1995 dall'australiano Mark Wilkins per indicare l'insieme completo di PROTEine che è espresso dall'intero genOMA di un organismo. È infatti ormai chiaro che la funzione di un prodotto genico non è deducibile dalla sola sequenza nucleotidica del suo gene. La sfida della biologia post-genomica riguarda la caratterizzazione dell'intero patrimonio proteico di una cellula e la comprensione di come le informazioni genetiche si traducano nell'azione concertata nel tempo e nello spazio dei prodotti genici allo scopo di

generare funzioni biologiche specifiche. Tra le principali tecnologie necessarie per un progetto di proteomica vi sono l'elettroforesi bidimensionale su gel, la spettrometria di massa e la bioinformatica, che contribuisce con software specifici e banche dati all'identificazione delle proteine oggetto delle analisi; la prima di queste tecnologie può essere sostituita da cromatografia liquida ad alta pressione (FPLC), ma la metodologia dovrà subire ancora vari aggiustamenti prima di poter divenire universalmente applicata. L'elettroforesi bidimensionale permette la separazione contemporanea sia delle proteine primarie, sia delle modificazioni successive eventualmente presenti (Pierleoni et al., 2004). Si può quindi studiare come al variare delle condizioni sperimentali, cambi qualitativamente (presenza/assenza) e/o quantitativamente (intensità) l'espressione di gruppi o singole proteine, così come possono essere studiate le modificazioni post-traduzionali che coinvolgono singoli componenti o gruppi di proteine. L'identificazione di bande proteiche dal gel si ottiene mediante costruzione della mappa peptidica di massa utilizzando, ad esempio, la spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) per ottenere informazioni, anche parziali, di sequenza sulle proteine in studio (Shevchenko et al., 1996; Fenyo et al., 1998). In un singolo esperimento si ottengono generalmente una consistente quantità di dati e l'analisi computazionale dei dati ottenuti (bioinformatica) è un passaggio essenziale per l'identificazione delle proteine (Kvasnicka, 2003).

#### SCOPO DEL LAVORO

L'ambiente condiziona l'espressione dei geni presenti in un organismo tramite modifiche della trascrizione e traduzione dei medesimi, determinando perciò la presenza di diverse proteine che, a cascata, modificheranno la quantità e il tipo di prodotti finali. Un approccio di tipo proteomico può aiutare nella certificazione d'origine dei prodotti agro-alimentari, attraverso l'estrazione e la separazione dei loro contenuti proteici (elettroforesi bidimensionali) e la successiva individuazione e caratterizzazione dei *markers* di interesse (analisi MALDI-TOF). Il fine ultimo di tali analisi è quello di sviluppare una metodologia che consenta l'identificazione del materiale per l'accertamento dell'origine territoriale, indispensabile per un prodotto di pregio come il tartufo. È proprio in questa ottica che è stato proposto di condurre una serie di analisi a livello proteomico su diverse accessioni di *Tuber magnatum* con l'obiettivo finale di verificare l'origine del tartufo bianco (*Tuber magnatum* Pico) di San Miniato tramite l'ottenimento di un profilo proteico nel quale

si possa identificare, senza possibilità di equivoci, una o più proteine esclusive della provenienza San Miniato, cioè espresse nelle specifiche condizioni ambientali-geografiche dell'area di San Miniato.

#### MATERIALI E METODI

Le analisi sono state condotte su campioni provenienti da differenti specie di *Tuber*, distinte sia sulla base della zona di origine, in particolare le aree di Toscana e Piemonte dotate di una vocazione produttiva qualitativamente elevata, sia sulla base della specie arborea simbiote (tab. 1). I campioni sono stati accuratamente ripuliti per evitare contaminazioni microbiche, polverizzati in azoto liquido e conservati alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ . È stato necessario mettere a punto una efficace procedura di estrazione delle proteine, che fosse compatibile con le successive analisi di elettroforesi bidimensionale (fig. 2). La procedura di estrazione delle proteine cellulari totali si è articolata come segue: a 100 mg di ogni campione sono stati aggiunti 400  $\mu\text{l}$  di soluzione estraente (Urea 8M, CHAPS 2% w/v, DTT 20mM). Il campione è stato centrifugato a 10.000 Xg, per 10 minuti per poi recuperare il surnatante. Le proteine in soluzione sono state precipitate con acido tricloroacetico (TCA al 13% v/v). Scartato il surnatante, il precipitato proteico è stato risospeso in una soluzione compatibile con la successiva isoelettrofocalizzazione (IEF). L'IEF, realizzata utilizzando strisce di acrilammide con gradiente di pH immobilizzato (pH 4-7, 18 cm), è stata seguita dalla SDS-PAGE effettuata utilizzando un gel di poliaccrilammide al 12,5%. I profili proteici ottenuti, sono stati visualizzati utilizzando un protocollo di colorazione basato su di una soluzione di blu di Coomassie e successivamente analizzati con un programma informatico (PD-QUEST, BIO-RAD) in grado di identificare il punto isoelettrico e il peso molecolare di ogni

TUBER	PROVENIENZA	PIANTA SIMBIOTE
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Capannoli	<i>Populus alba</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Abruzzo	zona boschiva
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Mugello	<i>Tilia</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Crete Senesi	zona boschiva
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Lucca	<i>Populus alba</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	San Miniato	<i>Populus alba</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Montaione	zona boschiva
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Alba	<i>Populus tremula</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Alba	<i>Quercus robur</i>

Tab. 1 *Elenco delle accessioni in analisi*

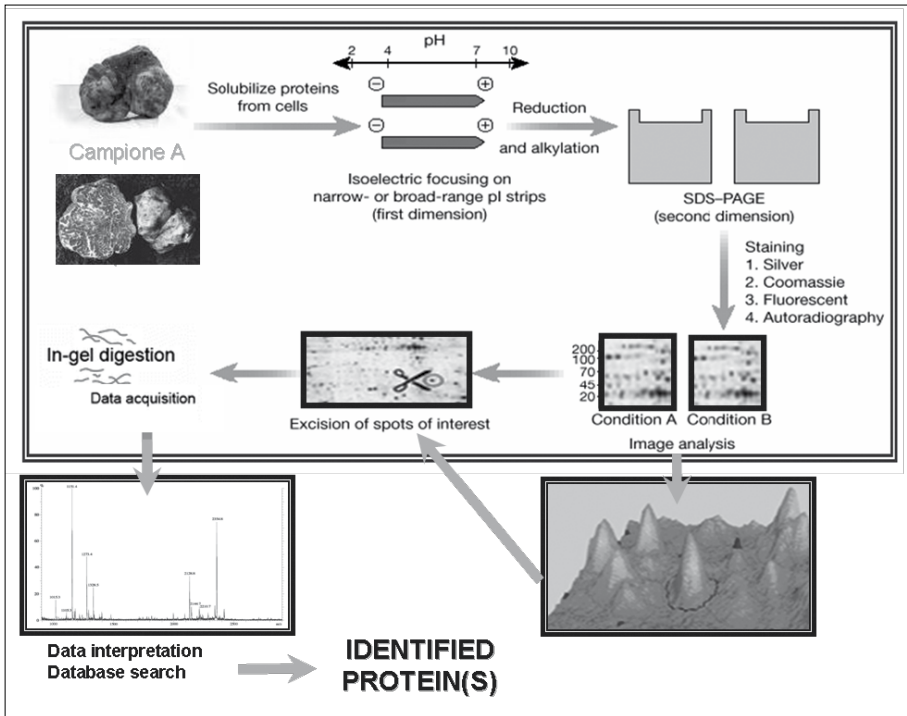


Fig. 2 La procedura sperimentale e le fasi caratteristiche della procedura di analisi. L'estratto proteico ottenuto dal campione di partenza viene separato in base al punto isoelettrico delle singole proteine (IEF) e successivamente in base al peso molecolare, su gel di poliaccrilammide mediante SDS-PAGE. Le proteine vengono visualizzate attraverso diversi tipi di colorazione del gel. Successivamente, le immagini relative a tali gel vengono acquisite e processate utilizzando software specifici. In seguito, le proteine presenti in tali spot vengono identificate mediante analisi di spettrometria di massa e interrogazione di banche-dati dedicate

*spot* (potenziale proteina) rilevato e verificarne la coincidenza o meno, tra i vari campioni in analisi. Quindi è stato possibile confrontare i profili proteici delle diverse accessioni di *Tuber* e individuare le proteine potenzialmente interessanti come marcatori proteici.

#### RISULTATI E PROSPETTIVE

Durante il lavoro finora svolto, è stata messa a punto la metodologia che ha permesso di ottenere i proteomi dei *Tuber magnatum* oggetto di studio (fig. 3). Le proteine sono state separate rispettivamente da sinistra (pH 4) a destra (pH 7) sulla base del punto isoelettrico, e dall'alto in basso sulla base del peso

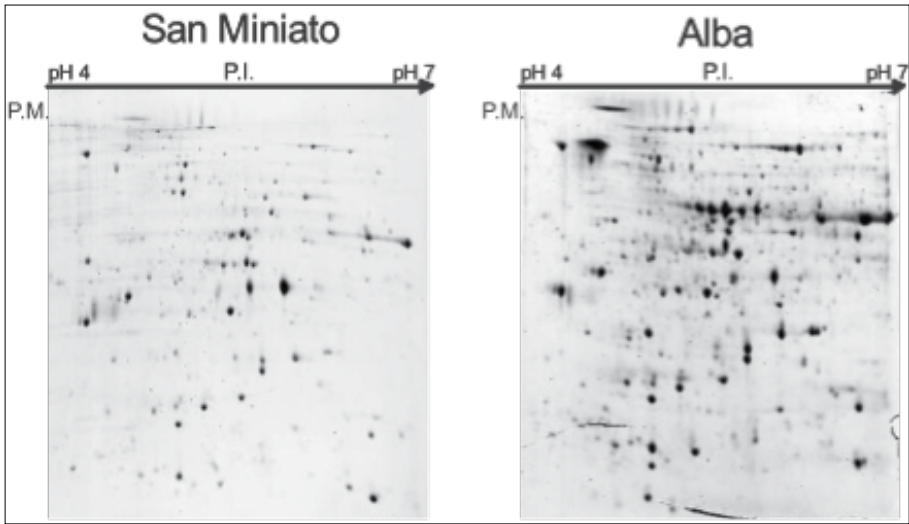


Fig. 3 Profili proteici su gel bidimensionali. Le proteine sono state separate mediante isoelettrofocalizzazione in base al loro punto isoelettrico (P.I.) e, in direzione ortogonale, mediante SDS-PAGE, sulla base del peso molecolare (P.M.)

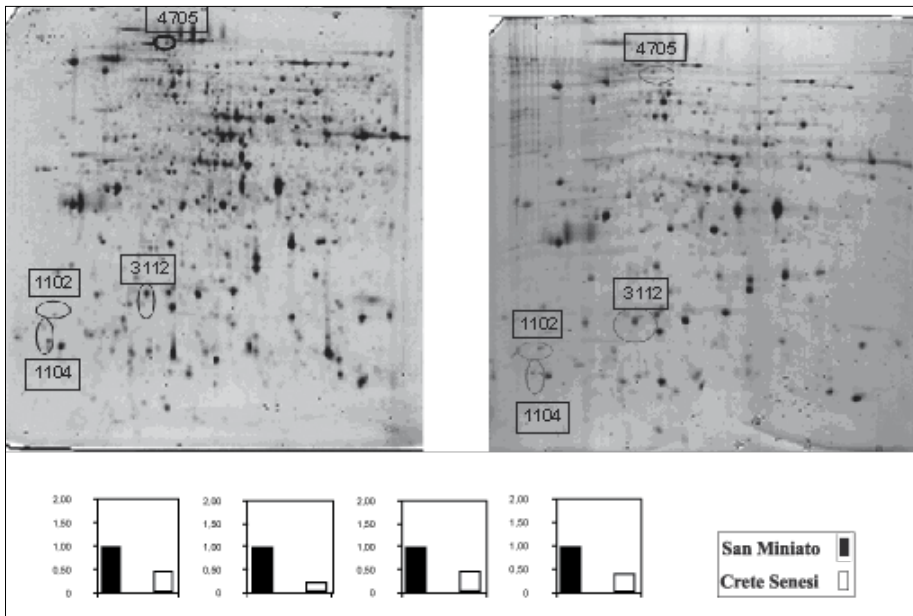


Fig. 4 Analisi bioinformatica relativa al confronto San Miniato (S.M.) - Crete Senesi (C.S.). Le immagini mostrano la presenza di 4 spot (n° 1102, 1104, 3112 e 4705) caratterizzati da una intensità media quantitativamente differente. I grafici sottostanti mostrano il rapporto tra le intensità medie degli spot (F.R. Fold Rapport)

SSP	SAN MINIATO VS ALBA I	SAN MINIATO VS ALBA 2	SAN MINIATO VS CRETE SENESI	SAN MINIATO VS MONTAIONE	SAN MINIATO VS MUGELLO	SAN MINIATO VS LUCCA 2008	ALBA I VS ALBA 2
1102			0,48				
1104	0,16		0,24				
2104						2,07	
3112			0,48				
3113	0,37						
3203					0,48		
4305	0,42						
4407		2,64					2,38
4705			0,42				
5105							2,79
5106		3,27					
5201			0,38				
5208	0,34			0,49			
5212						2,45	
5306						2,47	
6108	0,36					12,48	
6308			2,96	4,01	2,84	4,77	
6421							0,29
7414			2,89			10,53	
7501						2,43	
7613							0,31
8206	0,4						2,05
8210						2,59	
9105				2,3			
9402	0,31	0,4					

Tab. 2 *Analisi differenziale dei profili proteici effettuata su coppie di campioni. Il grafico illustra la presenza di alcuni spot positivi a entrambe le analisi (analisi quantitativa e statistica [t-test]) in almeno un confronto, utilizzando come elemento di riferimento il campione San Miniato (valore=1, in bianco) e il campione Alba 1 (valore=1, in grigio); i valori indicano l'intensità media dello spot, normalizzata sull'intensità totale degli spot presenti ed espressa come O.D. (optical density). I riquadri vuoti indicano l'assenza di tale spot nel confronto in analisi. SSP: single spot number*

molecolare; le analisi hanno mostrato buona risoluzione delle proteine separate in elettroforesi bidimensionale.

Per ciascuna accessione di *Tuber* sono state effettuate almeno tre repliche indipendenti, sei considerando le due annualità analizzate, mentre l'analisi bioinformatica ha dato ottima riproducibilità dei risultati. Il confronto dei profili proteici delle diverse accessioni di *Tuber*, ha evidenziato la presenza di differenze quantitative relative a differenze di intensità media relative ad alcuni spot co-

munque presenti nei campioni in analisi (fig. 4). Per verificare statisticamente tali differenze è stato utilizzato il t-test (test di Student), mentre l'analisi quantitativa ha evidenziato le differenze relative all'intensità media di ciascun spot, misurata in O.D. (optical density). Su di un totale di circa 15000 spot analizzati, 488 sono risultati positivi al t-test mentre 25 sono risultati positivi sia al t-test che all'analisi quantitativa, evidenziando differenze significative nella dimensione degli spot, come mostrato nella tabella 2. I confronti sono stati effettuati tra coppie di campioni. Tali spot evidenziano alcune differenze di tipo quantitativo tra il campione San Miniato e gli altri in analisi; è questo il dato che può essere usato come "marcatore" di provenienza. Le proteine presenti differenzialmente nei vari campioni saranno oggetto della prossima fase di lavoro, che consisterà nella effettiva identificazione mediante spettrometria di massa MALDI-TOF MS/MS (capace di fornire le sequenze amminoacidiche delle proteine analizzate) di tali proteine. Riteniamo il presente lavoro utilizzabile per la caratterizzazione del prodotto su base ambientale, in quanto le analisi indicano come i pattern proteici presentino differenze quantitative caratteristiche, legate all'ambiente di crescita e alla essenza simbiote di provenienza.

#### RIASSUNTO

Il tartufo bianco (*Tuber magnatum* Pico) è il tartufo più apprezzato dai consumatori e quindi quello che spunta i prezzi più elevati sul mercato. Cresce solo in aree delimitate della penisola ed in poche altre zone dell'Europa (ad es.: Slovenia); i prodotti di maggior pregio in Italia sono considerati quelli di Alba (Piemonte), San Miniato (Toscana) e Acqualagna (Marche). La produzione, derivata dalla raccolta da parte di esperti cercatori perché il *T. magnatum* non si presta ad essere coltivato come invece altre specie di *Tuber*, è nettamente inferiore alla richiesta dei consumatori; questo fatto genera due conseguenze: a) elevato prezzo, b) frodi assai frequenti che consistono nel vendere per tartufo bianco di una origine pregiata, quello invece proveniente da altre aree anche esterne all'Italia.

Tra i vari metodi a disposizione per individuare le frodi si annoverano alcune metodologie a base molecolare che, se pur complesse in una prima fase, possono essere standardizzate, semplificate e messe a disposizione per la certificazione della provenienza. Tra di esse particolarmente promettente è la metodologia proteomica che viene dettagliatamente descritta nell'articolo, insieme ai risultati sperimentali ottenuti confrontando tartufi bianchi di Alba, San Miniato e di altre aree della Toscana.

#### ABSTRACT

The white truffle (*Tuber magnatum* Pico) is the most appreciated by the consumers and therefore is the most priced in the market. It grows wildy in some Italian areas and in



other few parts all over the world (e.g. Slovenia); the best quality truffles are those grown in Alba (Piedmont), San Miniato (Tuscany) and Acqualagna (Marches). The amount collected by the expert seekers is usually far below the consumer demand and this causes two problems: a) high prices, b) frequent frauds consisting in selling normal truffles, coming from various areas, in the place of the high quality ones, obtained in the specific zones above mentioned.

To be able to detect such frauds, complex molecular technology have been elaborated; they could be simplified and than used to certify the area of origin. Between those the proteomic approach is promising and is described in this article reporting experimental results concerning comparisons between truffles of San Miniato, Alba and other Tuscan origin.

#### BIBLIOGRAFIA

- AST G. (2005): *The alternative genome*, «Scientific American», 292, pp. 58-65.
- BERTINI L., AGOSTINI D., POTENZA L., ROSSI I., ZEPPA S., ZAMBONELLI A., STOCCHI V. (1998): *Molecular markers for the identification of the ectomycorrhizal fungus Tuber borchii*, «New Phytologist», 139, pp. 565-570.
- ELISEI S., ZAZZI A. (1985): *Caratteri fisico-chimici dei suoli tartufigeni del centro Italia*, in «Annali ISS», 16, pp. 543-555.
- FENYO D., QIN J., CHAIT B.T. (1998): *Protein identification using mass spectrometric information*, «Electrophoresis», 19, pp. 998-1005.
- MELLO A., MURAT C., BONFANTE P. (2006): *Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy*, «FEMS Microbiological Letters», 260, pp. 1-8.
- KVASNICKA F. (2003): *Proteomics: general strategies and application to nutritionally relevant proteins*, «Journal of Chromatography», B 787, pp. 77-89.
- PETERSON R.L., BONFANTE P. (1994): *Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas*, «Plant Soil», 159, pp. 79-88.
- PIERLEONI R., BUFFALINI M., VALLORANI L., GUIDI C., ZEPPA S., SACCONI C., PUCCI P., AMORESANO A., CASBARRA A., STOCCHI V. (2004): *Tuber borchii fruit body: 2-dimensional profile and protein identification*, «Phytochemistry», 65, pp. 813-820.
- READ D.J. (1995): *Ectomycorrhizas in the ecosystem: Structural, functional and community aspects*, in *Biotechnology of Ectomycorrhizae: Molecular Approaches*, a cura di V. Stocchi, P. Bonfante, M. Nuti, Plenum, New York, pp. 1-23.
- SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M. (1996): *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels*, «Analytical Chemistry», 68, pp. 850-858.
- TRAPPE J.M. (1979): *The orders, families and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives)*, «Mycotaxon», 9, pp. 327-340.
- WEDEN C., DANELL E., TIBELL L. (2005): *Species recognition in the truffle genus Tuber– the synonyms Tuber aestivum and Tuber uncinatum*, «Environmental Microbiology», 10, pp. 1535-1546.



ANTONIETTA MELLO\*, PAOLA BONFANTE\*

## Un genoma di nicchia per tracciare il tartufo: dalla rizosfera alla tavola

La rizosfera è quel volume di suolo direttamente e immediatamente a contatto con le radici delle piante: è quindi un ambiente molto dinamico in cui pianta, suolo e microorganismi interagiscono. La rizosfera si forma in seguito al rilascio da parte delle radici di essudati radicali che costituiscono fonte di nutrimento per i microorganismi, principalmente batteri e funghi, associati alle radici (Walker et al., 2003). Tra i funghi presenti, un ruolo importante è svolto dai funghi ectomicorrizici che completano il loro ciclo biologico con lo sviluppo di un organo simbiotico (micorriza) e con la formazione di corpi fruttiferi che sono talora di cospicue dimensioni.

Quindi, quando parliamo di tartufo, dobbiamo in primo luogo considerare la rizosfera come il suo ambiente di origine. Lo scopo di questo articolo è di illustrare in quale modo sia oggi possibile monitorare i tartufi e tratteggiare le prospettive che si aprono nel campo della tracciabilità, alla luce della recente pubblicazione del genoma del tartufo nero (Martin et al., 2010).

DALL'IDENTIFICAZIONE DELLA SPECIE ALLA TRACCIABILITÀ  
DEL *TUBER MAGNATUM* E DEL *TUBER MELANOSPORUM*

I tartufi sono Ascomiceti che vivono in simbiosi con le radici di piante forestali e con arbusti del genere *Cistus* (Smith e Read, 1997). Alcune specie sono molto apprezzate a causa del loro gusto e aroma sin dagli antichi Greci e Romani (Mello et al., 2006). L'ultima revisione delle specie europee del ge-

\* Istituto per la Protezione delle Piante – CNR e Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Torino

nere *Tuber* a cui appartengono i tartufi parte dalla straordinaria collezione di interesse museale, l'erbario di Oreste Mattiolo, che è situato nel Dipartimento di Biologia vegetale dell'Università di Torino (Ceruti et al., 2003). Dalla revisione storica di circa 200 specie gli Autori ne hanno considerate valide 28. La difficoltà nell'identificazione delle specie che nei corpi fruttiferi si basa sulla forma e dimensione delle spore, sull'ornamentazione della loro parete e sulla struttura del peridio e della gleba, è ancora maggiore per le micorrize.

Il problema della corretta identificazione delle specie di *Tuber* non è solo di interesse accademico. Alla fine degli anni 90/inizio 2000, soprattutto in Italia e in Francia, prevalse l'uso di inoculare piante forestali per ottenere micorrize di *Tuber magnatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum* e *T. borchii*, e quindi per incrementare la produzione dei corpi fruttiferi (Bencivenga, 2005). Di qui nacque l'esigenza da parte di tartufai, agenzie locali e acquirenti di piantine micorrizzate, di una corretta identificazione delle specie di tartufo da impiegare come inoculo e delle micorrize che si formavano. Erano anche gli anni in cui, sull'onda dell'invenzione della PCR (Mullis, 1998), in molti laboratori, tra cui il nostro, si sviluppavano analisi di biologia molecolare da affiancare a studi tradizionali. L'acquisizione di nuove tecnologie ci ha pertanto permesso di mettere a punto dei protocolli di diagnostica e monitoraggio per rispondere a diverse problematiche.

Dato che i geni del DNA ribosomale presentano regioni con storie evolutive diverse, vale a dire regioni più conservate, e quindi confrontabili tra famiglie o generi di organismi, e regioni più variabili e quindi confrontabili tra specie, essi sono stati scelti come target molecolari prioritari.

### *Il tartufo bianco: dai suoi fratelli bianchetti all'identificazione nel suolo*

Il primo problema affrontato è stato quello dell'identificazione di specie molto simili. Data la somiglianza del *T. magnatum*, il tartufo bianco più pregiato, il cui areale di distribuzione è limitato all'Italia, Croazia, Slovenia e Ungheria, con altri tartufi bianchi detti bianchetti, abbiamo sviluppato dei primer specifici in grado di distinguere questo fungo da tutti gli altri, anche a livello di micorriza (Mello et al., 1999). Tuttavia recenti ricostruzioni filogenetiche hanno svelato che i bianchetti, anche se simili a *T. magnatum* non sono così vicini (Jeandroz et al., 2008).

Grazie proprio all'identificazione delle strutture simbiotiche attraverso l'analisi molecolare, abbiamo potuto stabilire a ritroso le loro caratteristiche morfologiche e darne l'identikit (Mello et al., 2001). Una volta resa possibile

l'identificazione del *T. magnatum*, abbiamo certificato, in molte occasioni, piantine micorrizzate per conto di agenzie private. Su un totale di 80 campioni costituiti da 1400 apici micorrizzati sono state trovate micorrize di *T. magnatum* soltanto nel 20% dei casi, ma solo in situazioni controllate quali celle climatiche e serre. L'assenza di micorrize di *T. magnatum* nei vivai, insieme al frequente ritrovamento di bianchetti quali il *T. maculatum* e il *T. borchii*, suggerivano una scarsa competizione del *T. magnatum* in queste condizioni (Mello et al., 2001).

Tuttavia, la consapevolezza che la micorrizzazione del tartufo bianco non stava dando risultati simili a quelli ottenuti con il tartufo nero, e che *T. magnatum* non cresce *in vitro*, e quindi non può essere studiato in laboratorio, ci spinse a lavorare direttamente nella tartufaia: è questo l'habitat che meglio permette di comprendere lo stile di vita di *T. magnatum* e di rintracciarlo fin nella sua fase vegetativa.

Con questo fine, negli ultimi dieci anni, abbiamo seguito la dinamica di una popolazione di *T. magnatum* sita in Montemagno, provincia d'Asti dove abbiamo dapprima raccolto i corpi fruttiferi per 6 annate successive e tracciato una mappa con tutte le indicazioni relative alle piante ospiti e ai siti di raccolta dei tartufi. Durante questo studio sono emerse delle zone non produttive nella tartufaia, indipendentemente dall'età e dalle specie di piante. Grazie poi al ritrovamento di polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP) in una regione SCAR (sequence characterized amplified region), abbiamo identificato 2 genotipi, sin dal primo anno di raccolta, e tracciato sulla mappa la struttura spaziale e temporale di questo fungo (Mello et al., 2004). In secondo luogo, abbiamo rintracciato le micorrize di *T. magnatum* direttamente in campo, per cui, nella stessa tartufaia, sono state campionate ectomicorrize che sono state identificate sia attraverso l'approccio morfologico che con quello molecolare. Le micorrize di *T. magnatum* sono risultate essere molto rare (circa il 5% del campionamento) se confrontate con la produzione di tartufo: questo punto ci fa riflettere sul fatto se la fase simbiotica sia poi così importante per lo sviluppo del tartufo. Tuttavia, è stato possibile osservare tra le poche micorrize di *T. magnatum* ritrovate, che queste erano presenti anche in un'area non produttiva, suggerendo quindi che non ci sia un legame diretto tra micorrize e corpo fruttifero (Murat et al., 2005).

Ma *T. magnatum* è un fungo ectomicorrizico: per una corretta analisi delle sue dinamiche di popolazione, esso deve essere rintracciato anche nella fase vegetativa. Diventano inoltre interessanti le relazioni con i microrganismi che caratterizzano il suolo della tartufaia. In questo contesto ci siamo proposti, da una parte di rintracciare il micelio del tartufo bianco nel suolo

per monitorare la sua distribuzione nella tartufaia, in un qualunque periodo dell'anno, e dall'altra, di caratterizzare la biodiversità microbiologica del suolo nelle 2 zone a differente capacità produttiva. Nell'ottica delle micorrize come interazioni tripartite (Bonfante e Anca, 2009), si ipotizza che le comunità microbiche indigene abbiano un impatto sullo sviluppo della micorrizzazione e sulla produzione dei corpi fruttiferi (Frey-Klett e Garbaye 2005; Frey-Klett et al. 2007).

Per affrontare questo progetto che rientra nell'ambito della *metagenomica*, l'attuale campo di interesse della ricerca internazionale (Venter et al., 2004; Vogel et al., 2009; Warnecke et al., 2007), per cui il DNA totale che rappresenta l'intera comunità dei microorganismi può essere trattato come un genoma singolo, abbiamo analizzato il DNA direttamente estratto da una matrice complessa, il suolo della tartufaia. Questo approccio permette un monitoraggio anche dei microorganismi che non crescono *in vitro* e che sfuggono all'identificazione con l'utilizzo delle tecniche tradizionali della microbiologia, ossia le colture *in vitro*.

Con un approccio di nested PCR di un frammento del gene per la beta-tubulina, abbiamo rintracciato la fase vegetativa in campionamenti di suolo effettuati nella stessa tartufaia (Zampieri et al., 2010). In particolare quasi tutti i campioni invernali sono risultati positivi al *T. magnatum*, a differenza del 30% di quelli primaverili, e questo è in linea col ciclo biologico del *T. magnatum* che, fruttificando appunto d'inverno, disperde le spore nel suolo. Inoltre è emerso che la distribuzione della fase miceliare è molto più ampia, rispetto alla mappa dei corpi fruttiferi raccolti, infatti *T. magnatum* era anche presente nella zona non produttiva, suggerendo quindi che non ci sia relazione diretta tra la presenza del micelio e quella del corpo fruttifero. Infine, un dato inaspettato rivela che nel suolo è presente una variabilità genetica maggiore di quella riscontrata nei corpi fruttiferi.

Per caratterizzare la biodiversità microbiologica (funghi e batteri) del suolo, abbiamo confrontato i profili DGGE dei microorganismi presenti nelle aree produttive con quelli trovati nelle aree non produttive (Mello et al., 2010). Fra le comunità fungine *Mortierella* e *Fusarium oxysporum* sembravano essere maggiormente associati ai siti produttivi della tartufaia. Mentre tra le popolazioni microbiche, che risultavano dall'analisi di immagine distinte in due gruppi corrispondenti, in linea generale, alle due tipologie-aree produttive e non-, *Moraxella osloensis* appariva essere associata con i siti produttivi. Questo è in accordo col fatto che ceppi delle moraxellaceae sono presenti nei corpi fruttiferi da cui sono stati isolati in passato (Citterio et al., 1995).

Quindi, da un'indagine di questo tipo emerge che oggi sono disponibili tutti gli strumenti per la tracciabilità della filiera del *T. magnatum* che garantisce tanto il consumatore quanto il tartuficoltore. In altre parole, fino a oggi l'unica indicazione disponibile per chi voleva allestire una tartufaia sperimentale era l'analisi chimico-fisica del suolo. Oggi è possibile affiancare a questa una vera carta d'identità, in grado di rilevare l'eventuale presenza del micelio di *T. magnatum* nel suolo, e quindi è possibile stabilire non solo se un terreno è vocato alla tartuficoltura, ma anche rilevarne la persistenza in tartufaie di impianto.

### *Il tartufo nero: un tartufo con minor pretese*

Parallelamente alla tracciabilità del pregiato bianco *T. magnatum*, è stato possibile anche tracciare il tartufo pregiato nero, *T. melanosporum*, che si trova naturalmente in Italia, Francia e Spagna ma viene anche ottenuto in tartufaie sperimentali in altri paesi quali Israele, Stati Uniti e Nuova Zelanda (Hall et al., 2003). Da un punto di vista ecologico la presenza di questo fungo nel suolo è associata, a differenza del *T. magnatum*, alla formazione del pianello (meglio noto con la parola francese *brulé*), una zona intorno alla pianta ospite caratterizzata da assenza o scarsità di vegetazione ed entro cui si raccolgono generalmente i tartufi. Ipotesi sulla formazione del pianello hanno suggerito un effetto fitotossico mediato da metaboliti del tartufo (Pacioni, 1991; Lanza et al., 2004; Splivallo et al., 2007), tuttavia sia i meccanismi con cui avviene che il ruolo ecologico del *T. melanosporum* sono del tutto sconosciuti. In uno studio condotto sul suolo di tartufaie francesi buone produttrici di tartufo abbiamo dimostrato, sia con la recente tecnica di sequenziamento (454 Pi-rosequenziamento a opera della BMR Genomics s.r.l. di Padova) che con il clonaggio molecolare e la DGGE, che il *T. melanosporum* è il fungo dominante in questo ambiente in cui diminuiscono in percentuale gli altri funghi ectomicorrizici, suggerendo quindi un effetto competitivo del *Tuber* e un ruolo importante nella formazione del pianello (Napoli et al., 2010). In tartufaie di impianto non produttive e con pianelli non ancora evidenti abbiamo messo a punto un protocollo per controllare se il *T. melanosporum* sia presente sulle radici della pianta introdotta, se si è diffuso nel suolo e se abbia colonizzato le radici di piante ospiti preesistenti. L'utilizzo di primer specifici sviluppati da Suz et al. (2008) sui morfotipi identificati come micorrize di *T. melanosporum* ha dimostrato che questa specie, a differenza del bianco, colonizza quasi completamente le radici della pianta ospite, confermando quindi la forte competitività rivelata nei suoli precedenti in cui si produce tartufo. In questi casi tutti

i campioni di suolo che vengono saggiati risultano positivi al *T. melanosporum*. Durante questo percorso, su un suolo inoculato con *T. melanosporum* è stato trovato incidentalmente *T. indicum*, una specie cinese molto simile dal punto di vista morfologico ma non altrettanto pregiata, del cui arrivo sui mercati Europei ci sono già svariate segnalazioni (Murat et al., 2008). In seguito a questo rinvenimento stiamo attualmente monitorando tartufoie piemontesi, su richiesta della Regione, per valutare quanto questa presenza sia estesa e se influenzi in qualche misura la produttività del tartufo pregiato.

#### UNA FINESTRA SUL GENOMA DEL TARTUFO NERO PREGIATO

Un altro ambito di ricerca che apre nuove prospettive, che vanno dalla conoscenza di base del complesso e affascinante processo della simbiosi a informazioni di carattere applicativo, è quello dei sequenziamenti dei genomi. Negli ultimi anni l'avanzamento delle tecniche di sequenziamento e assemblaggio delle sequenze, parallelamente a una diminuzione dei costi ha portato al sequenziamento di un gran numero di genomi fungini (vedi il sito per l'aggiornamento, [http://fungalgenomes.org/wiki/Fungal\\_Genome\\_Links](http://fungalgenomes.org/wiki/Fungal_Genome_Links)). Il primo fungo simbiote di cui è stato sequenziato il genoma è *Laccaria bicolor* (Martin et al., 2008). Nonostante questo fungo sia importante dal punto di vista forestale, esso non è commestibile. Sull'onda della disponibilità del genoma di un fungo simbiote è stato scelto di sequenziare il genoma di un altro simbiote che, a differenza del primo, fosse anche commestibile e rivestisse un'importanza agro-alimentare e culturale. Da tale idea nasce a Torino nell'aprile del 2007 il progetto del sequenziamento del genoma di *T. melanosporum* che, coordinato in Francia da Francis Martin, direttore del laboratorio di 'Ecogenomics of Interactions' dell'INRA di Nancy, e in Italia dai gruppi CNR-Università di Torino e Università di Parma, è stato condotto da Génoscope, il centro di ricerca francese dedicato ai sequenziamenti genomici. Analizzato e interpretato grazie a un consorzio di 50 ricercatori con una dimensione pari a 125 milioni di coppie di basi, il genoma del tartufo nero è il più grande tra quelli dei funghi fino a oggi sequenziati (Martin et al., 2010). Sequenze ripetute riconducibili a elementi genetici mobili ("trasposoni"), che rappresentano il 58% dell'intero genoma, sono responsabili di questa massiccia quantità di DNA che, insieme a un ridotto numero di geni e di famiglie geniche fanno del *T. melanosporum* un fungo particolare. Circa 6000 geni trovano corrispondenza con quelli di altri funghi, tuttavia, diverse centinaia di geni sono unici del tartufo e possono svolgere un ruolo



fondamentale nel controllo della formazione del corpo fruttifero (il tartufo) e nello sviluppo della relazione simbiotica che si stabilisce con la pianta ospite. Confrontato con il genoma di *Laccaria bicolor*, il genoma di *T. melanosporum* suggerisce quindi che la simbiosi micorrizica abbia seguito strade diverse nel corso dell'evoluzione. Parallelamente a queste informazioni, il genoma di *T. melanosporum* custodisce i geni del mating type che svelano, senza più ombra di dubbio, che questo fungo è eterotallico, in accordo con quanto suggerito da Riccioni et al. (2008). Sulla base di questa scoperta sarà presto possibile selezionare individui di segno opposto per garantire la compatibilità sessuale e il successo riproduttivo in programmi di tartuficoltura che si potranno svolgere finalmente su base scientifica. Questa scelta di bilanciamento degli individui si tradurrà in una maggiore produttività del tartufo nero nelle tartufaie di impianto in cui le piante ospiti presentano individui di sesso opposto.

Altre informazioni di carattere applicativo che emergono sono migliaia di marcatori genetici sparsi lungo tutto il genoma che potranno essere impiegati per evidenziare polimorfismi genetici nei tartufi provenienti da diverse aree e quindi per tracciare i tartufi sulla base della loro provenienza. L'analisi del genoma ha anche evidenziato il ridottissimo potenziale allergenico del tartufo, che viene pertanto riconosciuto come *safe*, in quanto in esso mancano i geni codificanti enzimi chiave nella biosintesi delle temibili micotossine. Inoltre sono stati individuati i geni responsabili della formazione dei composti volatili che costituiscono l'aroma del tartufo (isoprenoidi, alcoli provenienti dall'Ehrlich pathway e, soprattutto, composti solforati coinvolti nell'assimilazione dello zolfo e nel metabolismo della cisteina/metionina).

L'insieme di queste informazioni permetterà di definire un profilo genotipico-molecolare che coniughi l'origine geografica dei tartufi neri con il loro aroma.

#### DALLA RIZOSFERA ALLA TAVOLA

Il fine ultimo della rintracciabilità si traduce nel controllo della qualità tanto dei tartufi freschi quanto dei prodotti al tartufo che hanno, ormai, un largo consumo. In Italia la commercializzazione del tartufo è possibile per un numero limitato di specie di *Tuber* ed è regolamentata da una apposita legge (N. 752 del 16/12/1985). Gli strumenti molecolari messi a punto negli ultimi 15 anni insieme a una conoscenza approfondita della sistematica dei tartufi, iniziata a Torino a partire dall'erbario di Oreste Mattiolo, permettono oggi di identificare con certezza le specie di tartufo presenti sulla nostra tavola. Anche i tartufi in scatola

possono essere identificati su questa base (Mabru et al., 2004). Per i prodotti al tartufo l'osservazione delle spore e la messa a punto di un metodo che permetta il recupero di DNA amplificabile in PCR costituiscono lo strumento per svelare il segreto contenuto, ad es., nelle varie creme al tartufo. Se oggi è possibile quindi sapere quali specie sono state usate in un prodotto, nulla si sa sulla loro origine. È quindi al genoma che si affidano le prospettive di rintracciare l'origine geografica dei tartufi che sono adoperati in vario modo nell'industria alimentare. Basti pensare che in Italia, il tartufo fresco e lavorato ha un mercato che supera i 300 milioni di euro (<http://www.millionaire.it/content/view/1823/>).

## CONCLUSIONI

Grazie allo sviluppo della biologia molecolare, agli insegnamenti della micologia tradizionale e alla bioinformatica è stato possibile rintracciare i tartufi nelle tre fasi del ciclo biologico, conoscere le relazioni tra questi e altri funghi del suolo fino a stabilire che *T. melanosporum* è il fungo dominante nel pianello, a differenza del *T. magnatum* che si rivela poco competitivo e, per questo, poco adattabile alla diversità degli ambienti. Tuttavia i progressi tecnologici hanno accelerato il sequenziamento del genoma di molti funghi tra cui il *T. melanosporum*. Le potenzialità raccolte in un genoma disponibile sono svariate: dalla conoscenza di base della biologia del fungo a un avanzamento delle tecniche di coltivazione e quindi a un aumento controllato della produttività.

## RINGRAZIAMENTI

Si desidera ringraziare i colleghi dell'IPP-CNR e del Dipartimento di Biologia vegetale che hanno collaborato ai temi qui riassunti, nonché il Consorzio di ricercatori che hanno realizzato il sequenziamento e l'annotazione del genoma di *T. melanosporum*. I progetti illustrati sono stati finanziati da: Progetto Strategico CNR-Regioni (1994-1999), Regione Piemonte (2007-2009), Compagnia San Paolo (2006-2009) e Commessa Biodiversità del CNR (2003-2005).

## RIASSUNTO

Il tartufo è un fungo di pregio che coniuga interessi commerciali con inattesi interessi scientifici. Per questi due motivi, questo fungo, che vive in simbiosi con la pianta e sviluppa in specifiche condizioni l'aromatico corpo fruttifero (il tartufo), è oggetto di studi

che richiamano l'attenzione non solo dei ricercatori, ma anche di tartufai, agenzie private ed acquirenti di piantine micorrizzate. La filiera del tartufo parte dal suo ritrovamento in campo, ad opera generalmente di un cane guidato dal cacciatore di tartufi, e finisce sulla tavola del consumatore. Quest'ultimo lo consuma fresco o sotto forma di prodotto derivato. Grazie alla messa a punto di strumenti molecolari, oggi è possibile riconoscere le specie pregiate di tartufo bianco e di nero, e quindi controllare l'inoculo utilizzato per le piantine destinate alla vendita e, non ultimo, stabilire se un terreno ha una vocazione naturale alla produzione di tartufo.

#### ABSTRACT

The rhizosphere is a dynamic area close to the roots where microbes interact and compete for root exudates. Among fungi, some ectomycorrhizal fungi accomplish their life cycle with the development of fruitbodies called truffles. Some species are highly appreciated in many countries because of their special taste and smell. The great demand since the end of '90 for species such as *T. magnatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum* and *T. borchii* pushed us to develop protocols to be used for the species identification in all the phases of truffles. Results from these projects revealed that *T. magnatum* is less competitive in field than *T. melanosporum* which is the dominant fungus in the brulé. Tracing these species in the soil of the truffle-grounds allows to monitor the truffle distribution, to test whether a given soil is naturally vocated for trufficulture, and to search for the persistence of the inoculum in an artificial truffle-ground. The fast improvement of molecular techniques recently offered the possibility to sequence the genome of *T. melanosporum*, which at about 125 megabases is by far the largest and most complex fungal genome sequenced so far. The availability of this genome is the most powerful tool to provide insights in the biology of the fungus, as well as to improve the practice of the trufficulture.

#### BIBLIOGRAFIA

- BENCIVENGA M. (2005): *Stato attuale della tartuficoltura italiana*, in Atti Seminario sullo Stato attuale della Tartuficoltura Italiana, a cura di M. Bencivenga, D. Donnini, A. Gobbini, Norcia, pp. 8-12.
- BONFANTE P., ANCA J. (2009): *Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions*, «Annual Review of Microbiology», 63, pp. 363-383.
- CERUTI A., FONTANA A., NOSENZO C. (2003): *Le specie europee del genere Tuber: una revisione storica*, a cura di Regione Piemonte, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, p. 467.
- CITTERIO B., CARDONI P., POTENZA L., AMICUCCI A., STOCCHI V., GOLA G., NUTI M. (1995): *Isolation of bacteria from sporocarps of Tuber magnatum Pico, Tuber borchii Vitt. and Tuber maculatum Vitt.*, in *Identification and Biochemical Characterization. Biotechnology of Ectomycorrhizae*, a cura di V. Stocchi et al., New York, Plenum Press, pp. 241-248.
- FREY-KLETT P., GARBAYE J. (2005): *Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions*, «New Phytologist», 168, pp. 4-8.
- FREY-KLETT P., GARBAYE J., TARKKA M. (2007): *The mycorrhiza helper bacteria revisited*, «New Phytologist», 176, pp. 22-36.

- HALL I.R., YUN W., AMICUCCI A. (2003): *Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms*, «Trends in Biotechnology», 21, pp. 433-438.
- JEANDROZ S., MURAT C., WANG Y., BONFANTE P., LE TACON F. (2008): *Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus Tuber, the "true truffles"*, «Journal of Biogeography», 35, pp. 815-829.
- LANZA B., OWEZAREK M., DE MARCO A., RAGLIONE M. (2004): *Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of substances produced by Tuber aestivum and distributed in the soil using Vicia faba root micronucleus test*, «Fresenius Environmental bulletin», 13, pp. 1410-1414.
- MABRU D., DOUET J.P., MOUTON A., DUPRÉ C., RICARD J.M., MÉDINA B., CASTROVIEJO M., CHEVALIER G. (2004): *PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial Lsu-rDNA as an easy method to differentiate Tuber melanosporum (Perigord truffle) and other truffle species in cans*, «International Journal of Food Microbiology», 94, pp. 33-42.
- MARTIN F., AERTS A., AHRÉN D., BRUN A., DANCHIN E.G.J., DUCHAUSSOY F., GIBON J., KOHLER A., LINDQUIST E., PEREDA V., SALAMOV A. ET AL. (2008): *The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis*, «Nature», 452, pp. 88-92.
- MARTIN F., KOHLER A., MURAT C., BALESTRINI R., COUTINHO P.M., JAILLON O., MONTANINI B., MORIN E., NOEL B., PERCUDANI R. ET AL. (2010): *Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis*, «Nature», 464, pp. 1033-1038.
- MELLO A., GARNERO L., BONFANTE P. (1999): *Specific PCR-primers as a reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots*, «New Phytologist», 141, pp. 511-516.
- MELLO A., FONTANA A., MEOTTO F., BONFANTE P. (2001): *Molecular and morphological characterization of Tuber magnatum mycorrhizas in a long-term survey*, «Microbiological Research», 155, pp. 279-284.
- MELLO A., MURAT C., GAVAZZA V., VIZZINI A., BONFANTE P. (2005): *Tuber magnatum Pico, a species of limited geographic distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle-ground*, «Environmental Microbiology», 7, pp. 55-65.
- MELLO A., MURAT C., BONFANTE P. (2006): *Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy*, «FEMS Microbiology Letters», 260, pp. 1-8.
- MELLO A., MIOZZI L., VIZZINI A., NAPOLI C., KOWALCHUCK G., BONFANTE P. (2010): *Bacterial and fungal communities associated to Tuber magnatum-productive niches*, «Plant Biosystems», 144.
- MULLIS K. (1998): *Ballando nudi nel campo della mente*, Baldini, Castoldi, Dalaj, Milano, p. 222.
- MURAT C., VIZZINI A., BONFANTE P., MELLO A. (2005): *Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural Tuber magnatum a truffle-ground*, «FEMS Microbiology Letters», 245, pp. 307-313.
- MURAT C., ZAMPIERI E., VIZZINI A., BONFANTE P. (2008): *Is the Périgord black truffle threatened by an invasive species? We dreaded it and it has happened*, «New Phytologist», 178, pp. 699-702.
- NAPOLI C., MELLO A., BORRA A., VIZZINI A., SOURZAT P., BONFANTE P. (2010): *Tuber melanosporum, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds*, «New Phytologist», 185: 237-247.
- PACIONI G. (1991): *Effects of Tuber metabolites on the rhizospheric environment*, «Mycological Research», 95, pp. 1355-1358.

- RICCIONI C., BELFIORI B., RUBINI A., PASSERI V., ARCIONI S., PAOLOCCI F. (2008): *Tuber melanosporum outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario*, «New Phytologist», 180, 466-478.
- SMITH S.E., READ D.J. (1997): *Mycorrhizal Symbiosis*, New York, Academic Press.
- SPLIVALLO R., NOVERO M., BERTEA C.M., BOSSI S., BONFANTE P. (2007): *Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in Arabidopsis thaliana*, «New Phytologist», 175: 417-424.
- SUZ L.M., MARTIN M.P., OLIACH D., FISCHER C.R., COLINAS C. (2008): *Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in Tuber melanosporum-Quercus ilex orchards*, «FEMS Microbiology Letters», 285, pp. 72-78.
- WALKER T.S., BAI H.P., GROTEWOLD E., VIVANCO J.M. (2003): *Root exudation and Rhizosphere Biology*, «Plant Physiology», 132, pp. 44-51.
- WARNECKE F., LUGINBÜHL P., IVANOVA N. ET AL. (2007): *Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite*, «Nature», 450, pp. 560-565.
- ZAMPIERI E., MURAT C., BONFANTE P., MELLO A. (2010): *Soil analysis reveals the presence of an extended mycelial network in a Tuber magnatum truffle-ground*, «FEMS Microbiology Ecology», 71, pp. 43-49.



AMALIA BARONE\*, LUIGI MONTI\*

## La genomica per la valorizzazione della filiera del pomodoro

### INTRODUZIONE

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle colture vegetali più importanti per l'alimentazione umana, come dimostra la sua elevata produzione a livello mondiale, che include la produzione del pomodoro da consumo fresco e quella per l'ottenimento di prodotti trasformati, quali pelati, salse e cubettati. L'Italia è uno dei paesi maggiori produttori di pomodoro, essendo presente sul mercato sia del prodotto fresco che di quello trasformato. La produzione di pomodoro in Italia nell'ultimo triennio (2007-2009) ha avuto un leggero trend positivo, nonostante la forte concorrenza di paesi emergenti nel settore, quali la Cina e alcuni Paesi che si affacciano sul Mediterraneo. Per poter ampliare questo trend è cruciale valorizzare ulteriormente tutti i diversi comparti della filiera del pomodoro, dalla materia prima a tutti i prodotti trasformati da essa ottenuti. A tale scopo, tra i vari obiettivi che sono attuali per il miglioramento genetico delle varietà di pomodoro da destinare alla trasformazione industriale, la cui realizzazione può comportare un sicuro vantaggio in termini di maggior valore aggiunto dei prodotti trasformati, rientrano una più spinta diversificazione varietale, un ridotto uso di sostanze antiparassitarie per ottenere prodotti più salubri, e un incremento nel frutto di alcune sostanze che aumentano il valore nutrizionale e salutistico del pomodoro e dei suoi derivati.

Per il raggiungimento di tali obiettivi, il contributo di nuovi strumenti di genomica, che possono affiancare l'enorme patrimonio genetico disponibi-

\* Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università di Napoli "Federico II"

le oggi per il pomodoro, è sicuramente notevole e di grossa efficacia, sia in termini di riduzione dei tempi di realizzazione che in termini di maggiori possibilità di ottenere prodotti, altrimenti non realizzabili.

Tra gli strumenti di genomica che possono favorire lo sviluppo del miglioramento genetico del pomodoro (tab. 1) vi sono un elevato numero di marcatori molecolari, molti dei quali con localizzazione nota su diverse mappe genetiche, diverse piattaforme per l'analisi trascrittomica, oltre a tutte le informazioni che giorno dopo giorno provengono dal progetto di sequenziamento del genoma di pomodoro, che vede coinvolta anche l'Italia con il sequenziamento del cromosoma 12 (Barone et al., 2008). Infine, in continua evoluzione sono anche i database e i software necessari per l'elaborazione e l'utilizzazione della crescente mole di dati che si origina dall'uso di tali risorse genomiche. Molte delle informazioni relative alle risorse genetiche e genomiche disponibili per il pomodoro sono reperibili sul sito del SOL Genomics Network, all'indirizzo <http://solgenomics.net>. Le risorse genomiche, combinate con l'uso di specifiche risorse genetiche disponibili per il pomodoro, quali popolazioni omozigoti permanenti che portano regioni specifiche di genoma di una specie selvatica nel background di una varietà coltivata, le linee di introgressione (Eshed e Zamir, 1995), sono particolarmente utili per lo studio di caratteri quantitativi e l'identificazione di geni candidati al controllo di tali caratteri (Barone et al., 2009).

Nel presente lavoro verranno riportati alcuni esempi sull'uso combinato di risorse genetiche e genomiche nel miglioramento genetico del pomodoro finalizzato a favorire lo sviluppo di una filiera di qualità per questa specie.

RISORSE GENOMICHE
Marcatori molecolari (oltre 2.500)
Mappe molecolari e fisiche
Collezioni di EST (oltre 200.000)
Librerie BAC
Piattaforme microarray
Librerie VIGS
Piattaforme TILLING
Sequenziamento BAC by BAC e Whole genome shot-gun
Database bioinformatici

Tab. 1 *Elenco delle risorse genomiche disponibili a oggi per il pomodoro*



## I MARCATORI MOLECOLARI A TUTELA DELLA DIVERSIFICAZIONE VARIETALE

La necessità di diversificare il prodotto commerciale, come prodotto fresco o trasformato, nasce dalle richieste del mercato di consumatori sempre più esigenti nel gusto, più ricercato e variabile, e che sono disposti a pagare un valore aggiunto per pomodori da destinare a piatti diversi. Basti pensare alle diverse qualità organolettiche di pomodori quali il san Marzano, il pomodoro di Sorrento, o di varie tipologie di pomodorini. Nasce anche dall'esigenza degli agricoltori di coltivare varietà/ecotipi che hanno specifici requisiti per i consumatori ma che richiedono anche diverse cure colturali e maggiori costi di produzione. Pertanto, la diversificazione varietale può essere vantaggiosa per diversi settori della filiera, ma può essere promossa solamente se viene tutelata adeguatamente.

In questo contesto, si inserisce l'uso di marcatori molecolari, capaci di tracciare il DNA di una varietà/ecotipo lungo tutta la filiera. A oggi, per il pomodoro, esistono molti tipi di marcatori che possono essere utilizzati a questo scopo, tra cui marcatori AFLP, MFLP, SSR, con un elevato potere di risoluzione, oltre a un crescente numero di marcatori SNP, le cui informazioni relative sono accessibili alla comunità internazionale su diversi siti (<http://solgenomics.net>; <http://www.tomatomap.net>; <http://solcap.msu.edu>). L'uso combinato di questi diversi tipi di marcatori consente di realizzare un vero e proprio fingerprinting (fig. 1) delle varietà/ecotipi che si intende tutelare a difesa sia dei diritti dei produttori che dei consumatori. Negli ultimi anni, sono in corso di utilizzazione anche sistemi più avanzati di analisi genomica con strumenti di tipo array, che permettono di evidenziare polimorfismi in un centinaio di frammenti di DNA contemporaneamente, consentendo un'analisi di variabilità molto efficiente e rapida (Sim et al., 2009).

Naturalmente, il vero problema della tracciabilità dei prodotti trasformati è la ricerca di marcatori che possano essere ben evidenziati anche sul DNA estratto, non più dal frutto tal quale, ma da una matrice alimentare che è stata soggetta a processi di sterilizzazione ad alte temperature. Questi, infatti, causano una notevole degradazione del DNA in frammenti di piccola dimensione, sui quali può essere estremamente difficoltoso realizzare analisi molecolari affidabili. In questo caso, va effettuata una ricerca sia di un protocollo idoneo per l'estrazione del DNA su tali prodotti sottoposti al processo di trasformazione che del marcatore molecolare più adatto a identificare gli stessi polimorfismi che vengono rilevati sul prodotto fresco. Questi, nel caso del pomodoro, sono i presupposti fondamentali per potere realizzare tracciabilità dal prodotto fresco a quello trasformato. In tale contesto si inserisce l'attività

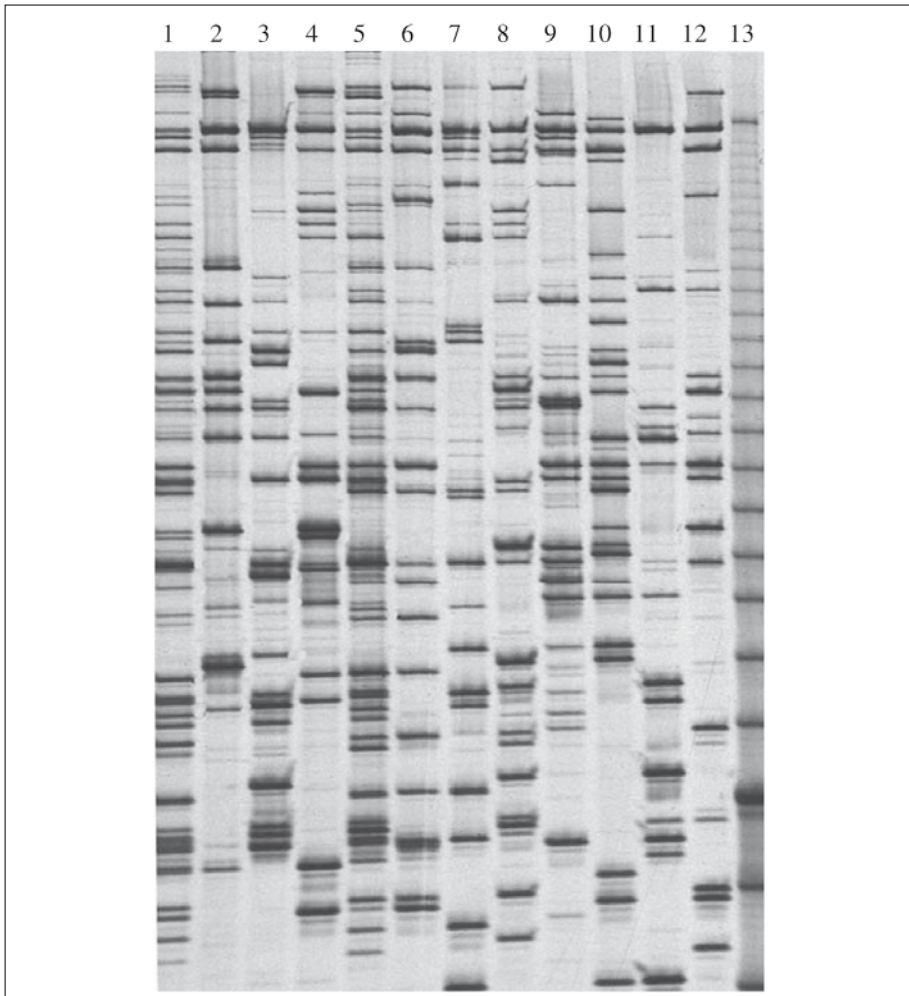


Fig. 1 *Fingerprinting di 12 varietà/ecotipi di pomodoro realizzato mediante marcatori AFLP. 1=san Marzano SQU, 2=Roma, 3= Vesuvio Foglia Riccia, 4=Pizzo AC, 5=Marmande, 6=san Marzano BATT, 7=san Marzano SCHI, 8=Parmì, 9=Sorrento ADG, 10=san Marzano Sel8, 11=Sorrento ART, 12=Vesuvio 2001, 13=Marcatore di pesi molecolari (Ercolano et al., 2008)*

di ricerca svolta nel laboratorio della Prof.ssa Rao del nostro Dipartimento, che ha individuato sia il protocollo più idoneo per l'estrazione del DNA che marcatori di tipo SSR che sono altamente ripetibili nella foglia, nel frutto e nel prodotto inscatolato della stessa varietà (Caramante et al., 2010 submitted). Pertanto, l'uso di tali marcatori oggi è consigliato per realizzare il fingerprinting delle varietà di pomodoro e per tutelare la tracciabilità della filiera.

## LA SELEZIONE ASSISTITA PER L'OTTENIMENTO DI UN PRODOTTO SALUBRE

Un altro obiettivo che si può realizzare per valorizzare la qualità della filiera di pomodoro è quello di ottenere nuove varietà di pomodoro che siano maggiormente tolleranti ai diversi patogeni e parassiti che attaccano il pomodoro in tutte le fasi di sviluppo e tessuti, dalle radici al frutto, causando ingenti danni economici per le notevoli perdite di produzione. Per difendersi da questa perdita, spesso vengono utilizzati molti prodotti antiparassitari di natura chimica, che naturalmente possono causare danni alla salute dei consumatori e dei coltivatori che li usano. Pertanto, la disponibilità di varietà tolleranti può sicuramente limitare l'uso di antiparassitari, consentendo una coltivazione di un pomodoro più salubre.

Per questa specie, il lavoro di miglioramento genetico per l'ottenimento di varietà resistenti a patogeni è facilitato dalla disponibilità di una mappa densa di marcatori molecolari, sulla quale sono stati localizzati geni di resistenza a oltre 35 patogeni, dei quali 17 sono stati anche clonati e sequenziati (Arens et al., 2010). Ciò consente di costruire marcatori molecolari idonei alla selezione assistita, e cioè marcatori molecolari che identificano polimorfismi o all'interno del gene di resistenza stesso o in regioni a esso molto vicine, e che possono essere utilizzati per selezionare le piante resistenti nel corso dei programmi di incrocio finalizzati a trasferire il gene da una varietà resistente a quella suscettibile che si intende migliorare. Nel nostro laboratorio sono stati individuati marcatori molecolari per poter seguire il trasferimento di geni di resistenza a diversi patogeni (fig. 2), quali il virus TSWV, TMV, il nematode *Melodogyne incognita*, il fungo *Verticillium* e altri patogeni che attaccano il pomodoro (Barone et al., 2004; Langella et al., 2004). Tali marcatori sono stati utilizzati sia per realizzare il trasferimento di singoli geni tra una varietà e un'altra, sia per realizzare il pyramiding di più geni di resistenza nello stesso genotipo (fig 3; Barone et al., 2005). Tale attività di selezione assistita da marcatori molecolari (MAS) risulta molto efficiente anche su vasta scala, soprattutto oggi che si possono utilizzare tecnologie che consentono l'automazione di molti marcatori molecolari, facilitando tale lavoro routinario su un elevato numero di piante, come dimostra il fatto che la MAS è stata già utilizzata in pomodoro non solo da istituti di ricerca pubblici, ma anche da molte ditte sementiere per la produzione di materiale selezionato da destinare alla vendita di seme (Fooad, 2007). Pertanto, l'identificazione di un numero sempre maggiore di geni di resistenza, e di marcatori per poterli monitorare, è un obiettivo che continuamente si deve perseguire allo scopo di aumentare la salubrità del pomodoro sia per consumo fresco che destinato alla trasformazione industriale.

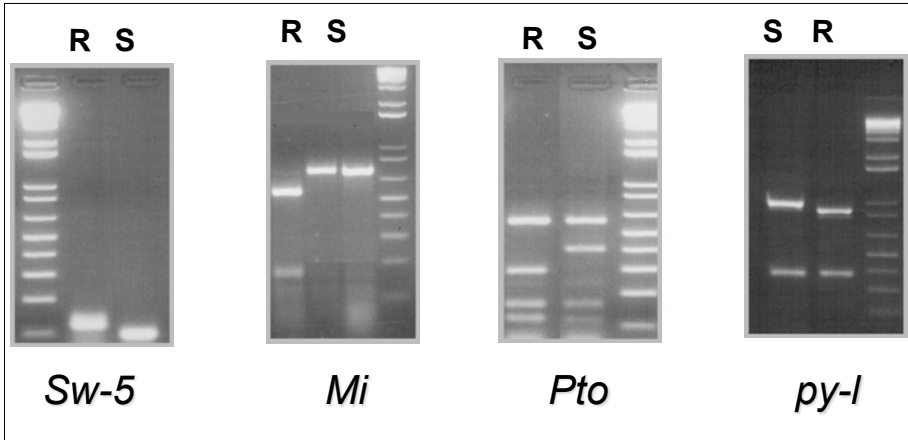


Fig. 2 Marcatori molecolari di tipo CAPS per rilevare polimorfismo tra genotipi resistenti (R) e suscettibili (S) a diversi patogeni che attaccano il pomodoro. Sw-5=gene di resistenza al Tomato Spotted Wilt Virus, Mi=gene di resistenza al nematode *Meloidogyne incognita*, Pto=gene di resistenza al batterio *Pseudomonas syringae* var. tomato, py-l=gene di resistenza al fungo *Pyrenochaeta lycopersici*

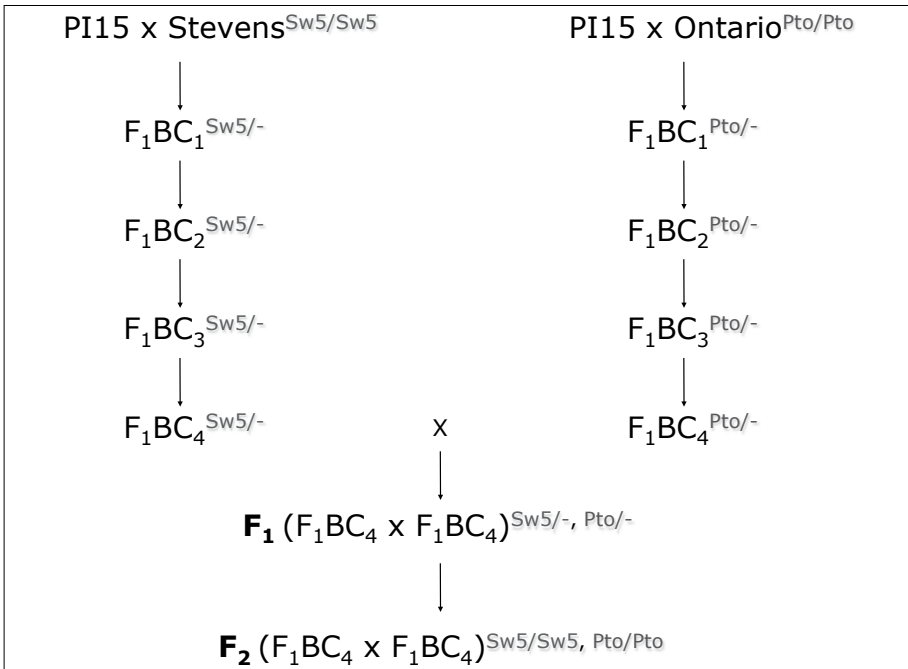


Fig. 3 Schema di incrocio proposto per realizzare il pyramiding di due geni di resistenza (*Sw5* e *Pto*) nello stesso genotipo di pomodoro PI15 da migliorare per resistenza a patogeni (Barone e Frusciante, 2007)

## L'IDENTIFICAZIONE DI GENI CANDIDATI PER UN PRODOTTO CON MIGLIORI CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI E SALUTISTICHE

Infine, negli ultimi anni grande attenzione è stata posta all'uso di alimenti che possono contribuire a migliorare gli apporti di sostanze nutrizionali alla dieta umana e animale, nonché avere proprietà benefiche per la salute umana. Il pomodoro, in particolare, rappresenta un'importante fonte di sostanze antiossidanti, quali vitamina C e fenoli, che hanno effetti protettivi contro alcune malattie croniche e degenerative; la vitamina C, inoltre, può contribuire a migliorare la tolleranza a stress, sia biotici che abiotici, e la qualità del frutto in post-raccolta.

Il lavoro per migliorare il contenuto di vitamina C nei frutti di pomodoro, così come quello di determinate sostanze fenoliche, è reso particolarmente complesso dalla natura quantitativa di questi caratteri, e cioè dal fatto che sono controllati da più geni, ciascuno con un piccolo effetto, e sono fortemente influenzati dall'ambiente. In questo contesto, è particolarmente utile, per ridurre la complessità di tale studio, combinare l'uso di risorse genomiche con specifiche risorse genetiche, che potrà consentire di realizzare schemi di selezione assistita anche per caratteri quantitativi, come proposto nella figura 4. Nel nostro laboratorio, per ricercare geni candidati al controllo del contenuto in vitamina C nelle bacche mature di pomodoro, è stata applicata tale strategia mediante l'uso di una popolazione di linee di introgressione della specie selvatica *Solanum pennellii* nel background della specie coltivata *S. lycopersicum*. Dall'analisi del contenuto in vitamina C effettuata su circa 50 linee di introgressione, ne sono state individuate due (IL7-3 e IL 12-4) con livelli più elevati di tale metabolita nella bacca matura (Di Matteo et al., 2010). Allo scopo di identificare i geni-chiave che controllano tale incremento è stata effettuata un'analisi trascrittomica mediante utilizzo di una piattaforma Combimatrix, che contiene più di 20.000 putativi geni di pomodoro. Da tale analisi, condotta sulla linea IL12-4, sono stati individuati oltre 200 geni differenzialmente espressi tra la linea ad alto contenuto di vitamina C e il controllo. Per alcuni di questi geni è stato ipotizzato un coinvolgimento nei processi di sintesi e accumulo di vitamina C nel frutto (Di Matteo et al., 2010 submitted). Questi geni sono in corso di studio con tecniche che permettono di verificarne il reale coinvolgimento nell'incrementare i livelli di vitamina C nel frutto. Quelli che verranno confermati come geni-chiave, mediante tecniche di silenziamento e/o di sovraespressione genica, saranno utilizzati per costruire marcatori molecolari idonei per la selezione assistita.

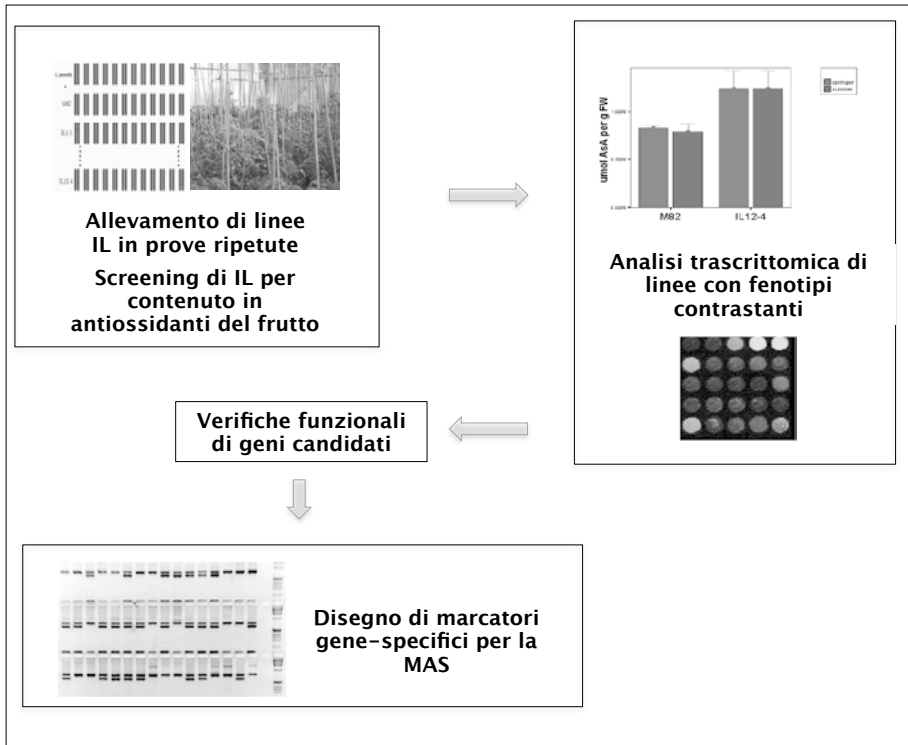


Fig. 4 Schema di breeding assistito proposto per il trasferimento di geni che controllano caratteri quantitativi, mediante uso combinato delle linee di introgressione (IL) e di una piattaforma per l'analisi trascrittómica

Lo stesso approccio di genomica integrata è stato seguito per identificare geni per il controllo del contenuto di fenoli nel frutto, utilizzando la serie di geni differenzialmente espressi tra la linea IL7-3 e il controllo, in quanto la linea IL7-3, oltre a evidenziare un elevato contenuto di vitamina C nel frutto presenta anche un elevato contenuto di fenoli. Quest'ultimo carattere è particolarmente interessante per i derivati del pomodoro, in quanto è stato dimostrato che i composti antiossidanti di tipo flavonoidi, al contrario della vitamina C, si conservano nel prodotto trasformato, dopo avere subito il processo industriale di sterilizzazione (Capanoglu et al., 2008). Infine, schemi di incrocio tra le due linee di introgressione sono in corso di realizzazione da due anni, allo scopo di cumulare nella stessa linea migliorata sia i geni per l'aumento del contenuto di vitamina C che quelli per l'incremento dei fenoli nel frutto, sviluppando uno schema di pyramiding simile a quello proposto per i geni di resistenza a patogeni.

## CONCLUSIONI

Le grosse potenzialità che gli strumenti di genomica offrono al miglioramento genetico del pomodoro sono chiaramente evidenti, grazie ai risultati che l'intera comunità scientifica e le ditte sementiere stanno ottenendo negli ultimi anni (Lippman, 2007). Tali potenzialità saranno ulteriormente rafforzate dalle informazioni derivanti dal sequenziamento del genoma di pomodoro, che sarà completato entro il 2010. Dati preliminari provenienti dal progetto internazionale di sequenziamento attualmente mettono già in evidenza mediamente nel genoma di pomodoro un gene ogni 6 kb, con dimensione media di 996 bp e presenza di 3.7 esoni per ciascun gene. Complessivamente è stato perciò stimato che il genoma di pomodoro contenga circa 40.000 geni (Mueller et al., 2009). Inoltre, un numero elevato di strumenti bioinformatici sono stati generati nell'ambito di tale progetto e questi permetteranno sia ai ricercatori che ai breeder di poter utilizzare le sequenze disponibili oggi e nel prossimo futuro. Tali informazioni porteranno, infatti, alla conoscenza dei geni, delle loro funzioni e alla loro precisa localizzazione sui cromosomi del pomodoro, requisiti fondamentali per poter costruire marcatori gene-specifici da utilizzare in programmi di selezione assistita finalizzati alla valorizzazione della filiera del pomodoro.

## RINGRAZIAMENTI

Il lavoro è stato svolto grazie al contributo del Progetto Agronotech, finanziato dal MiPAF, e del Progetto GenoPom, finanziato dal MiUR.

## RIASSUNTO

L'Italia è uno dei paesi maggiori produttori di pomodoro, sia per consumo fresco che per i prodotti trasformati. Per poter incrementare ulteriormente la produzione è fondamentale valorizzare tutti i diversi comparti della filiera del pomodoro, a partire dalla realizzazione di diversi obiettivi di miglioramento genetico, finalizzati all'ottenimento di nuove materie prime. Questi possono essere realizzati con successo grazie anche all'ausilio di una vasta ricchezza di risorse genomiche oggi disponibili per il pomodoro, la cui utilizzazione viene riportata in alcuni esempi.

L'uso intensivo degli oltre 2500 marcatori molecolari descritti per il pomodoro può essere, infatti, di notevole aiuto nell'accelerare e rendere più efficiente i processi di diversificazione varietale e di ottenimento di un prodotto alimentare più salubre. Nel primo caso, infatti, le tecniche di fingerprinting molecolare sono fondamentali per identificare

ciascuna varietà/ecotipo, consentendo così di tutelare i produttori e i consumatori sulla specificità del prodotto sia da consumo fresco che trasformato. Nel secondo caso, l'uso dei marcatori molecolari associati a geni di resistenza a patogeni consente di realizzare selezione assistita per l'ottenimento di nuove varietà resistenti, che richiedono un ridotto apporto di sostanze antiparassitarie, garantendo al consumatore un alimento più salubre. Infine, viene proposto l'uso combinato di una piattaforma di trascrittomico con risorse genetiche, specificamente selezionate, per consentire il miglioramento genetico di caratteri a eredità più complessa, quali quelli legati alla qualità nutrizionale e salutistica del pomodoro.

Le strategie proposte costituiscono degli esempi delle potenzialità che la genomica offre per la valorizzazione della filiera del pomodoro: questa disciplina è in continuo sviluppo e avanzamento tecnologico, grazie anche alle informazioni che provengono dal progetto di sequenziamento del genoma del pomodoro, in corso di completamento.

#### ABSTRACT

Italy is one of the largest producers of tomatoes, both for fresh consumption and processed products. To further increase production is crucial to encourage all the different sectors of the tomato industry, including the realization of various genetic improvement objectives, aimed at obtaining new materials. These can be successfully realized thanks also to many genomic resources now available for the tomato, whose use is reported in some examples.

The intensive use of more than 2500 molecular markers described for the tomato can in fact be of significant help in accelerating and making more efficient the process of variety diversification and in obtaining a health food. In the first case, the molecular fingerprinting is essential to identify each variety/ecotype, thus allowing to protect both producers and consumers for the specificity of fresh and processed products. In the second case, the use of molecular markers associated to genes for resistance allow to realize assisted selection with the aim of obtaining new resistant varieties. This will reduce intake of pesticides, assuring consumers of a more healthy food. Finally, the combined use of a transcriptomic platform with selected genetic resources is proposed to realize assisted-selection even for quantitative traits, such as those related to nutritional and health quality of tomato. The proposed strategies are examples of how genomics tools can enhance improvement of the tomato industry; these tools are constantly evolving also thanks to information coming from the tomato genome sequencing project, nearing completion.

#### BIBLIOGRAFIA

ARENS P., MANSILLA C., DEINUM D., CAVELLINI L., MORETTI A., ROLLAND S., VAN DER SCHOOT H., CALVACHE D., PONZ F., COLLONNIER C., MATHIS R., SMILDE D., CARANTA C., VOSMAN B. (2010): *Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing*, «Theor Appl Genet», 120, pp. 655-664.



- BARONE A., LANGELLA R., ERCOLANO M.R., DI MATTEO A., MONTI L. (2004): *Strategies for pathogen resistance gene transfer in tomato with the aid of molecular markers*, in S.G. Pandalai (ed), *Recent Res Devel Genet Breeding*, 1, pp. 211-222.
- BARONE A., ERCOLANO M.R., LANGELLA R., MONTI L., FRUSCIANTE L. (2005): *Molecular marker-assisted selection for pyramiding resistance genes in tomato*, «*Adv Hort Sci*», 19, pp. 147-152.
- BARONE A., FRUSCIANTE L. (2007): *Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato*, in *Marker-Assisted Selection (MAS) in Crops, Livestock, Forestry and Fish: Current Status and the Way Forward*, Fao, pp. 151-164.
- BARONE A., CHIUSANO M.L., ERCOLANO M.R., GIULIANO G., GRANDILLO S., FRUSCIANTE L. (2008): *Structural and Functional Genomics of Tomato*, «*Intl J Plant Genomics*», doi: 10.1155/2008/820274.
- BARONE A., DI MATTEO A., CARPUTO D., FRUSCIANTE L. (2009): *High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency*, «*Curr Genomics*», 10, pp. 1-9.
- CAPANOGU E., BEEKWILDER J., BOYACIOGLU D., HALL R., DE VOS R. (2008): *Change in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste*, «*J Agric Food Chem*», 56, pp. 964-973.
- DI MATTEO A., SACCO A., BARONE A. (2010): *Un approccio innovativo per l'identificazione di geni coinvolti nella sintesi della vitamina C nel frutto di pomodoro*, «*I Georgofili. Quaderni*», 2009, III, pp. 51-64.
- ERCOLANO M.R., CARLI P., SORIA A., CASCONI A., FOGLIANO V., FRUSCIANTE L., BARONE A. (2008): *Biochemical, sensorial and genomic profiling of traditional Italian tomato varieties*, «*Euphytica*», 164, pp. 571-582.
- ESHED Y., ZAMIR D. (1995): *An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTLs*, «*Genetics*», 141, pp. 1147-1162.
- FOOLAD M.R. (2007): *Genome mapping and molecular breeding of tomato*, «*Int J Plant Genomics*», Article ID 64358, 52 pages doi:10.1155/2007/64358.
- LANGELLA R., ERCOLANO M.R., MONTI L., FRUSCIANTE L., BARONE A. (2004): *Molecular marker assisted transfer of resistance to TSWV in tomato elite lines*, «*J Hort Sci & Biotech*», 79, pp. 806-810.
- LIPPMAN Z.B., SEMEL Y., ZAMIR D. (2007): *An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines*, «*Curr Opin Genet & Dev*», 17, pp. 545-542.
- MUELLER L.A., KLEIN LANKHORST R., TANKSLEY S.D., GIOVANNONI J.J., WHITE R., VREBALOV J. ET AL. (2009): *A snapshot of the emerging tomato genome sequence*, «*The Plant Genome*», 2, pp. 78-92.
- SIM S.-C., ROBBINS M.D., CHILCOTT C., ZHU T., FRANCIS D.M. (2009): *Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of SNP variation associated with breeding*, «*BMC Genomics*», 10, pp. 466-475.



M. STELLA GRANDO\*, RITA VIGNANI\*\*, MONICA SCALI\*\*,  
MADDALENA SORDO\*, ELISA PAOLUCCI\*\*, SILVIA LORENZI\*,  
JACOPO BIGLIAZZI\*\*, FLAVIA M. MOREIRA\*, RICCARDO VELASCO\*,  
MAURO CRESTI\*\*

## Tracciabilità su base molecolare dell'intera filiera vitivinicola

### INTRODUZIONE

Ragioni tecniche e commerciali si sono aggiunte negli ultimi tempi all'antica curiosità di conoscere l'identità delle viti e dei loro prodotti. La possibilità di stabilire sulla base di osservazioni morfologiche la corrispondenza varietale dei vitigni è stata infatti sempre molto esplorata, anche in ambienti diversi da quello produttivo ed è testimoniata dallo sviluppo della scienza ampelografica e dall'abbondante letteratura con riferimenti iconografici. Il nome dei vitigni è oggi evocativo per molti appassionati di vino, tanto che lo stesso marketing a volte attinge al vasto patrimonio di leggende e aneddoti per promuovere un prodotto enologico. Ma la fioritura di denominazioni che caratterizza i vitigni non ha uguali nelle altre specie coltivate, come particolare è per la vite l'esistenza di un numero ancora indefinito di varietà diverse nelle collezioni di germoplasma. In questa complessa situazione si inserisce oggi anche l'opportunità di stabilire l'origine varietale dei prodotti enologici, al fine di dimostrare il rispetto dei numerosi disciplinari che regolano le denominazioni dei vini.

### IL RICONOSCIMENTO MOLECOLARE DELLE VARIETÀ DI VITE

L'applicazione diffusa dei test basati sul DNA nell'ultimo decennio ha certamente rivoluzionato molte assunzioni. Il riconoscimento dei vitigni è diven-

\* *Fondazione Edmund Mach-Istituto Agrario di San Michele all'Adige Centro Ricerca e Innovazione, (Trento)*

\*\* *Università di Siena, Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti"*

tato più oggettivo, sono stati svelati casi di identità insospettati tra le varietà, è stato possibile indagare i legami di parentela e scoprire l'origine genetica di molte cultivar locali e internazionali (Vouillamoz e Grandó, 2006). I marcatori molecolari di elezione in viticoltura sono diventati i microsatelliti, ovvero dei tratti del genoma caratterizzati da sequenze ripetute in tandem che presentano una elevata variabilità naturale. Sfruttando l'alto potere discriminante di questi marcatori, alcuni loci microsatelliti (SSR) proposti dalla comunità scientifica sono stati adottati per stabilire un profilo molecolare minimo delle varietà di vite, al fine di semplificare i confronti varietali e creare delle descrizioni di riferimento per i vitigni. Il successo di tale approccio è dimostrato dai numerosi laboratori che si sono dotati dell'attrezzatura necessaria per le analisi, dalla miriade di profili SSR pubblicati nelle riviste tecnico-scientifiche e anche dall'inserimento ufficiale di 6 loci microsatelliti fra i descrittori OIV (This et al., 2004). Questo riconoscimento della necessità di complementare le tradizionali descrizioni ampelografiche e ampelometriche con l'apporto dei marcatori molecolari ha rappresentato un passaggio significativo nella pratica di caratterizzazione dei vitigni, tuttavia ha reso indispensabile la creazione di database dei profili molecolari e la definizione true-to-type delle varietà.

La possibilità di avere l'intero patrimonio di vitigni e accessioni di germoplasma viticolo descritto con profili molecolari molto informativi, facili da confrontare e rapidi da ottenere è oggi tecnicamente fattibile ma un po' difficile da realizzare se si considera la frammentarietà delle collezioni e l'esistenza di materiali ancora non recuperati sul territorio.

#### IL RICONOSCIMENTO DEI CLONI

In viticoltura si parla di cloni per intendere sia delle cultivar ottenute dalla propagazione di varianti fenotipiche comparse all'interno di un certo vitigno, sia delle selezioni sanitarie di uno stesso vitigno. A sua volta il vitigno è una popolazione di piante riprodotte per via vegetativa da un semenzale originario e ha dunque generalmente un'origine monoclonale. Cercare le mutazioni genetiche responsabili delle variazioni intra-varietali è stata finora un'impresa incerta. Questo perché non sempre il fenotipo della pianta di vite varia a causa di una mutazione genetica, anche se poi la variazione si dimostra relativamente stabile nel tempo. Fenomeni di modificazione del patrimonio genetico sono senz'altro all'origine di certe variazioni somatiche osservate nei tralci di diverse varietà che poi sono state propagate. Ogni caso

ha presumibilmente un'origine particolare e non esiste ancora un metodo efficace per la discriminazione generale dei cloni. I mutanti del colore della bacca sono stati recentemente distinti a livello molecolare con un certo successo, grazie alla chiara descrizione del fenotipo e all'esistenza di informazioni sul controllo genetico e biochimico della pigmentazione dell'uva (Walker et al., 2006 e Yakushiji et al., 2006). Tuttavia, la maggior parte delle selezioni clonali in viticoltura non si distingue dalla varietà di origine per qualche tratto ben preciso. Di solito le caratteristiche dei cloni fanno riferimento a variazioni di epoche fenologiche, migliori performance produttive, una più elevata qualità delle uve. In queste situazioni la ricerca delle mutazioni non può essere ristretta a geni candidati, perché è difficile ipotizzare la base genetica del fenotipo complesso. Se la differenza è genetica, verrà più probabilmente identificata tramite estesi confronti delle porzioni più instabili del genoma, come recentemente dimostrato dal profiling di famiglie di retrotrasposoni in vite (Moisy et al., 2008). Un'altra prospettiva potrà considerare lo stato epigenetico della pianta: differenze nel pattern di metilazione del genoma sono state riportate da Schellenbaum et al. (2008) tra cloni osservati dopo coltura in vitro della stessa varietà di vite.

#### OLTRE AI MARCATORI MICROSATELLITI: GLI SNP

I microsatelliti sono e, probabilmente, saranno ancora per qualche anno i marcatori più utilizzati dalla comunità scientifica interessata all'analisi varietale. Questi marcatori potranno essere sostituiti o affiancati da altri quali i Polimorfismi di Singolo Nucleotide (SNP). Gli SNP derivano dalle variazioni, per mutazione, di una singola base nucleotidica e sono molto frequenti nel genoma. L'eterozigosi del Pinot Nero, per esempio, è documentata dall'identificazione di circa 2 milioni di polimorfismi di singolo nucleotide, oltre a circa un milione di inserzioni e delezioni (in/dels) nella sequenza del suo intero genoma (Velasco et al., 2007). I marcatori SNP si prestano meglio dei microsatelliti a un'analisi automatizzata e in multiplex, ovvero di molti loci contemporaneamente. Diverse tecnologie sono disponibili per caratterizzare gli individui a livello di numerosi SNP e alcune sono già state applicate alla vite, come per es. il sistema SNPLex (Lijavetzky et al., 2007). Con questo approccio è stato calcolato che un set di 48 SNP validati, distribuiti lungo tutti i cromosomi di vite e frequenti tra le cultivar, può definitivamente soddisfare la maggior parte delle richieste di genotipizzazione dei materiali viticoli per scopi di tracciabilità (tab. 1). Diversi sistemi possono oggi fornire rapidamente

VITIGNO	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	SNP 6	SNP 7	SNP 8	SNP 9	SNP 10	SNP 11	SNP 12	SNP 13	SNP 14
Rebo	CC	AG	CC	TT	TT	TT	CT	CG	CC	AA	AA	AA	AG	AG
Refosco peduncolo rosso	CC	AG	CC	CT	GG	TT	CT	CG	AA	GG	AA	TT	GG	AG
Schiava grossa	AA	AG	CT	CT	GT	AT	TT	CC	AA	AA	AA	TT	AA	AG
Marzemino	CC	AG	CC	TT	GT	TT	CT	CG	AC	GG	AA	TT	GG	AG
Teroldego	CC	AG	CC	TT	GT	AT	CT	CG	CC	AG	AA	AT	GG	AG
Lagrein	AC	AG	CC	TT	TT	AT	TT	CG	AC	AA	AA	AA	GG	AG
Lambrusco a f.f.	AA	GG	CC	CT	GT	AT	TT	CG	CC	AG	AG	AT	AA	AG
Lambrusco casetta	AC	GG	CT	TT	TT	TT	TT	CG	CC	AA	AA	AT	AA	AA

Tab. 1 *Esempio di genotipizzazione dei vitigni trentini ad alcuni loci SNP*

informazioni su migliaia di SNP, come una scansione dell'intero genoma, per ogni varietà o accessione di interesse. In questa direzione si sono mossi diversi gruppi per caratterizzare il germoplasma di vite in collezione, allo scopo di studiare le origini genetiche e la diffusione della viticoltura, ma soprattutto di stabilire associazioni tra il genotipo molecolare e tratti di importanza agronomica (Myles et al., 2010). Con approcci simili, che garantiscono l'esplorazione di una buona parte delle porzioni variabili del genoma, è stata intrapresa la ricerca di variazioni genetiche anche tra le selezioni clonali.

#### TRACCIABILITÀ DELLA FILIERA VIVAISTICA

Il controllo dell'identità dei materiali prodotti dalle attività vivaistiche ha oggi a disposizione metodi robusti e facilmente accessibili basati sui test del DNA. Una volta stabilito il profilo delle piante madri, la corrispondenza dei materiali di propagazione è accertabile con analisi di routine. Certo non tutti i vitigni inseriti nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite si possono definire univocamente caratterizzati. Esistono infatti casi in cui lo stesso genotipo compare nel Registro con diverse denominazioni (sinonimie non riconosciute) e casi in cui genotipi diversi sono considerati la stessa varietà (omonimie). Inoltre, la mancanza delle fonti originali dei materiali riportati nel Registro rende difficile stabilire il profilo genetico di riferimento per alcuni vitigni minori e diversi portinnesti. Il viticoltore ha comunque modo di avvalersi oggi di validi strumenti per conoscere il genotipo molecolare dei materiali presenti nei vigneti o acquistati per i nuovi impianti. Considerato che la filiera vivaistica è solo una parte dell'intera filiera viti-enologica, la certezza dell'identità

e dell'omogeneità genetica delle viti coltivate rappresenta una buona base per garantire e difendere l'identità genetica del vino prodotto.

#### TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DEL VINO

La tracciabilità di un prodotto alimentare tipico, compreso il vino di alta qualità, può essere ottenuta sia attraverso l'attuazione di un'attenta politica di tutela del germoplasma locale che attraverso lo sviluppo di metodiche analitiche in grado di supportare le attuali procedure di certificazione, da cui sia possibile attestare la composizione delle materie prime utilizzate. Data la crescente necessità di competere efficacemente sui mercati internazionali, sembra infatti necessario che le attuali procedure di certificazione documentale vengano implementate con test analitici standardizzabili e ripetibili, in accordo a un rigoroso criterio di applicabilità scientifica.

Un sistema di tracciabilità completo registra e trasmette informazioni dettagliate di un particolare cibo attraverso la catena alimentare, recuperando le informazioni critiche relative a ogni stadio di lavorazione delle materie prime. Allo scopo di attuare un sistema accurato di tracciabilità è comunque essenziale avere una conoscenza approfondita sull'identità genotipica dei vitigni, di cui il germoplasma regionale italiano è estremamente ricco. È quindi impensabile sviluppare e adottare un sistema di tracciabilità molecolare aziendale accurato per il vino, senza avere come prerequisito essenziale una conoscenza dettagliata della variabilità genotipica dei vitigni utilizzati per le varie produzioni regionali, regolamentate dai numerosi e rispettivi disciplinari di produzione.

I marcatori molecolari e in particolare i marcatori tipo SSR si sono rivelati già da circa un decennio, strumenti importanti per la determinazione varietale di mosto e vino (Siret et al., 2000; Garcia-Beneytez et al., 2002; Vignani et al., 2006; Bisson et al. 2002).

L'autenticazione della composizione varietale di un vino, mediante test del DNA, costituisce pertanto una logica conseguenza e un completamento dello sviluppo delle tecniche molecolari applicate a tutela della qualità delle produzioni vitivinicole.

#### METODI DI ESTRAZIONE DI DNA DA VINO

Nell'ambito della caratterizzazione varietale del vino, l'aspetto critico dell'intero processo consiste nella fase di estrazione del DNA residuo presente in bottiglia.

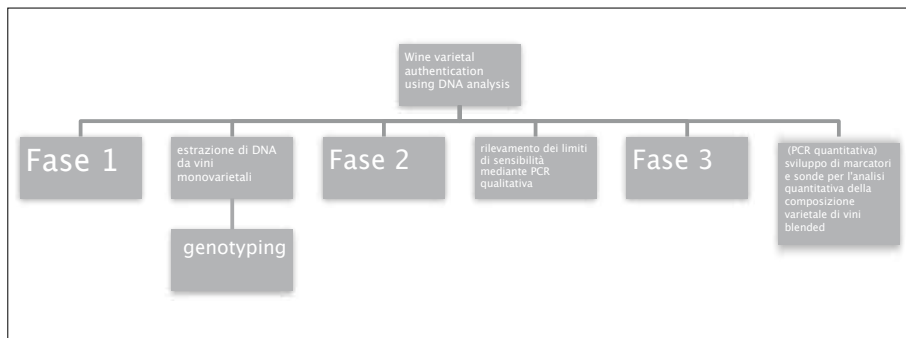


Fig. 1 Schema delle fasi di attuazione del progetto dal titolo: “Wine varietal authentication using DNA analysis” (settembre 2009-marzo 2011), finanziato a Serge-genomics (Dipartimento di Scienze Ambientali “G. Sarfatti”, Università di Siena) dall’Ente governativo statunitense TTB per lo studio di fattibilità dell’applicazione dei test molecolari per la determinazione della composizione varietale del vino

Come è naturale, il DNA presente nel vino derivante da *Vitis vinifera* costituisce solo una minima parte del DNA presente, che deriva infatti in prevalenza dalle popolazioni di lievito e dai batteri che hanno partecipato ai processi fermentativi (Savazzini e Martinelli 2006), ed è stimabile nell’ordine delle pico- fento- moli. A tale scopo, nei laboratori Serge-genomics ([www.serge-genomics.it](http://www.serge-genomics.it), Siena) sono stati confrontati tre metodi di estrazione su un pannello di 10 vini commerciali comprendenti varie tipologie di produzioni regionali aventi invecchiamento diverso (fino a 12 anni). I risultati ottenuti hanno dimostrato un miglior risultato, valutato in termini di rapporto resa e percentuale di campioni amplificabili in PCR, nel caso del protocollo di Siret et al. (2000), a cui sono state apportate modificazioni minori.

Allo scopo di confrontare l’efficacia dei marcatori microsatelliti per la certificazione dell’uvaggio del vino mediante test del DNA, il Dipartimento di Scienze Ambientali, attraverso lo spin-off Serge-genomics, ha intrapreso uno studio di fattibilità finanziato dal TTB (Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau) volto alla caratterizzazione di vini monovarietali sperimentali prodotti appositamente allo scopo dal “Wine Institute” (US). Il progetto dal titolo: “WINE VARIETAL AUTHENTICATION USING DNA ANALYSIS” (Settembre 2009-Marzo 2011) (fig. 1), ha dimostrato che esiste una buona corrispondenza tra i profili genotipici ottenuti da vino e pianta (vedi paragrafo successivo).

I vini impiegati sono costituiti da sette tipologie monovarietali ottenute in quadruplicato dai principali vitigni diffusi in USA (Pinot Noir, Merlot, Sauvi-



gnon Blanc, Riesling, Zinfandel, Chardonnay, Cabernet Sauvignon). Alla lista dei campioni sono stati aggiunti dei vini monovarietali di controllo ottenuti con Sangiovese. La qualità del DNA è stata verificata mediante spettrofotometria fine (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) e le frazioni di DNA purificato sono state conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  e utilizzate per le applicazioni "downstream" anche a distanza di diverse settimane, dimostrando la relativa stabilità chimica del DNA estratto, anche se presente in quantità estremamente esigua. A causa delle condizioni critiche del DNA presente nel vino, le letture mediante spettrofotometro hanno condotto sovente a valori non completamente attendibili. Per questa ragione i campioni sono stati sistematicamente sottoposti ad amplificazione mediante PCR per l'identificazione del genotipo.

#### GENOTIPIZZAZIONE DEL DNA DA VINO

Ogni campione di DNA è stato analizzato mediante genotipizzazione in condizioni standard (Vignani et al., 2008) utilizzando un pannello di almeno 7 loci SSR, in modo da garantire un'adeguata significatività statistica ( $PI \leq 10^{-7}$ ). Il dimensionamento allelico è stato effettuato per mezzo di un sequenziatore e analizzatore di frammenti (MegaBACE TM 500), dotato di software per la rielaborazione dei profili genotipici, Fragment Profiler, v. 1.2 (entrambi GE Healthcare, Milano, Italia). I dati grezzi sono stati confrontati con diverse banche dati on-line specificamente dedicate alla vite (MsDbase <http://www.msdb.unisi.it/login.php>, [www.vitisgenome.it/en/index.php5](http://www.vitisgenome.it/en/index.php5)). Tutti i campioni di vino hanno consentito di ottenere una frazione di DNA utilizzabile per la genotipizzazione, mostrando una buona ripetibilità nelle repliche tecniche. In media, ogni vino è stato identificato sulla base del dimensionamento allelico effettuato su 12 loci. I dati mostrati in tabella 2 sono la risultante delle analisi effettuate in tre repliche tecniche per tipologia varietale, incluso i campioni di controllo monovarietale di Sangiovese che sono stati introdotti a ogni ciclo di caratterizzazione dei vini forniti dal Wine Institute statunitense.

Due vini (Sauvignon Blanc e Sangiovese) sono stati analizzati per 15 e 14 loci, rispettivamente. Altri due, Chardonnay e Pinot nero, per 11 loci, il Cabernet Sauvignon per 14 loci e lo Zinfandel per 7 loci rispettivamente. Solo il Riesling e il Merlot sono stati analizzati utilizzando 5 e 6 loci rispettivamente, che rappresentano mediamente, fatto salvo il potere discriminante dei marcatori impiegati, il pannello minimo di loci SSRs utili a effettuare un'accurata identificazione varietale per la vite.

vini	TTB	TTB	TTB	TTB	TTB	TTB	TTB	controllo
	Riesling	Sauv Blanc	Chardon	Cabernet S	Merlot	Pinot Nero	Zinfandel	Sangiovi
D7		+						+
S2		+				+		+
D14		+		+		+		+
D27	+	+	+	+	+	+	+	+
D25		+	+	+	+	+	+	+
ZAG47	+	+	+	+				+
D31		+	+	+	+	+	+	+
ZAG79		+		+		+		+
D21	+	+	+	+	+		+	+
D36	+		+	+	+		+	+
ZAG21		+	+	+		+		+
ZAG64		+		+			+	
ZAG83		+	+	+		+		+
D24	+	+	+	+		+	+	+
D32		+	+	+				
D34		+	+	+	+	+		+

Tab. 2 Amplificazione della componente di DNA residuale nei 7 vini monovarietali prodotti dal Wine Institute, oltre al vino di controllo monovarietale ottenuto da Sangiovese. L'identificazione varietale del vitigno impiegato è basata sull'amplificazione di un pannello di marcatori SSRs variabile dai 5 ai 15 loci

#### MISURE DELLA COMPONENTE VARIETALE DEL DNA NEL VINO

Fra gli aspetti critici della caratterizzazione varietale dei vini mediante amplificazione di loci microsatelliti, è importante valutare le potenzialità della metodica sotto il profilo della sensibilità. Tale aspetto risulta fondamentale sia per stimare la potenziale contaminazione varietale in vini monovittigno, che per saggiare l'uvaggio nel caso dei vini *blended*. Il limite di rilevabilità permette di capire quale sia la percentuale minima di uvaggio proveniente da una cultivar, eventualmente non ammessa dal disciplinare di produzione, rintracciabile nel vino. Nel caso specifico sono stati prodotti artificialmente vini *blended* costituiti da Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc, presenti in quantità controllate.

I vini *blended* sono stati ottenuti incrementando la percentuale volumetrica di Sauvignon Blanc rispetto al Cabernet Sauvignon d'intervalli minimi (da 1 a 2 %), in accordo allo schema riportato in tabella 3.

L'estrazione del DNA e la caratterizzazione varietale è stata effettuata per i seguenti campioni: 1-2-3-4-5-6-11-14-16-26-51, consentendo di evidenziare con attendibilità statistica la componente varietale minoritaria fino all'1% (Elisa Paolucci, tesi di dottorato).

Numero assegnato	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CABERNET SAUVIGNON	100%	99%	97.5%	95%	92%	90%	88%	86%	84%	82%
SAUVIGNON BLANC	0%	1%	2.5%	5%	8%	10%	12%	14%	16%	18%
	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
CABERNET SAUVIGNON	80%	78%	76%	74%	72%	70%	68%	66%	64%	62%
SAUVIGNON BLANC	20%	22%	24%	26%	28%	30%	32%	34%	36%	38%
	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>
CABERNET SAUVIGNON	60%	58%	56%	54%	52%	50%	48%	46%	44%	42%
SAUVIGNON BLANC	40%	42%	44%	46%	48%	50%	52%	54%	56%	58%
	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
CABERNET SAUVIGNON	40%	38%	36%	34%	32%	30%	28%	26%	24%	22%
SAUVIGNON BLANC	60%	62%	64%	66%	68%	70%	72%	74%	76%	78%
	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>49</b>	<b>50</b>
CABERNET SAUVIGNON	20%	18%	16%	14%	12%	10%	8%	5%	2.5%	1%
SAUVIGNON BLANC	80%	82%	84%	86%	88%	90%	92%	95%	97.5%	99%
	<b>51</b>									
CABERNET SAUVIGNON	0%									
SAUVIGNON BLANC	100%									

Tab. 3 Vini "blended" ottenuti da vini monovarietali di Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc rispettivamente, utilizzati per la determinazione del limite di rilevabilità della componente minoritaria mediante PCR

## CONCLUSIONI

Attraverso le analisi del DNA è oggi possibile effettuare il controllo di qualità genetica lungo l'intera filiera vitivinicola, per quanto l'estensione dell'indagine alle numerose casistiche dei disciplinari di produzione dei vini italiani richieda ancora un certo impegno di validazione. Insieme all'analisi isotopica che traccia l'origine geografica dei prodotti enologici, l'approccio genético-molecolare e una più profonda valutazione della composizione dei vini offerta dall'emergente analisi metabolomica rappresentano potenti nuovi strumenti disponibili per complementare gli attuali sistemi di certificazione.

## RIASSUNTO

Le produzioni vivaistiche viticole si basano sulla moltiplicazione vegetativa di materiali che rispondono ai requisiti di identità su base ampelografica. Diversi tipi di marcatori del DNA possono essere applicati per analisi di corrispondenza varietale e finora i profili di riferimento sono stati basati sui microsatelliti. Altri polimorfismi del DNA vengono ora esplorati per sviluppare applicazioni utili anche al riconoscimento delle selezioni clonali. La conoscenza della variabilità genotipica dei materiali utilizzati è un prerequisito per lo sviluppo e l'adozione di sistemi di tracciabilità molecolare che si estendano al segmento enologico. Insieme ad alcune considerazioni specifiche sui segmenti vivaistico ed enologico della filiera vitivinicola, in questa presentazione si riportano i risultati dell'esperienza di analisi della componente varietale del DNA del vino ottenuti dal laboratorio Serge-genomics dell'Università di Siena.

## ABSTRACT

Grapes are propagated by nurseries starting from stocks which are identified based on ampelographic evaluations. In order to check the identity of grapevine materials from the source to the vineyard, several kinds of DNA markers are available, even though reference DNA profiles have been established so far based only on microsatellites. Other DNA polymorphisms are now being explored for the identification of grapevine clonal selections. Before the development of a DNA-based system of traceability for controlling the entire production chain at farm level, the extent of genetic variability within the cultivated materials should be considered. Here we discuss some specific features of grape and wine molecular tracing and present the results obtained by the laboratory Serge-genomics at Siena University aimed to determine the grape cultivar content of wine using microsatellite PCR products.

## RINGRAZIAMENTI

La caratterizzazione del germoplasma viticolo con marcatori del DNA e lo sviluppo di un sistema di riconoscimento dei vitigni finalizzato ad applicazioni di tracciabilità sono stati condotti presso la FEM-IASMA con il finanziamento del Progetto Europeo GRAPE-GEN06.

Il presente studio, per ciò che riguarda la tracciabilità molecolare del vino, è stato finanziato all'Università di Siena dallo statunitense TTB nell'ambito del progetto: "*Wine varietal authentication by use of DNA analysis*". Si ringraziano in particolare il Dr. Abdul Mabud per i preziosi suggerimenti e il costante supporto scientifico offerto durante tutto lo svolgimento del progetto e i Sig.ri Giampaolo Fregoli e Gianni Totaro di Sistema Qualità Siena per aver fornito i vini monovarietali di Sangiovese usati come controllo.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

BISSON L., WATERHOUSE A. L., EBELER S. E., WALKER A., LAPSLEY J.T. (2002): *The present and future of the International wine industry*, «Nature», 418, pp 696-699.

- GARCIA-BENEYTEZ E., MORENO-ARRIBAS M.V., BORREGO J., POLO M.C., IBANEZ J.J. (2002): *Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of Vitis vinifera L. using microsatellite markers*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 50, pp. 6090-6096.
- LIJAVETZKY D., CABEZAS J.A., IBÁÑEZ A., RODRÍGUEZ V., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M. (2007): *High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (Vitis vinifera L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology*, «BMC Genomics», 8, pp. 424-434.
- MYLES S., CHIA J.-M., HURWITZ B., SIMON C., ZHONG GY. ET AL. (2010): *Rapid Genomic Characterization of the Genus Vitis*, «PLoS ONE» 5, e8219. doi:10.1371/journal.pone.0008219.
- MOISY C., GARRISON K.E., MEREDITH C.P., PELSY F. (2008): *Characterization of ten novel Ty1 copia-like retrotransposon families of the grapevine genome*, «BMC Genomics», 9, pp. 469-475.
- SAVAZZINI F., MARTINELLI L. (2006): *DNA Analysis in Wines: development of methods for enhanced extraction and real-time Polymerase Chain Reaction quantification*, «Analytica Chimica acta», 563, pp. 274-282.
- SCELLENBAUM P., MOHLER V., WENZEL G., WALTER B. (2008): *Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (Vitis vinifera L.)*, «BMC Plant Biology», 8, pp. 78-85.
- SIRET R., BOURSICQUOT J.M., MERLE M.H., CABANIS J.C., THIS P. (2000): *Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (Vitis vinifera L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 48, pp. 5035-5040.
- THIS P., JUNG A., BOCCACCI P., BORREGO J., BOTTA R., COSTANTINI L., CRESPIAN M., DANGL G.S., EISENHELD C., FERREIRA-MONTEIRO F., GRANDO M.S., IBÁÑEZ J., LACOMBE T., LAUCOU V., MAGALHÃES R., MEREDITH C.P., MILANI N., PETERLUNGER E., REGNER F., ZULINI L., MAUL E. (2004): *Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars*, «Theoretic and Applied Genetics», 109, pp. 1448-1458.
- VELASCO R., ZHARKIKH A., TROGGIO M., CARTWRIGHT D.A., CESTARO A. ET AL. (2007): *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*, «PLoS ONE», 7, pp. 1326-1330.
- VIGNANI R., MASI E., SCALI M., MILANESI C., SCALABRELLI G., WANG W., SENSI E., PAOLUCCI E., PERCOCO G., CRESTI M. (2008): *A critical evaluation of SSRs analysis applied to Tuscan grape (Vitis vinifera L.) germplasm*, «Advances in Horticultural Science», 22, pp. 33-37.
- VIGNANI R., WANG W., SCALI M., PAOLUCCI E., PECORARO L., PERCOCO G., CRESTI M. (2006): *SSR markers for Tuscan grapevine germplasm evaluation and wine traceability*, XIV Plant & Animal Genome XIV Conference, 14-18 Gennaio 2006, S. Diego California (USA), p. 152.
- VOUILLAMOZ J., GRANDO M.S. (2006): *Genealogy of wine grape cultivars: Pinot is related to Syrah*, «Heredity», 97, pp. 102-110.
- WALKER A.R., LEE E., ROBINSON S.P. (2006): *Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus*, «Plant Molecular Biology», 62, pp. 623-635.
- YAKUSHIJI H., KOBAYASHI S., GOTO-YAMAMOTO N., JEONG S.-T., SUETA T., MITANI N.,

AZUMA A. (2006): *A skin color mutation of grapevine, from black-skinned 'Pinot Noir' to white skinned 'Pinot Blanc' is caused by the deletion of the functional VvmybA1 allele*, «Bioscience, Biotechnology and Biochemistry», 70, pp. 1506-1508.

## Tracciabilità molecolare degli oli di oliva: dalla ricerca all'applicazione

### INTRODUZIONE

L'olio di oliva extra vergine, in virtù del suo elevato valore commerciale, è diventato il prodotto alimentare maggiormente sottoposto a sofisticazioni a livello europeo. Esso rappresenta un bersaglio d'elezione per adulterazioni e frodi che consistono nella miscelazione/sostituzione con oli di oliva di minor pregio od oli rettificati o deodorati, o nell'aggiunta/sostituzione fraudolenta con oli di specie oleaginose diverse da olivo, quali nocciolo, soia, colza, girasole o mais, per le quali sono ormai disponibili varietà cosiddette alto-oleico, in grado di mimare la composizione acidica dell'olio di oliva.

Per il controllo sulle miscele di oli di oliva sono stati sviluppati diversi metodi di analisi chimica e/o chimico-fisica in grado di evidenziare la presenza di oli estranei o di bassa qualità. Ma le metodologie in uso presentano limitazioni come, ad esempio, la difficoltà di risalire alla composizione varietale o rilevare la presenza di specie estranee a concentrazioni inferiori al 10%.

Recentemente, sulla base dell'enorme evoluzione subita dalle tecnologie di analisi del DNA, sono state sviluppate metodiche in grado di verificare la composizione delle materie prime utilizzate nelle preparazioni alimentari (rintracciabilità o DNA Tracking) e rilevare la presenza di componenti derivanti da specie o varietà diverse da quelle previste. Il DNA infatti è l'unica molecola in grado di caratterizzare in maniera inequivocabile specie e varietà diverse attraverso il confronto dei polimorfismi lungo il loro genoma, che possono essere messi in evidenza con l'analisi di piccoli frammenti caratteristici (marcatori molecolari). Queste metodologie di analisi, unite alla possibilità

\* CNR - Istituto di Genetica Vegetale, Perugia

di moltiplicare in vitro frammenti di DNA tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR), sono alla base della genetica forense (DNA fingerprinting) per l'identificazione dei colpevoli di reato sulla base del loro profilo di DNA.

Lo stesso approccio viene applicato alla rintracciabilità degli alimenti, siano essi freschi e/o sottoposti a trasformazione, utilizzando marcatori microsatellitari (SSR, Simple Sequence Repeats) o di altro tipo. Il DNA, infatti, può conservarsi inalterato anche durante le fasi di preparazione e conservazione degli alimenti e, pur rimanendo solo in tracce nei cibi e nei materiali organici, può essere comunque ri-amplificato in vitro e analizzato. L'applicazione di metodi analitici basati sul DNA Tracking può quindi consentire di risalire alla composizione genotipica di qualsiasi alimento o preparato alimentare per verificare l'aderenza ai disciplinari di produzione, stabilire la veridicità di quanto dichiarato in etichetta e rilevare la presenza di eventuali adulterazioni.

L'applicazione di queste metodologie agli oli d'oliva – extra vergini, vergini, DOP, IGP, monovarietali, blend, miscele tra oli vergini e rettificati – rappresenta uno strumento di analisi sicuro, che può fornire risultati incontrovertibili sulla natura dei componenti che hanno contribuito alla preparazione dell'olio. In considerazione della forte strutturazione geografica delle varietà, ancora fortemente legata ai diversi territori/regioni di produzione, l'identificazione delle varietà che hanno contribuito alla preparazione dell'olio potrà contribuire anche a risalire all'origine geografica degli oli stessi.

Le difficoltà per la caratterizzazione varietale derivano da molti fattori, legati soprattutto alla ricchezza del germoplasma ancora in coltivazione (Bartolini et al., 1998), alla diversa distribuzione delle varietà (varietà locali e varietà a larga diffusione), alla sopravvivenza di ecotipi locali, genotipi rari, impollinatori e olivi selvatici. Altri fattori che contribuiscono alla confusione sull'identità varietale sono la presenza di sinonimi (es. Frantoio-Raggiola-Correggiolo), omonimi (es. Ogliarola, Rosciola), toponimi (es. Nocellara del Belice, Bella di Cerignola) e morfonimi (es. Pendolino, Biancolilla), mentre ancora fortemente dibattuti sono i problemi relativi alla presenza di presunti varianti all'interno di ciascun clone e la presenza di virus o altri microrganismi asintomatici non patogeni.

La caratterizzazione molecolare ha risolto molti problemi di identificazione delle varietà di olivo, ma i dati ottenuti nei diversi laboratori dovrebbero avere un protocollo di analisi comune e un'autorità nazionale di riferimento che certifichi l'identità del materiale analizzato e usato come genotipo di riferimento.

Il Progetto Interregionale OLVIVA attualmente in corso ha rappresentato il primo tentativo di definizione di un metodo di fingerprinting applicabile a livello nazionale per la certificazione genetica del materiale di propagazione



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

La rintracciabilità molecolare può consentire di: i) determinare la composizione varietale degli oli di oliva extra vergine, ii) valutare la presenza di oli da varietà estranee a quelle dichiarate, e iii) verificare la presenza di oli di specie diverse da olivo (nocciolo, mais, girasole, soia, ecc.).

L'analisi molecolare delle tracce di DNA nell'olio rappresenta un complemento alle analisi chimiche e alla tracciabilità documentale di filiera e l'unico modo per l'identificazione certa della composizione varietale degli oli.

Presupposto necessario per applicare la tracciabilità molecolare agli oli di oliva è la conservazione del DNA nell'olio per tempi ragionevolmente lunghi (1-2 anni). È stato osservato che, pur degradandosi progressivamente, frammenti di DNA rimangono in sospensione nel mezzo (Spaniolas et al., 2008) e i processi di rettificazione non distruggono completamente il DNA.

La procedura di rintracciabilità molecolare prevede: i) lo sviluppo di metodi di estrazione di DNA da matrice oleosa; ii) l'identificazione di marcatori nucleari o plastidiali delle varietà di olivo e delle specie oleaginose diverse da olivo; iii) la verifica della funzionalità del metodo su oli costruiti sperimentalmente; e infine iv) l'applicazione dell'analisi molecolare agli oli commerciali.

I marcatori molecolari usati per la caratterizzazione delle cultivar sono poco adatti per la rintracciabilità perché negli oli si ha solitamente una bassa amplificazione del segnale, la presenza di picchi aspecifici e il rischio di contaminazione da DNA degli impollinatori (Breton et al., 2004; Consolandi et al., 2008). Poiché il DNA contenuto in tracce nell'olio è fortemente degradato (frammenti molto corti) occorrono marcatori con profili semplici e varietà-specifici. Per la rintracciabilità degli oli i marcatori plastidiali presentano alcuni vantaggi rispetto ai marcatori nucleari, quali: i) aumento della probabilità di rinvenire tracce di DNA nell'olio in conseguenza dell'elevato numero di cloroplasti e quindi di molecole di DNA plastidiale per cellula, ii) eliminazione del rischio di contaminazione da parte degli impollinatori in conseguenza dell'origine materna dei cloroplasti, iii) semplificazione dei profili molecolari in virtù del fatto che i cloroplasti hanno un genoma aploide (una sola versione del marcatore e non due come nel caso del DNA nucleare).

Allo scopo di identificare nuovi marcatori plastidiali di olivo è stato sequenziato il genoma del cloroplasto di olivo, varietà Frantoio, che ha consentito di identificare 30 nuovi marcatori plastidiali (Mariotti et al., 2010).

#### DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DI RICERCA IN CORSO

Il CNR-IGV di Perugia ha acquisito competenze specifiche in questo ambito di ricerca, con particolare attenzione ai seguenti aspetti:

- sviluppo di metodi di estrazione di DNA da matrice oleosa;
- identificazione di marcatori per discriminare oli di specie diverse contenuti in olio di oliva;
- identificazione di marcatori molecolari per risalire alla composizione varietale degli oli di oliva.

#### *Sviluppo di metodi di estrazione di DNA da matrice oleosa*

I kit commerciali per l'estrazione di DNA da pianta o da alimenti hanno rivelato bassa resa, ridotta amplificabilità in PCR del DNA e scarsa riproducibilità dei risultati.

È stato messo a punto un protocollo per l'estrazione di DNA da matrice oleosa di buona qualità e facilmente amplificabile. Il protocollo consta di diverse fasi che comportano: 1) il trattamento dell'olio con solventi organici a freddo; 2) l'allontanamento della frazione proteica; 3) la precipitazione e lavaggio del DNA in isopropanolo e alcool etilico; 4) la risospensione e conservazione del DNA. Il metodo di estrazione risulta particolarmente efficace per la rapidità di esecuzione (circa 2 ore), il basso costo dei reagenti e la buona qualità e amplificabilità del DNA ottenuto.

#### *Identificazione di marcatori per discriminare la presenza di altre specie oleaginose negli oli di oliva*

Sono state individuate zone polimorfiche per SNP, SSR e/o indel in regioni inter-geniche e codificanti del genoma del cloroplasto in grado di distinguere alcune specie tra loro e con olivo (olivo, mais e nocciolo). Tali marcatori sono stati impiegati su DNA estratto da miscele tra olio di oliva e olio di nocciola (*Corylus avellana*) nelle proporzioni 90/10 e 99/1 in PCR Quantitativa,

consentendo di rilevare, con massima riproducibilità, la presenza di olio di nocciola fino a percentuali minime dell'1%.

### *Identificazione di marcatori molecolari per risalire alla composizione varietale degli oli di oliva*

Per la discriminazione tra varietà di olivo sono stati identificati 30 nuovi marcatori plastidiali (Mariotti et al., 2010) che, uniti ai 10 identificati in precedenza (Besnard et al., 2003), potranno consentire di distinguere in modo univoco molte delle varietà più utilizzate in olivicoltura.

Per identificarle tutte o almeno per avere certezza statistica delle differenze sono tuttavia necessari anche altri marcatori basati su mutazioni del singolo nucleotide (SNP) del DNA genomico (Reale et al., 2006). Per questa ragione è in corso la prospezione di geni candidati, nel tentativo di identificare marcatori in grado di distinguere le più importanti varietà italiane, mentre attenzione particolare è rivolta alla possibilità di discriminare le varietà spagnole Picual, Hojiblanca e Arbequina e greche (koroneiki) di gran lunga le più diffuse commercialmente e maggiormente impiegate nelle miscele fraudolente con oli italiani.

### *Attività in corso*

Occorre ancora continuare a lavorare per identificare il maggior numero di marker in grado di discriminare in modo univoco le varietà italiane e quelle più importanti dei paesi da cui si importa, per testare metodi di diagnosi alternativi e più sensibili (PNA, microfluidica, ecc.) per aumentare il segnale dalle tracce di DNA estratto dagli oli, per stabilire la soglia minima di sensibilità del metodo, risalire alle percentuali di composizione delle miscele tra più varietà e sviluppare piattaforme diagnostiche altamente sensibili.

Sono in corso di deposito i brevetti sul metodo di estrazione di DNA da matrice oleosa e per la determinazione della presenza di olio di nocciola negli oli di oliva mediante impiego di marcatori molecolari.

### POTENZIALITÀ APPLICATIVE

Allo stato attuale delle conoscenze e delle tecniche molecolari l'analisi delle tracce di DNA contenute nella matrice oleosa degli oli extra vergine rappre-

senta un metodo molto efficace che consente di risalire all'origine varietale degli oli e smascherare l'eventuale presenza di oli di altre specie.

L'attività svolta presso il CNR-IGV di Perugia ha consentito di mettere a punto un protocollo di facile applicazione per l'estrazione delle tracce di DNA contenute negli oli di oliva.

Per estendere l'applicabilità del metodo occorre ampliare la gamma dei marcatori a disposizione e stabilire le percentuali di composizione delle miscele tra più varietà.

Queste tecnologie potranno trovare utile applicazione per l'accertamento dell'identità delle materie prime da parte delle industrie di trasformazione e di imbottigliamento e per le aziende della GDO, così come per il controllo delle frodi da parte delle agenzie di controllo.

#### RINGRAZIAMENTI

Oltre al CNR-Istituto di Genetica Vegetale di Perugia, hanno collaborato a queste attività altre istituzioni di ricerca, tra le quali: il Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università di Parma, il Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti dell'Università di Perugia, il Dipartimento di Controllo Qualità (Ex Repressione Frodi) – MIPAF e il CRA - Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (Cosenza).

#### RIASSUNTO

Sono state recentemente sviluppate metodologie di rintracciabilità molecolare in grado di verificare la composizione delle materie prime utilizzate nelle preparazioni alimentari e rilevare la presenza di componenti estranee derivanti da specie o varietà diverse da quelle previste.

L'impiego di queste metodologie agli oli d'oliva di tutte le tipologie rappresenta uno strumento di analisi sicuro e in grado di fornire risultati incontrovertibili sulla natura dei componenti che hanno contribuito alla preparazione dell'olio.

A tal fine sono stati messi a punto i metodi di estrazione di DNA da matrice oleosa e sono stati sviluppati i marcatori molecolari in grado di discriminare l'olio di oliva da oli di altre specie, mentre sono ancora in corso gli studi per l'identificazione dei marcatori in grado di distinguere le diverse varietà di olivo.

#### ABSTRACT

The recent advances of food DNA fingerprinting methodologies make possible to verify

the composition of food products and trace back to the raw material used for their preparation, detecting the presence of deliberate or accidental adulterations.

To guarantee the composition of high quality olive oils and to protect consumers against possible frauds, appropriate methods are being developed, able to verify the authenticity of olive oils and detect possible adulterations.

At present, new methods of DNA extraction from oil matrices have been developed and new molecular markers have been identified, able to discriminate oils deriving from different species, while variety-specific markers are still under analysis by the use of, either, chloroplast and nuclear polymorphisms.

#### BIBLIOGRAFIA

- BALDONI L., CULTRERA N.G.M., MARIOTTI R., RICCIOLINI C., ARCIONI S., VENDRAMIN G.G., BUONAMICI A., PORCEDDU A., SARRI V., OJEDA M.A., TRUJILLO I., RALLO L., BELAJ A., PERRI E., SALIMONTI A., MUZZALUPO I., CASAGRANDE A., LAIN O., MESSINA R., TESTOLIN R. (2009): *A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping*, «Molecular Breeding», 24 (3), pp. 213-231.
- BARTOLINI G., PREVOST G., MESSERI C., CARIGNANI G., MENINI U. (1998): *Olive germplasm: Cultivars and world-wide collections*, FAO, Roma.
- BESNARD G., RUBIO DE CASAS R., VARGAS P. (2003): *A set of primers for length and nucleotide-substitution polymorphism in chloroplastic DNA of Olea europaea L. (Oleaceae)*, «Molecular Ecology Notes», 3, pp. 651-653.
- BRETON C., CLAUX D., METTON I., SKORSKI G., BERVILLÉ A. (2004): *Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 52 (3), pp. 531-537.
- CONSOLANDI C., PALMIERI L., SEVERGNINI M., MAESTRI E., MARMIROLI N., AGRIMONTI C., BALDONI L., DONINI P., DE BELLIS G., CASTIGLIONI B. (2008): *A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, Multiplex PCR and LDR-Universal Array analysis*, «European Food Research & Technology», 227, pp. 1429-1438.
- MARIOTTI R., CULTRERA N.G.M., MUÑOZ DÍEZ C., BALDONI L., RUBINI A. (2010): *Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives (Olea europaea L.) through plastome sequence comparison*, «BMC Plant Biology», 10, pp. 211.
- REALE S., DOVERI, S., DIAZ A., ANGIOLILLO A., LUCENTINI L., PILLA F., MARTIN A., DONINI P., LEE D. (2006): *SNP-based markers for discriminating olive (Olea europaea L.) cultivars*, «Genome», 49, pp. 1193-1205.
- SPANIOLAS S., BAZAKOS C., NTOUROU T., BIHMIDINE S., GEORGIOUSAKIS A., KALAITZIS P. (2008): *Use of lambda DNA as a marker to assess DNA stability in olive oil during storage*, «European Food Research & Technology», 227, pp. 175-179.



SERGIO LANTERI\*, EZIO PORTIS\*, ALBERTO ACQUADRO\*, CINZIA COMINO\*, GIOVANNI MAUROMICALE\*\*, ROSARIO MAURO\*\*, SARA LOMBARDO\*\*, MARIA CADINU\*\*\*, GIAN MARIO MALLICA\*\*\*, LIMBO BAGHINO\*\*\*

## Dal DNA alla tavola: valorizzazione e tracciabilità della filiera carciofo

*Cynara cardunculus* L. ( $2n=2x=34$ ) appartiene alla famiglia delle *Asteraceae* (ex *Compositae*) e include il carciofo (var. *scolymus* L.), il cardo coltivato (var. *altilis* DC.) e il cardo selvatico [var. *sylvestris* (Lamk) Fiori]. Le tre varietà botaniche sono sessualmente compatibili e i loro ibridi sono fertili. Il cardo selvatico è considerato il progenitore di entrambe le forme coltivate, che sono il risultato dell'applicazione di criteri di selezione volti a incrementare la dimensione e produzione di capolini in carciofo o di steli carnosì in cardo (Lanteri et al., 2004a).

In base a dati FAO relativi al triennio 2005-2007, il 70% della superficie mondiale investita a carciofo (127.000 ha) è concentrata nel Bacino del Mediterraneo.

L'Italia, con una superficie coltivata di circa 50.000 ha e una produzione stimata di circa 500.000 t, è il maggior produttore mondiale (circa il 40%), seguito da Spagna, Francia, Egitto, Algeria, Marocco, Grecia, Turchia e Tunisia. Di particolare rilievo è la crescente diffusione della coltura in Paesi quali Cina, Argentina, Perù e Cile (tab. 1, fig. 1).

La superficie cinaricola italiana è concentrata nelle regioni centro-meridionali e insulari, e in particolare in Puglia, Sicilia, Sardegna, Campania, Lazio e Toscana (fig. 2). Circa l'89% della produzione è destinata al consumo allo stato fresco, mentre il restante 11% viene utilizzato dall'industria di trasformazione. A fronte di una limitata esportazione, per lo più nei Paesi del nord Europa (circa il 2% della produzione totale), negli ultimi anni si è verificato

\* DIVAPRA - Genetica Agraria, Università di Torino

\*\* DACPA - Scienze Agronomiche, Università di Catania

\*\*\* AGRIS SARDEGNA – Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni vegetali

PAESE	SUPERFICI COLTIVATE (HA)	PRODUZIONI AREICHE (t/HA)	PRODUZIONI COMPLESSIVE (t)
ITALIA	50.210	9,4	471.074
SPAGNA	19.931	10,4	206.712
FRANCIA	10.324	5,1	52.891
CINA	10.000	6,0	60.000
ARGENTINA	4.633	19,1	88.667
PERÙ	4.328	16,0	69.461
CILE	4.267	7,7	33.000
EGITTO	3.633	19,6	71.333
ALGERIA	2.448	13,5	33.042
MAROCCO	3.375	15,8	53.465
GRECIA	2.803	11,4	31.910
TURCHIA	2.800	12,6	35.157
TUNISIA	2.227	7,0	15.667
MONDO	127.117	10,2	1.292.360

Tab. 1 Superfici, produzioni areiche e produzioni complessive dei principali Paesi cinaricoli (FAO 2009, media del triennio 2005-2007)

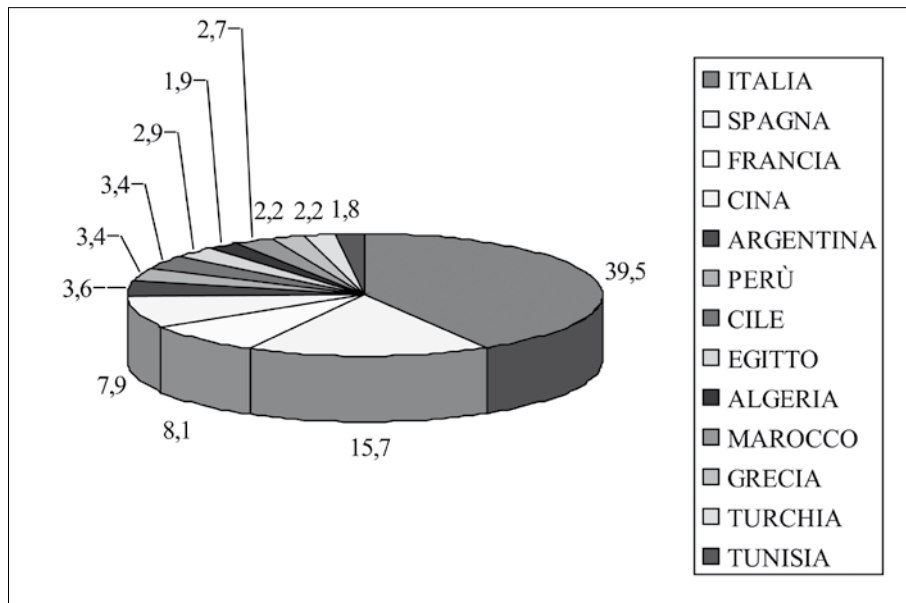


Fig. 1 Ripartizione percentuale delle superfici cinaricole relative ai principali Paesi cinaricoli (FAO 2009, media del triennio 2005-2007)



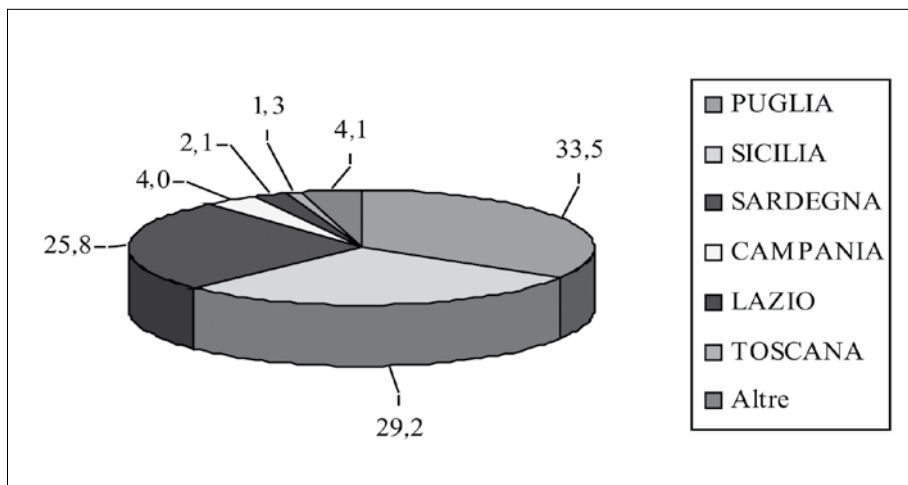


Fig. 2 Ripartizione percentuale delle superfici cinaricole relative alle principali regioni cinaricole italiane (ISTAT 2009, media del triennio 2006-2008)

un progressivo incremento delle importazioni dalla Spagna (5000 t anno<sup>-1</sup>) e dai Paesi del nord Africa (circa 8.000 t anno<sup>-1</sup>), in particolare dall'Egitto, il cui prodotto arriva sul mercato italiano verso la fine dell'anno, in concomitanza con quello pugliese, siciliano e sardo.

La limitata esportazione e il progressivo incremento delle importazioni sono principalmente da imputarsi alla scarsa promozione e valorizzazione commerciale del prodotto italiano, spesso venduto in mazzi o alla rinfusa dopo una cernita grossolana dei capolini, nonché della inefficiente catena di distribuzione.

Esistono, pertanto, valide motivazioni per la valorizzazione della filiera carciofo e per lo sviluppo di tecniche di analisi molecolari finalizzate alla tracciabilità lungo la filiera produttiva.

#### RISORSE GENETICHE

In Italia è presente un ampio germoplasma primario, che si concretizza nella coltivazione di una moltitudine di tipi varietali ed ecotipi, spesso adattati a peculiari condizioni pedo-climatiche e gusti locali. Tale germoplasma è classificato in base a due principali criteri: l'epoca di produzione e le caratteristiche morfologiche dei capolini (Abbate et al., 2006). In base all'epoca di raccolta si distinguono varietà a produzione autunnale e varietà a produzione primaver-



Fig. 3 Capolini di carciofo dei tipi varietali: (a) 'Violetto', (b) 'Romanesco clone C3' (c) 'Spinoso' e (d) 'Catanese'

le. Le prime, dette anche “precoci” o “rifiorenti”, assicurano una produzione pressoché continua tra l’autunno e la primavera, e comprendono il *Violetto di Sicilia* con le varie forme a esso ascrivibili (*Masedu*, *Molese*, ecc.), lo *Spinoso Sardo*, il *Violetto Spinoso di Palermo*, il *Violet de Provence*, il *Tema 2000*, il *Violet Margot*, la *Blanca de Tudela*. Le seconde, indicate anche come “non rifiorenti” o “tardive”, forniscono produzioni solo primaverili (tra marzo e giugno) e includono i tipi *Romaneschi* e il *Violetto di Toscana*, diffusi in Campania, Lazio e Toscana, *Camus de Bretagne*, *Blanc Hyérois* e tutte le cultivar propagate per “seme”.

Sulla base delle caratteristiche del capolino, il germoplasma di carciofo è stato invece classificato in quattro gruppi principali (Porceddu et al., 1976) riportati in figura 3: (i) “Spinosi” comprendente tipi varietali con spine lunghe e acuminate presenti sia sulle brattee che sulle foglie (*Violetto Spinoso di Palermo*, *Spinoso Sardo*, *Spinoso di Albenga*, ecc.); (ii) “Violetti” comprendente tipi varietali che producono capolini di medie dimensioni e caratterizzate da pig-

mentazione più o meno diffusa (*Violetto di Toscana*, *Violetto di Chioggia*, *Nostrano*, *Violetto di Pesaro*, ecc.); (iii) “Romaneschi” comprendente tipi varietali con capolini sferici o sub-sferici (*Campagnano*, *Castellammare*, *Tondo di Paestum*, *Camard*, *Blanc Hyérois*, *Camus de Brétagne*, ecc.), (iv), “Catanesi” caratterizzati da capolini allungati di medie dimensioni (*Violetto di Sicilia*, *Violetto di Provenza*, ecc.) (Mauromicale e Ierna, 2000). Tale classificazione è stata confermata a seguito di analisi di polimorfismi a carico del DNA in un’ampia collezione di germoplasma rappresentativa della variabilità genetica del materiale attualmente in coltivazione nel mondo, che ha evidenziato come la selezione operata dall’uomo per le diverse caratteristiche del capolino abbia causato una differenziazione genetica nell’ambito dei diversi tipi varietali (Lanteri et al., 2004a).

Le tipologie varietali oggi coltivate in Italia sono in prevalenza propagate per via vegetativa, allo scopo di evitare l’ampia segregazione osservata a seguito di propagazione ‘via seme’. Gli organi più diffusi per l’impianto della carciofaia sono il carduccio (germoglio laterale in piena attività vegetativa), l’ovolo (ramificazione sotterranea quiescente, di forma cilindrica, inserita sulla frazione basale della ceppaia) e porzioni di ceppaia (frazione basale del fusto provvista di grosse gemme quiescenti, formatesi nella stagione precedente). La propagazione vegetativa comporta una serie di inconvenienti, tra i quali: (i) eterogeneità fisiologica degli organi di moltiplicazione, che determina una marcata variabilità morfologica e biologica delle piante; (ii) basso coefficiente di moltiplicazione annuo, che rallenta significativamente la diffusione di nuove cultivar; (iii) elevati costi per l’impianto della carciofaia a causa della ridotta possibilità di meccanizzazione; (iv) diffusione di patogeni, e in particolare di virosi. Presumibilmente, sia a causa della scarsa selezione applicata nei confronti delle piante madri utilizzate per ottenere materiale di propagazione, che di eventi mutazionali accumulatisi nel tempo, le popolazioni locali hanno composizione multiclonale e manifestano al loro interno un’ampia variabilità genetica (Lanteri et al., 2001; Portis et al., 2005a).

Negli ultimi anni si è assistito a una forte innovazione nel settore varietale con l’introduzione, in alcune aree, di nuovi tipi a propagazione vegetativa, quali *Violetto di Provenza*, *Romanesco clone C3*, *Apollo*, *Terom* e *Tema 2000*, nonché alla diffusione di varietà propagate per seme quali *Opal*, *Tempo*, *Concerto*, *Madrigal*, *Harmony*, ecc. Ciò, se da una parte, consente una più efficace articolazione dei calendari di produzione e una più variegata offerta di prodotto con caratteristiche qualitative differenziate e in grado di meglio soddisfare esigenze dei mercati, dall’altra causa mescolanze di tipi varietali con conseguente erosione genetica e perdita irreversibile di materiale autoctono di pregio (Portis et al., 2005a).

## CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI

L'attuale interesse del consumatore nei confronti di alimenti "funzionali", per il loro benefico effetto sulla salute umana, ha stimolato l'interesse da parte sia della comunità scientifica che del settore industriale (alimentare e non) nei confronti del carciofo, in quanto dotato di riconosciute e diversificate proprietà terapeutiche. Il carciofo è infatti particolarmente ricco di composti antiossidanti che prevengono danni, causati da radicali liberi, nei confronti di molecole biologiche (proteine, lipidi e DNA), esercitano un'azione epatoprotettiva e coleretica (Gebhardt, 1996) e possono contribuire alla prevenzione di patologie vascolari quali l'arteriosclerosi (Pittler e Ernst, 1998; Brown, 1998; Rice-Evans, 1997). Tali proprietà terapeutiche sono riconducibili alla presenza di composti con spiccata attività antiossidante derivanti dal metabolismo dei fenilpropanoidi quali: i flavonoidi (apigenina e luteolina) e, in particolare, gli acidi mono e di-caffeoilchinici (tab. 2 – Lattanzio et al., 2009; Lombardo et al., 2010; Pandino et al., 2010a e b). Estratti di carciofo hanno evidenziato la capacità di inibire la biosintesi di colesterolo in colture cellulari di epatociti di ratto e diversi autori riferiscono anche di un'azione antitumorale riconducibile a sostanze fenoliche (Kosar et al., 2004; Papadopoulou e Frazier, 2004); inoltre, studi recenti indicano che alcuni composti presenti in carciofo esercitano un'attività inibitoria sulla HIV-integrasi, enzima che regola una tappa essenziale della replicazione dell'HIV e della integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite (Slanina et al., 2001).

Il carciofo è anche un'ottima fonte di inulina (Lattanzio et al., 2009), polisaccaride di riserva estraibile dalle radici e dai ricettacoli. L'inulina costituisce circa il 70-80% degli zuccheri totali della pianta, è un polimero a lunga

DERIVATI DELL'ACIDO CAFFEUILCHINICO	MG/ 100G DI PESO SECCO
Acido 1- <i>O</i> -Caffeoilchinico	38,14
Acido 3- <i>O</i> -Caffeoilchinico	57,22
Acido 4- <i>O</i> -Caffeoilchinico	267,02
Acido 5- <i>O</i> -Caffeoilchinico	1544,91
Acido 1,3- <i>O</i> -Dicaffeoilchinico	61,24
Acido 1,4- <i>O</i> -Dicaffeoilchinico	142,91
Acido 4,5- <i>O</i> -Dicaffeoilchinico	224,56
Acido 3,5- <i>O</i> -Dicaffeoilchinico	347,05
Acido 1,5- <i>O</i> -Dicaffeoilchinico	837,01
Acido 3,4- <i>O</i> -Dicaffeoilchinico	428,71

Tab. 2 *Acidi mono- e dicaffeoilchinici in capolini di carciofo di qualità commerciale (da Lattanzio et al., 2009)*

catena del fruttosio (fruttano) e si trova come sostanza di riserva in molte specie vegetali della famiglia delle *Compositae*. Essa rappresenta un valido sostituto del saccarosio, sia come dolcificante, sia come additivo e conservante per bibite, dolci, sciroppi e nei prodotti *light food* o *health food*. Il fruttosio è, infatti, dotato di un potere dolcificante superiore al saccarosio, ma con un potere calorico notevolmente inferiore, per cui risulta adatto anche alle diete ipocaloriche per diabetici. All'inulina, e ai fruttani in generale, sono inoltre riconosciute attività prebiotiche, giacché attivano nel colon umano i batteri del genere *Bifidus*, la cui presenza permette l'istaurarsi delle condizioni ottimali di acidità necessarie per l'inibizione di batteri nocivi. Infine, è stato dimostrato come l'inulina sia in grado di ridurre il tasso di colesterolo e di trigliceridi nel sangue e di contrastare l'aumento della glicemia (Lattanzio et al., 2009).

#### UTILIZZO PER L'ALIMENTAZIONE

I capolini di carciofo sono per lo più destinati al consumo allo stato fresco, o mondati e pronti all'uso (prodotti della IV gamma). È tuttavia in aumento la quota sia di infiorescenze che di steli destinati all'industria conserviera di II gamma, come prodotto sott'olio, in salamoia acidulata o come purea o crema (Bianco, 1990) e di III gamma, cioè come prodotto surgelato. L'evoluzione delle abitudini alimentari nei Paesi industrializzati e la riduzione del tempo disponibile per la preparazione dei pasti negli ultimi anni hanno incrementato la domanda di prodotto di V gamma, cioè di pronto consumo in quanto sottoposto a cottura (lessatura o grigliatura), confezionamento e successiva commercializzazione con catena del freddo.

#### FORME ALTERNATIVE DI UTILIZZO

Oltre che per l'alimentazione umana il carciofo ha un ampio numero di utilizzi per:

- produzione di biomassa verde, ottenuta dallo sfalcio delle piante prima della formazione dello stelo florale, per l'alimentazione del bestiame;
- produzione di biomassa per produzione di energia (termica e/o elettrica);
- estrazione dagli acheni di olio alimentare, dotato di un rapporto bilanciato tra acidi grassi insaturi e saturi (pari a circa 17 : 3) e privo di acido erucico;

- estrazione di fibra per la produzione di pasta di cellulosa, caratterizzata da buone caratteristiche meccaniche (resistenza alla piegatura, elevati indici di tensione e di strappo);
- estrazione dai floscoli di enzimi ad attività caseolitica, utilizzati per la produzione di formaggi tipici;
- estrazione dalle diverse parti della pianta di sostanze bioattive (polifenoli e inulina).
- utilizzo della pianta intera e/o delle sue parti a scopo ornamentale.

#### TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DELLA FILIERA CARCIOFO

La creazione di marchi di qualità da parte dell'Unione Europea, quali DOP e IGP, si è rivelata un utile strumento per proteggere la tipicità dei prodotti alimentari e rivitalizzare alcuni comparti produttivi che includono produzioni tradizionali di pregio. La Denominazione di Origine Protetta (DOP) si riferisce a un prodotto originario di un paese e di una regione caratterizzato da una qualità essenzialmente o esclusivamente dovuta all'areale geografico, inclusi i fattori naturali e umani che lo caratterizzano. Il marchio IGP (Indicazione Geografica Protetta) introduce nella tutela della qualità l'aspetto industriale della sua produzione, dando maggiore rilevanza alle tecniche di produzione rispetto al vincolo territoriale (Rao et al., 2009).

Con il termine di tracciabilità si intende quindi il processo informativo che segue il prodotto da monte a valle della filiera produttiva; mentre per rintracciabilità si intende il processo inverso che permette di risalire da valle a monte le informazioni distribuite lungo la filiera. A partire dal gennaio 2005 è divenuta obbligatoria per tutte le aziende agro-alimentari la tracciabilità di un alimento, definita come “la capacità di rintracciare e seguire un alimento, un mangime, un animale produttore di alimenti o una sostanza attraverso tutti gli stadi della produzione e della distribuzione” (Direttiva Europea 2000/13/CE e Regolamento Europeo 178/2002). È nata pertanto l'esigenza di avvalersi di strumenti di valutazione sicuri, e tra questi indubbiamente hanno un ruolo importante le tecniche di analisi molecolare del DNA (marcatori molecolari). Tali tecniche rappresentano un efficiente strumento di identificazione varietale e offrono una maggiore affidabilità rispetto a metodi tradizionali basati sulla valutazione di caratteri morfologici, soggetti all'influenza delle condizioni ambientali e utilizzabili solo su materiali non processati. I marcatori molecolari, infatti, non subiscono interferenze da parte dell'ambiente e permettono una identifi-

cazione inequivocabile anche a partire da DNA estratto da alimenti, consentendo pertanto l'identificazione genetica delle materie prime utilizzate nelle filiere agroalimentari (Martinez et al., 2003). Nel caso specifico del carciofo il processo di trasformazione industriale di norma non è tale da richiedere particolari protocolli per ottenere DNA di qualità e in quantità sufficiente da consentire di essere analizzato mediante applicazioni di tecniche di analisi ormai standardizzate. Queste, pertanto, rappresentano uno strumento rapido e sicuro per l'identificazione varietale del materiale fresco e la tracciabilità di prodotti ottenuti a seguito di trasformazione industriale.

Il numero di tecniche di analisi del DNA oggi disponibili è molto ampio. La tecnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ha dimostrato di essere un valido strumento per il *fingerprinting* di cloni selezionati della tipologia 'Spinoso sardo' (Lanteri et al., 2004b) e di cloni risanati da virus della tipologia 'Brindisino' (Acquadro et al., 2010). Tuttavia le due classi di marcatori molecolari che hanno dimostrato di essere particolarmente utili per la tracciare la filiera agro-alimentare sono gli SSR (*Simple Sequence Repeats*) o microsatelliti e gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), in quanto applicabili anche per l'analisi di DNA frammentato o danneggiato, quale quello presente in prodotti che hanno subito un più o meno marcato processo di trasformazione (Rao et al., 2009). Gli SSR, marcatori di elezione per i test di paternità e studi forensi, sono tra i più utili e affidabili marcatori molecolari del DNA. Tali marcatori sono specie-specifici, caratterizzati da elevati livelli di polimorfismo dovuto alle variazioni del numero delle ripetizioni, codominanti, presenti in zone espresse e non del genoma, analizzabili mediante tecniche automatizzate, e applicabili anche su campioni di DNA frammentato o parzialmente degradato, un requisito cruciale per l'analisi di alimenti sottoposti a elevate temperature durante i processi produttivi e/o a forti trattamenti meccanici. Molte di queste caratteristiche sono anche comuni ai marcatori SNP, che sono la forma più comune di variazione genomica tra individui della stessa specie e stanno diventando il sistema d'elezione dei breeder vegetali per il miglioramento genetico e per l'identificazione varietale (*fingerprinting* molecolare) finalizzata alla tracciabilità/rintracciabilità delle varietà di pregio. I marcatori SNP permettono di evidenziare differenze di sequenza nel genoma causate da mutazioni puntiformi, cioè sostituzioni e/o inserzioni e delezioni di un singolo nucleotide e sono presenti in numero estremamente elevato nel genoma.

SVILUPPO E APPLICAZIONE DI MARCATORI MOLECOLARI  
PER L'ANALISI DEL GENOMA DI CARCIOFO

Presso il settore Genetica Agraria del DIVAPRA (Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agro-forestali - Università degli Studi di Torino), da più di un decennio sono in corso attività di ricerca finalizzate allo sviluppo e applicazione di marcatori molecolari per l'analisi del genoma di *C. cardunculus*, la cui dimensione (1C) è stata stimata in 1078 Mb. Tali tecniche sono state utilizzate, in collaborazione con il DACPA (Dipartimento di Scienze Agronomiche - Università di Catania) e l'AGRIS SARDEGNA (Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Vegetali), per quantificare la variabilità genetica presente nel materiale in coltivazione (Lanteri et al., 2001; Portis et al., 2005a), caratterizzare collezioni di germoplasma (Lanteri et al., 2004a; Portis et al., 2005b), nonché per lo sviluppo di mappe genetiche molecolari della specie.

La prima mappa genetica di *C. cardunculus*, basata sulla strategia del two-way pseudo-test cross, è stata sviluppata da Lanteri et al. (2006) a partire da una progenie F<sub>1</sub> ottenuta dall'incrocio di due genotipi di carciofo: *Romanesco clone C3* (tipo varietale tardivo e non spinoso), utilizzato come portaseme, e *Spinoso di Palermo* (tipo varietale precoce e spinoso). Tale mappa è stata successivamente integrata con l'inclusione di un ampio numero di marcatori SSR (Acquadro et al., 2009). Gli stessi autori hanno in tempi più recenti sviluppato ulteriori mappe basate sull'incrocio dello stesso parentale femminile con un genotipo di cardo coltivato (*Altilis 41*), successivamente allineate con quelle precedenti allo scopo di sviluppare una 'reference map' della specie (Portis et al., 2009). La saturazione della mappa con un ampio set di marcatori microsatellite e SNP è in fase di realizzazione.

Di seguito sono brevemente illustrati i risultati a tutt'oggi ottenuti presso il settore di Genetica Agraria del DIVAPRA nello sviluppo delle due classi di marcatori (SSR e SNP) che, come detto in precedenza, possono trovare un ampio impiego per la tracciabilità della filiera carciofo.

## MARCATORI MICROSATELLITE

Mediante diverse strategie è stato inizialmente sviluppato un set di 32 microsatelliti (Acquadro et al., 2003; 2005a; 2005b). Successivamente, 61 marcatori SSR (denominati "CELMS" - *Cynara Enriched Library MicroSatellite*) sono stati isolati mediante la costruzione di una libreria genomica arricchita



(Acquadro et al., 2009) e di questi circa la metà sono stati posizionati sulle mappe genetiche precedentemente sviluppate.

Nel 2008 è stato reso disponibile dal consorzio *Compositae Genome Project* (CGP, USA) un ampio numero di sequenze EST (*Expressed Sequenced Tag*), depositate presso il database NCBI. Ciò ha consentito, a partire da più di 36.000 sequenze EST, di identificare 4.210 sequenze microsatellite in 3.308 *unigene*, escludendo le sequenze mononucleotidiche (Scaglione et al., 2009). Nell'ambito di queste, 2.311 presentavano regioni fiancheggianti di dimensioni tali da permettere il disegno di coppie di primer specifici (CyEMs, *Cynara Expressed Microsatellites*). Trecento dei nuovi marcatori SSR sviluppati sono stati saggiati per il livello di polimorfismo, cioè la capacità di evidenziare differenze a carico del DNA, su un *panel* di 24 genotipi rappresentativi della variabilità genetica presente nell'ambito della specie *C. cardunculus*. È in corso di svolgimento il posizionamento di parte di questi SSR nelle mappe genetiche precedentemente sviluppate (Portis et al., 2009).

#### MARCATORI SNP

A tutt'oggi sono stati isolati, e in alcuni casi caratterizzati funzionalmente 'in vitro', i geni che in *C. cardunculus* sono coinvolti nella biosintesi dell'acido clorogenico, cioè dell'acido monocaffeoilchinico presente in maggior quantità nei tessuti e organi della pianta (tab. 2). In particolare, sono stati isolati tre geni che codificano per tre isoforme dell'enzima PAL (fenilalanina ammonio-liasi) (De Paolis et al., 2008) e, presso il settore di Genetica Agraria del DIVAPRA, è stata ottenuta la sequenza completa di due transferasi (HCT e HQT: idrossicinnamoil-transferasi), di due idrossilasi (C3'H: cumarato 3' idrossilasi e C4H: cumarato 4' idrossilasi) e di una ligasi (4CL: 4-cumarato - coenzima A ligasi) (Comino et al., 2007; 2009; Moglia et al., 2009; Menin et al., 2010). Viceversa, il pathway metabolico che porta alla sintesi degli acidi dicaffeoilchinici è a tutt'oggi oggetto di dibattito scientifico (Villegas e Kojima, 1986; Hoffmann et al., 2003; Niggeweg et al., 2004).

Le diverse forme alleliche dei geni isolati sono state sequenziate nei parentali delle progenie di mappa e ciò ne ha consentito, dopo la conversione in marcatori basati su analisi PCR, la localizzazione nella mappa genetica della specie. Poiché il contenuto di polifenoli nelle parti eduli del carciofo varia considerevolmente a seconda del tipo varietale, i marcatori SNP identificati hanno la potenzialità di essere sfruttati per la tracciabilità di varietà a più elevato contenuto di molecole bioattive.

Negli ultimi anni, lo sviluppo delle piattaforme di sequenziamento di seconda generazione (*high parallel sequencing* o *Next Generation Sequencing - NGS*) ha permesso l'adozione di nuove strategie per l'identificazione di SNP. Esse consistono nel sequenziamento di porzioni di genoma o di librerie di cDNA al fine di identificare variazioni puntiformi a livello genomico/trascrittomico.

Recentemente è stata messa a punto una *pipeline* di sequenziamento genomico allo scopo di sviluppare marcatori SNP in *C. cardunculus*, utilizzabili sia in programmi di miglioramento genetico che per il fingerprinting molecolare. In particolare sono state adottate due strategie: (i) sequenziamento genomico mediante piattaforma Genome Analyzer II\* (Illumina) di una rappresentazione genomica (*RAD - Restriction Associated DNA*) (Miller et al., 2007) di 3 parentali utilizzati per lo sviluppo di mappe genetiche; (ii) sequenziamento di librerie di cDNA a partire da RNA estratto da foglia e da radice, utilizzando le piattaforme 454\* (Roche) per i tre parentali di mappa e Genome Analyzer II\* (Illumina) per il sequenziamento di 5 genotipi di carciofo rappresentativi delle tipologie più diffuse in coltivazione, 2 genotipi di cardo coltivato e uno di cardo selvatico.

Il primo approccio, basato sulla "riduzione di complessità" genomica ha permesso di identificare 10.327 SNP genomiche nell'ambito dei tre parentali di mappa, localizzate su 4.977 loci. È invece in corso l'elaborazione dei dati ottenuti dal sequenziamento delle librerie di cDNA con la piattaforma 454\* (Roche). Analisi preliminari, tuttavia, hanno già permesso di identificare più di 42.000 SNP nei genotipi in studio. Inoltre, è stato possibile catalogare i marcatori SNP presenti in forma eterozigote nei singoli genotipi: questi marcatori, oltre a essere candidati ottimali per la saturazione delle mappe molecolari disponibili, saranno utilizzati quali strumenti idonei per l'identificazione varietale di carciofo e cardo. Sono attualmente in fase di selezione i marcatori aventi caratteristiche ideali per un saggio di genotipizzazione di 1536 SNP, attraverso la piattaforma GoldenGate\* (Illumina), che verrà eseguito sulle due popolazioni di mappa.

L'ampio numero di marcatori SNP disponibili ha la potenzialità di fornire uno strumento per l'identificazione molecolare non solo di tipi varietali diversi, ma anche di cloni o genotipi, risultato di programmi di selezione nell'ambito dei tipi varietali attualmente in coltivazione.

## CONCLUSIONI

La maggior parte dei prodotti alimentari oggi viene acquistata in negozi e supermercati con molti passaggi intermedi dal produttore al consumatore

finale: ciò rende difficile risalire alla loro origine. Affinché il percorso produttivo di un alimento sia rintracciabile, è necessario che venga tracciato. Nella pratica, tracciare una filiera agroalimentare significa raccogliere i dati che si generano lungo il percorso “dal campo alla tavola”, ogni volta che si completa una fase produttiva e in qualsiasi punto della filiera: settore vivaistico o sementiero, azienda agricola, impresa di prima lavorazione, impresa di trasformazione, distribuzione e cliente finale.

Il carciofo è, dopo la patata e il pomodoro, la coltura ortiva da pieno campo maggiormente diffusa in Italia. Esistono pertanto motivazioni valide non solo per un consolidamento delle superfici investite, ma anche per un ulteriore sviluppo della coltura soprattutto nelle aree del centro e sud Italia. Indubbiamente, un importante contributo alla valorizzazione della filiera carciofo è l’ottenimento di marchi di qualità da parte dell’Unione Europea, la cui tutela richiede la disponibilità di strumenti appropriati per l’accertamento dell’identità genetica di produzioni di pregio, sia in campo che nelle rispettive filiere agro-alimentari.

L’adozione di un sistema di rintracciabilità produce molteplici benefici poiché consente a consorzi e associazioni di produttori la tutela con marchi di qualità, alle imprese di aumentare la competitività, facilitandone l’inserimento in percorsi di certificazione e riconoscimento e ai consumatori la possibilità di accertare l’identità di prodotti tradizionali tipici e/o di sicura provenienza.

Per quanto la conoscenza dell’organizzazione del genoma di *Cynara cardunculus* sia a tutt’oggi ancora limitata, soprattutto rispetto a quella acquisita in altre specie ortive, negli ultimi anni è stato sviluppato un ampio numero di marcatori molecolari che rappresentano un valido strumento per l’identificazione di materiali di pregio, nonché per la loro tracciabilità ad autenticazione lungo tutta la filiera agroalimentare.

Inoltre, a seguito delle continue innovazioni tecnologiche conseguenti ai rapidi progressi della ricerca in genetica e genomica vegetale, è ragionevole ipotizzare che, in un prossimo futuro, saranno a disposizione metodologie che consentiranno una diretta identificazione nei segmenti della filiera non solo di materie prime, ma anche di geni responsabili della superiorità organolettica e nutraceutica di un prodotto rispetto a un altro.

#### RIASSUNTO

L’Italia, con una superficie investita di circa 50.000 ha e una produzione stimata di circa 500.000 t, è il maggior produttore mondiale di carciofo. Circa l’89% della produzione è

destinata al consumo allo stato fresco, mentre il restante 11% viene utilizzato dall'industria di trasformazione. Solo il 2% della produzione totale è destinato all'esportazione, mentre negli ultimi anni si è verificato un progressivo incremento delle importazioni; ciò è da imputare alla scarsa promozione e valorizzazione commerciale del prodotto italiano nonché alla inefficiente catena di distribuzione.

Un importante contributo alla valorizzazione della filiera carciofo può essere fornito dall'ottenimento di marchi di qualità da parte dell'Unione Europea, e quindi dalla disponibilità di strumenti appropriati per l'accertamento dell'identità genetica di produzioni di pregio, sia in campo che nelle rispettive filiere agro-alimentari.

Vengono riportati i risultati conseguiti nello sviluppo di un ampio numero di marcatori molecolari specifici per il carciofo, basati sull'analisi del polimorfismo di regioni a sequenza ripetuta (SSR = simple sequence repeats) o di varianti nucleotidiche (SNP = single nucleotide polymorphism) del DNA, che rappresentano un valido strumento per monitorare tutti i flussi della filiera produttiva.

#### ABSTRACT

Italy, with an invested area of 50,000 ha and an estimated production of about 500,000 tonnes, is the leading globe artichoke world producer. Approximately 89% of production is consumed as fresh product, while the remaining 11% is used for processing. Only about 2% of total production is exported, while in recent years there has been a progressive increase in imports; this is due to poor promotion and commercial valorisation of Italian products as well as the inefficient distribution chain. The creation of quality marks of the European Union has proven to be a successful system to protect typical products, however, it requires the availability of appropriate tools for determining their genetic identity in field as well as in the respective agro-food chain.

We report on achieved results in the development of a large number of molecular markers specific for globe artichoke, which are based on the analysis of DNA polymorphisms of repeated sequences (SSR = simple sequence repeats) or nucleotide variations (SNPs = single nucleotide polymorphism) and which represent a valuable tool to monitor flow along the production chain.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABBATE V., COSENTINO S.L., LOMBARDO G.M., MAUROMICALE G. (2006): *Biodiversità nei sistemi colturali erbacei*, «Italus Hortus», 13, pp. 53-69.
- ACQUADRO A., PORTIS E., LANTERI S. (2003): *Isolation of microsatellite loci in artichoke (Cynara cardunculus L. var. scolymus L.)*, «Molecular Ecology Notes», 3, pp. 37-39.
- ACQUADRO A., PORTIS E., ALBERTINI A., LANTERI S. (2005a): *M-AFLP based protocol for microsatellite loci isolation in Cynara cardunculus L. (Asteraceae)*, «Molecular Ecology Notes», 5, pp. 272-274.
- ACQUADRO A., PORTIS E., LEE D., DONINI P. and LANTERI S. (2005b): *Development and characterisation of microsatellite markers in Cynara cardunculus L.*, «Genome», 48, pp. 217-225.

- ACQUADRO A., LANTERI S., SCAGLIONE D., ARENS P., VOSMAN B., PORTIS E. (2009): *Genetic mapping and annotation of genomic microsatellites isolated from globe artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus)*, «Theoretical and Applied Genetics», 118, pp. 1573-1587.
- ACQUADRO A., PAPANICE M.A., LANTERI S., BOTTALICO G., PORTIS E., CAMPANALE A., FINETTI-SIALER M.M., MASCIA T., SUMERANO P., GALLITELLI D. (2010): *In vitro culture and thermotherapy for the production of virus-free plants in a reflowering variety of globe artichoke and assessment of clonal fidelity using molecular markers*, «Plant Cell, Tissue and Organ Culture», 100 (3), pp. 329-337.
- BIANCO V.V. (1990): *Carciofo (Cynara scolymus L.)*, in «Orticoltura», Bianco V.V. e Pimpini F., Pàtron Editore, Bologna, Italia, pp. 209-247.
- BROWN J., RICE-EVANS C. (1998): *Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro*, «Free Radical Res», 29 (3), pp. 247-255.
- COMINO C., LANTERI S., PORTIS E., ACQUADRO A., ROMANI A., HEHN A., LARBAT R., BOURGAUD F. (2007): *Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in Cynara cardunculus L.*, «BMC Plant Biology», 7, pp. 14.
- COMINO C., HEHN A., MOGLIA A., MENIN B., BOURGAUD F., LANTERI S., PORTIS E. (2009): *The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the artichoke chlorogenic acid pathway*, «BMC Plant Biology», 9, pp. 30.
- FAO (2009): <http://www.faostat.fao.org>.
- DE PAOLIS A., PIGNONE D., MORGESE A., SONNANTE G. (2008): *Characterization and differential expression analysis of artichoke phenylalanine ammonia-lyase-coding sequences*, «Physiologia Plantarum», 132, pp. 33-43.
- GEBHARDT R. (1997): *Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (Cynara scolymus L) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes*, «Toxicol. Appl. Pharmacol.», 144, pp. 279-286.
- HOFFMANN L., MAURY S., MARTZ F., GEOFFROY P., LEGRAND M. (2003): *Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism*, «J Biol Chem», 278, pp. 95-103.
- ISTAT (2009): <http://www.istat.it/agricoltura/datiagri/coltivazioni/>.
- KOSAR M., KAFKAS E., PAYDAS S., CAN BASER K.H. (2004): *Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages*, «Journal of Agriculture and Food Chemistry», 52, pp. 1586-1589.
- LANTERI S., DI LEO I., PORTIS E. AND QUAGLIOTTI L. (2001): *Randomly amplified polymorphic DNA variation in five populations of artichoke, cultivar 'Spinoso sardo'*, «Acta Horticulturae», 546, pp. 443-448.
- LANTERI S., SABA E., CADINU M., MALLICA G.M., BAGHINO L., PORTIS E. (2004a): *Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke*, «Theoretical and Applied Genetics», 108, pp. 1534-1544.
- LANTERI S., ACQUADRO A., SABA E. PORTIS E. (2004b): *Molecular fingerprinting and evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke (Cynara scolymus var. cardunculus L.) 'Spinoso sardo'*, «Journal of Horticultural Science & Biotechnology», 79, pp. 863-870.
- LANTERI S., ACQUADRO A., COMINO C., MAURO R., MAUROMICALE G., PORTIS E. (2006): *A first linkage map of globe artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers*, «Theoretical and Applied Genetics», 112 (8), pp. 1532-1542.

- LATTANZIO V., KROON P.A., LINSALATA V., CARDINALI A. (2009): *Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients*, «Journal of Functional Foods», 1 (2), pp. 131-144.
- LOMBARDO S., PANDINO G., MAUROMICALE G., KNÖDLER M., CARLE R., SCHIEBER A. (2010): *Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [Cynara cardunculus L. var. scolymus (L.) Fiori]*, «Food Chem.», 119, pp. 1175-1181.
- MAUROMICALE G., IERNA A. (2000): *Panorama varietale e miglioramento genetico del carciofo*, «L'Informatore Agrario», 56, 26, pp. 39-45.
- MARTINEZ I., AURSAND M., ERIKSON U., SINGSTAD T. E., VELYULIN E., VAN DER ZWAAG C. (2003): *Destructive and non destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs*, «Trends Food Sci. Technol.», 14, pp. 489-498.
- MENIN B., COMINO C., MOGLIA A., DOLZHENKO Y., PORTIS E., LANTERI S. (2010): *Identification and mapping of genes related to caffeoylquinic acid synthesis in Cynara cardunculus L.*, «Plant Science», 179 (4), pp. 338-347.
- MILLER M., DUNHAM J., AMORES A., CRESKO W., JOHNSON E. (2007): *Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers*, «Genome Research», 240-248.
- MOGLIA A., COMINO C., PORTIS E., ACQUADRO A., DE VOS R.C.H., BEEKWILDER J., LANTERI S. (2009): *Isolation, functional characterization and mapping of a p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase gene (C3'H) in globe artichoke*, «Plant Cell Reports», 28 (6), pp. 963-974.
- NIGGEWEG R., MICHAEL A., MARTIN C. (2004): *Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid*, «Nature Biotechnology», 22, pp. 746-754.
- PANDINO G., COURTS F.L., LOMBARDO S., MAUROMICALE G., WILLIAMSON G. (2010): *Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature inflorescence of globe artichoke, wild and cultivated cardoon (Cynara cardunculus L.)*, «Journal of Agriculture and Food Chemistry», 58, pp. 1026-1031.
- PANDINO G., LOMBARDO S., MAUROMICALE G., WILLIAMSON G. (2010): *Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke germplasm*, «Journal of Food Composition and Analysis», in press.
- PAPADOPOULOU A., FRAZIER R.A. (2004): *Characterization of protein- polyphenols interaction*, «Trends in Food Science and Technology», 15, pp. 186-190.
- PITTLER M.H., ERNST E. (1998): *Artichoke leaf extract for serum cholesterol reduction*, «Perfusion», 11, pp. 338-340.
- PORCEDDU E., DELLACECCA V., BIANCO V.V. (1976): *Classificazione numerica di cultivar di carciofo*, in «Atti II Congresso Internazionale Carciofo», ed. Minerva Medica, Torino, Italia. pp. 1105-1119.
- PORTIS E., MAUROMICALE G., BARCHI L., MAURO R., LANTERI S. (2005a): *Population structure and genetic variation in autochthonous globe artichoke germplasm from Sicily Island*, «Plant Science», 168, pp. 1591-1598.
- PORTIS E., BARCHI L., ACQUADRO A., MACUA J.I., and LANTERI S. (2005b): *Genetic diversity assessment in cultivated cardoon by AFLP (amplified fragment length polymorphism) and microsatellite markers*, «Plant Breeding», 124, pp. 299-304.
- PORTIS E., MAUROMICALE G., MAURO R., ACQUADRO A., SCAGLIONE D., LANTERI S. (2009): *Construction of a reference molecular linkage map of globe artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus)*, «Theoretical and Applied Genetics», 120, pp. 59-70.

- RAO R., CARAMANTE M., BLANCO A., LANTERI S., LUCCHIN M., MAZZUCATO A. (2009): *Innovazioni genetiche per l'identificazione e la protezione di prodotti tipici italiani*, «Italian Journal Agronomy», 3, pp. 93-99.
- RICE-ÉVANS C.A., MILLER N.J., PAGANGA G. (1997): *Antioxidant properties of phenolic compounds*, «Trends in Plant Science», 2, pp. 152-159.
- SCAGLIONE D., ACQUADRO A., PORTIS E., TAYLOR C.A., LANTERI S., KNAPP S.J. (2009): *Ontology and diversity of transcript-associated microsatellites mined from a globe artichoke EST database*, «BMC Genomics», 10, pp. 454.
- SLANINA J., TABORSKA E., BOCHORAKOVA H., SLANINOVA I., HUMPA O., ROBINSON W., SCHRAM K. (2001): *New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid*, «Tetrahedron Letters», 42, pp. 3383-3385.
- VILLEGAS R.J.A., KOJIMA M. (1986): *Purification and characterization of Hydroxycinnamoyl D-Glucose/Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, Ipomoea batatas Lam*, «J. Biol. Chem.», 261, pp. 8729-8733.

Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nel febbraio 2011