

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 carnosi 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 COM- PLESSIVE (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)*

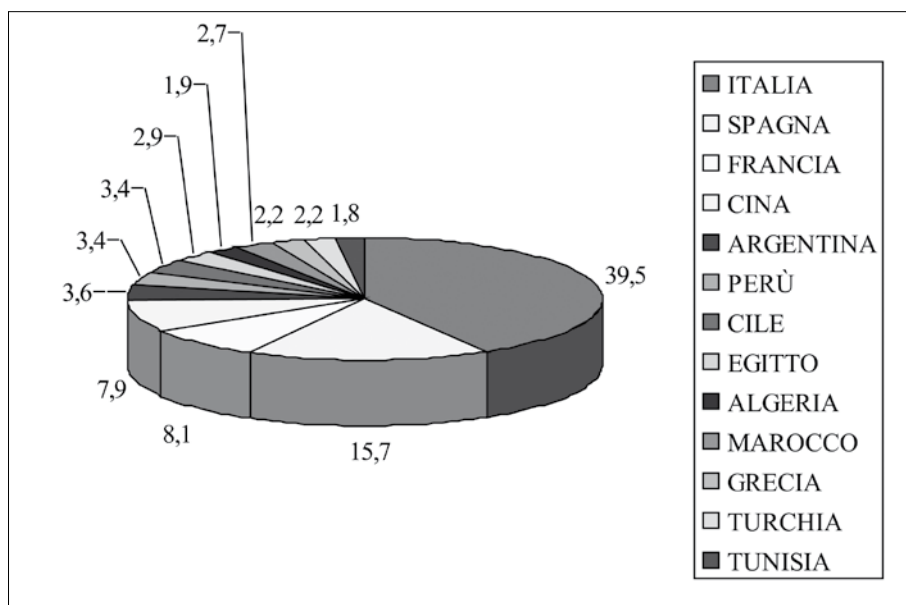


Fig. 1 *Ripartizione percentuale delle superfici cinaricole relative ai principali Paesi cinaricoli (FAO 2009, media del triennio 2005-2007)*

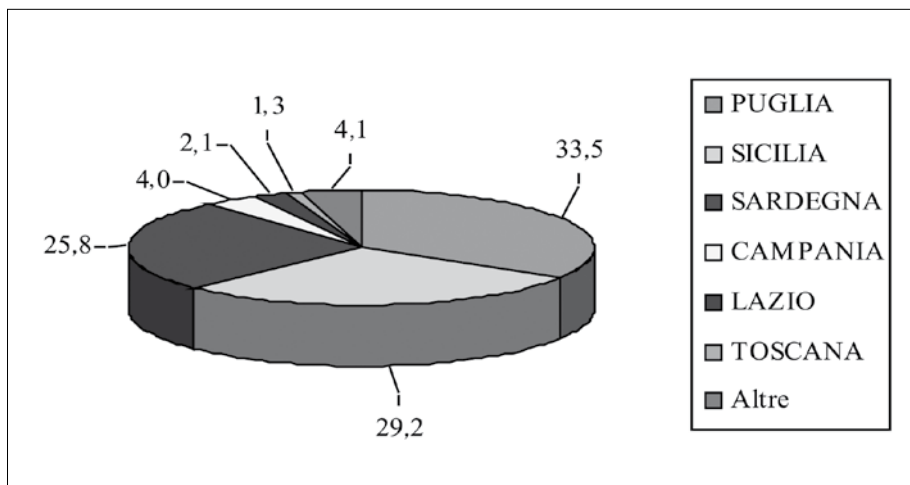


Fig. 2 Ripartizione percentuale delle superfici cinaricole relative alle principali regioni cinaricole italiane (ISTAT 2009, media del triennio 2006-2008)

un progressivo incremento delle importazioni dalla Spagna (5000 t anno⁻¹) e dai Paesi del nord Africa (circa 8.000 t anno⁻¹), 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) 'Catane'

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 CAFFELOILCHINICO	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 flosculi 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 genetico 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_1 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., VELLJULIN 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-EVANS 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