

ROSA RAO*, GIANDOMENICO CORRADO*, STEFANO SFORZA**,
ROSANGELA MARCHELLI**

Tracciabilità dell'identità genetica nella filiera agro-alimentare del pomodoro

INTRODUZIONE

L'industria agro-alimentare italiana trae vantaggio dalla ampia disponibilità e diversità di specie orto-frutticole di pregio. Questi nostri materiali genetici, spesso non adeguatamente valorizzati e conosciuti, rappresentano una importante risorsa per incrementare la competitività del comparto agricolo italiano nei mercati internazionali. Inoltre, la crescente preferenza dei consumatori per alimenti salubri, tradizionali e sicuri fornisce una ulteriore opportunità all'agricoltura italiana per affermarsi anche sui mercati interni, tramite la valorizzazione dei cosiddetti prodotti tipici.

Il pomodoro è tra i prodotti ortivi simboli dell'agricoltura italiana. Il nostro paese è considerato, insieme alla Spagna, centro secondario di diversificazione della specie (Garcia-Martinez et al., 2006) e le favorevoli condizioni agro-climatiche dell'Italia hanno permesso lo sviluppo di un gran numero di varietà tradizionali locali. Queste comprendono varietà da mensa, a crescita indeterminata o a maturazione scalare, e varietà da industria, per la produzione di pelati, inscatolati, concentrati, con forma della bacca che varia dalla cilindrica alla piriforme, da quadrata ad allungata. Il pomodoro pelato rappresenta a tutt'oggi uno dei prodotti leader e simbolo dell'industria conserviera italiana, conosciuto e apprezzato in tutto il mondo per le sue pregevoli caratteristiche organolettiche, per il suo gusto ricco e la polpa succosa e consistente.

La creazione di marchi di qualità da parte della Unione Europea si è rivelata un efficace strumento per proteggere la tipicità dei prodotti alimentari e

* *Dip. Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni animali, Università degli Studi di Napoli Federico II*

** *Dip. Chimica Organica ed Industriale, Università degli Studi di Parma*

rivitalizzare i comparti produttivi che includono produzioni tradizionali di pregio. Un tipico esempio dell'impatto del marchio DOP sulla rivitalizzazione della produzione è rappresentato proprio dal pomodoro 'San Marzano', il cui marchio DOP, riconosciuto dall'Unione Europea nel 1996 è curato da uno specifico Consorzio di tutela (www.consorziosanmarzano.it).

La coltivazione del 'San Marzano', infatti, ha subito negli anni Ottanta una importante riduzione, che è stata successivamente superata anche grazie all'attività di recupero, identificazione, moltiplicazione e valorizzazione della varietà 'San Marzano', effettuata dalla Regione Campania in collaborazione con l'Università degli Studi di Napoli Federico II.

La tutela dei marchi dei prodotti tipici e dell'indicazione di provenienza deve però necessariamente prevedere l'impiego di strumenti analitici affidabili, principalmente per evitare un uso indebito, anche ai soli fini pubblicitari, di un carattere distintivo della varietà da proteggere, quali il nome stesso, il suo luogo di origine o le sue peculiarità (ad esempio la forma e il colore del frutto). Tali strumenti analitici sono indispensabili soprattutto per prodotti processati industrialmente o impiegati come ingredienti di altri alimenti, in quanto i consumatori e la distribuzione molto difficilmente sono in grado di distinguere una denominazione indebitamente usata. Un uso improprio di una denominazione provoca infatti un doppio danno, determinando disorientamento della clientela, che non ritrova più nel prodotto acquistato le sue reali caratteristiche distintive, e sottraendo flussi commerciali alle imprese che legittimamente impiegano e sfruttano un determinato marchio o prodotto tipico.

Anche per rispondere a queste problematiche, la tracciabilità di filiera, è divenuta dal gennaio 2005 obbligatoria per tutte le aziende agro-alimentari. Essa è 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" (Reg. CE 178/2002). Il perseguimento della tracciabilità così definita include anche la tracciabilità genetica dei materiali vegetali. Tale attività è di vitale importanza soprattutto per la difesa e la tutela dei prodotti che sono utilizzati nelle filiere produttive che si fregiano di marchi collettivi (DOP, IGP, ecc).

MARCATORI MOLECOLARI PER LA DISCRIMINAZIONE DI VARIETÀ DI POMODORO E LA TRACCIABILITÀ GENETICA

L'analisi del DNA mediante i marcatori molecolari rappresenta un strumento di identificazione varietale che offre una maggiore affidabilità rispetto ai

metodi tradizionali basati sulla valutazione di caratteri morfologici e biochimici, la cui utilità è limitata dall'influenza delle condizioni ambientali e dalle difficoltà di analisi dei prodotti processati. In primo luogo, anche se il DNA è comunque alterato dai vari processi di trasformazione (stress meccanico, riscaldamento) è più resistente e termostabile rispetto alle proteine e altri marcatori biochimici. Solitamente dalle matrici alimentari è ancora possibile isolare DNA di qualità adeguata per analisi PCR (Polymerase Chain Reaction) che forniscono informazioni sufficienti per l'identificazione varietale (Martinez et al., 2003). In secondo luogo, il DNA può essere potenzialmente estratto da qualsiasi matrice (incluso, ad esempio, il liquido di governo), perché è presente in pressoché tutte le cellule di un organismo. Inoltre, a causa della degenerazione del codice genetico e della presenza di regioni genomiche non codificanti, il DNA offre molte più informazioni rispetto alle proteine. Gli enormi progressi nel campo della biologia molecolare, stimolati dal settore clinico-diagnostico, hanno reso possibile l'identificazione di virtualmente tutte le specie animali da diversi tipi di substrato organico, come i muscoli, o il sangue (Lockley e Bardsley, 2000), mentre i progressi nel settore agro-alimentare sono limitati. È in ogni modo da sottolineare che le tecniche di rilevazione degli acidi nucleici costituiscono la base principale delle applicazioni forensiche (Scholetterer, 2004).

Per tutti questi motivi, si prevede che le analisi del DNA diventeranno parte integrante dei controlli delle filiere agro-alimentari.

La diversità molecolare di specie vegetali è stata, nel corso del tempo, caratterizzata mediante numerosi marcatori del DNA che evidenziano polimorfismi di vario livello informativo. Diversamente, per la tracciabilità genetica dei materiali vegetali nelle filiere agro-alimentare, i marcatori che meglio si prestano allo scopo sono gli SSR (Sequenze Semplici Ripetute) e gli SNP (Polimorfismi a Singolo Nucleotide). Entrambe queste tipologie di marcatori rilevano i polimorfismi presenti anche a partire da un DNA template frammentato o danneggiato, come spesso accade al DNA delle matrici alimentari soggette ai processi industriali. Gli SSR, marcatori di elezione per i test di paternità e studi forensi (Schlotterer, 2004), sono tra i più utili e affidabili marcatori molecolari del DNA in quanto possiedono elevati livelli di polimorfismo e sono codominanti; hanno inoltre il vantaggio di essere specie-specifici, e richiedono un corto DNA-stampo per l'amplificazione. Gli SNP, polimorfismi generati da mutazioni puntiformi, rappresentano la forma più comune di variazione molecolare. I principali vantaggi dell'uso di marcatori SNP risiedono nel fatto che essi sono molto numerosi e uniformemente distribuiti nel genoma e la loro analisi può essere facilmente automatizzata.

La costituzione del Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro (GenoPOM) ha rappresentato una importante opportunità per sviluppare metodologie innovative per la certificazione dei materiali sementieri e dei prodotti della filiera pomodoro anche in relazione al controllo dell'identità dei materiali freschi e trasformati.

La variabilità genetica delle varietà coltivate di pomodoro è significativamente inferiore a quella riscontrata in altre specie auto-compatibili. Si ritiene che ciò sia la conseguenza oltre della stretta autogamia della specie, della utilizzazione di un ristretto pool di genotipi nei programmi di incrocio e selezione. Un marcatore dall'elevato potere discriminante è il minisatellite (GATA)₄ (Rao et al., 2006; Andreakis et al., 2004) che evidenzia un profilo genetico identificativo di ogni varietà o accessione analizzata e individua contaminazioni genetiche presenti in una stessa accessione (Caramante et al., 2009). Analogamente, il polimorfismo SSR ha evidenziato buoni livelli di diversità nel pomodoro coltivato, *S. lycopersicum* (Bredemeijer et al., 2002). Nell'ambito del progetto GenoPom è stato effettuato il *fingerprinting* del DNA di ecotipi e varietà tradizionali campane moltiplicate da una ditta sementiera che opera in Campania e di varietà commerciali incluse nel disciplinare di produzione integrata del pomodoro da industria, in uso presso una ditta di trasformazione campana. Sono stati selezionati 14 loci SSR particolarmente informativi della diversità intra-specifica. La discriminazione allelica è stata effettuata mediante elettroforesi capillare automatizzata su ABI Prism 3100-AVANT (Applied Biosystem). I dati ottenuti hanno mostrato che gli SSR utilizzati identificano tutti gli ecotipi e le varietà all'analisi. Il potere discriminante degli SSR si è rivelato simile a quello del (GATA)₄ (Caramante et al., 2009). Questi risultati indicano che, nonostante la limitata diversità genetica presente in pomodoro, il *fingerprinting* del DNA basato sugli SSR, discrimina non solo varietà differenti ma anche tipi morfologicamente simili e geneticamente vicini e può quindi essere utilizzato per la identificazione e la protezione di materiali geneticamente pregiati.

Anche se il loro livello di polimorfismo non sembra superare quello degli SSR, uno dei vantaggi dell'uso degli SNP è che i risultati ottenuti sono confrontabili anche se derivano da diversi approcci sperimentali. Questo aspetto rende tali marcatori potenzialmente utili per la tracciabilità genetica. Per questo motivo, sono stati validati diversi SNP di pomodoro, principalmente mediante analisi CAPS. L'obiettivo è l'identificazione di migliaia di SNP per la genotipizzazione e la successiva tracciabilità di cultivar di pomodoro nella filiera agro-alimentare con sistemi automatizzati di ultima generazione.

TRACCIABILITÀ DELLA FILIERA POMODORO

Polimorfismi SSR

L'utilizzo dei marcatori molecolari del DNA per il controllo della filiera agro-alimentare del pomodoro ha la potenzialità di offrire una metodica sicura e rapida per l'accertamento dell'identità genetica delle cultivar presenti, nei vari segmenti della filiera agro-alimentare, dal prodotto fresco al prodotto finito. A tale scopo, particolarmente idonei risultano quei loci SSR che, pur mantenendo un elevato potere discriminante, sono caratterizzati da alleli di dimensioni intorno a 100 bp. Infatti, prove di amplificazione di differenti frammenti di una sequenza a singola copia del genoma di pomodoro, hanno dimostrato che è possibile amplificare solo sequenze di

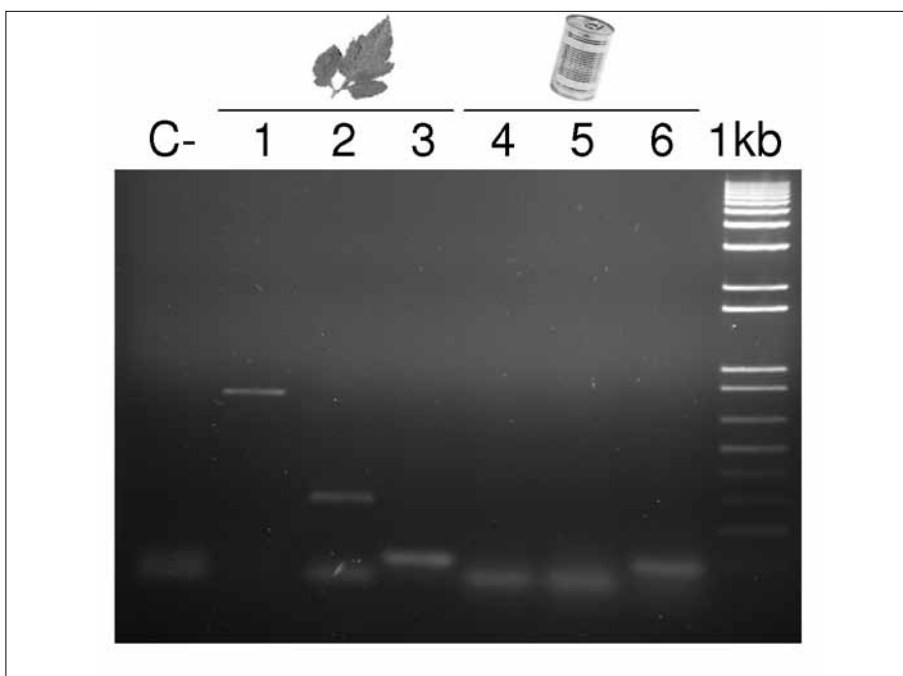


Fig. 1 Verifica dell'amplificabilità del DNA isolato da prodotti trasformati di pomodoro. 1, 2, 3: PCR con DNA isolato da foglia amplificato con coppie di primer che danno frammenti di circa 680 bp, 300 bp e 100 bp) di un gene target a singola copia, rispettivamente. 4, 5, 6: PCR con DNA isolato da prodotto processato amplificato con le coppie di primer che amplificano un prodotto di circa 680 bp, 300 bp e 100 bp, rispettivamente. C-= Controllo negativo. 1Kb = 1Kb plus ladder (Invitrogen)

dimensione ridotta, quando si impiega come stampo DNA estratto da pomodoro inscatolato, pelato o polpa (fig. 1). Questo risultato è la probabile conseguenza dell'elevato grado di frammentazione del DNA a seguito della trasformazione industriale. Similmente, le amplificazioni di alleli SSR a partire da DNA estratto da lavorati di pomodoro hanno evidenziato buoni risultati solo nel caso di alleli di dimensioni inferiori a 200 bp. I profili allelici dei loci SSR selezionati, ottenuti mediante elettroforesi capillare degli amplificati prodotti a partire da DNA estratto da foglia, bacca e prodotto processato di una filiera di pomodoro pelato, hanno mostrato completa corrispondenza (Rao et al., manoscritto in preparazione). Un esempio è riportato in figura 2. Questi risultati indicano che i marcatori SSR sono uno strumento adeguato per la tracciabilità genetica dei materiali nella filiera pomodoro.

Verso la costruzione di un array a PNA per la tracciabilità del pomodoro

L'uso dei polimorfismi SNPs per discriminare varietà di piante agrarie può avvenire utilizzando differenti tecnologie (Khlestkina et al., 2006). Tra le più efficienti vi sono senza dubbio quella basate sui microarray a DNA. Tuttavia le sonde a DNA presentano alcuni svantaggi: una forte dipendenza

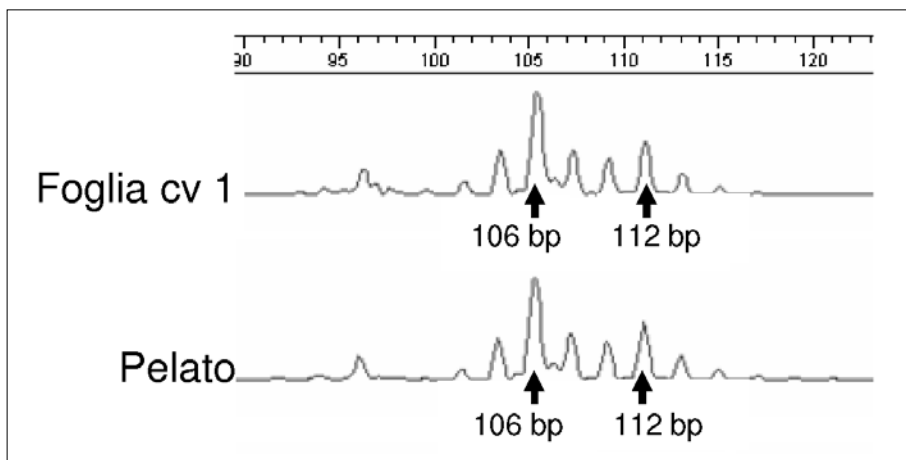


Fig. 2 *Profilo allelico di un locus SSR in un prodotto trasformato. Il DNA, isolato da foglia e dal prodotto trasformato, è stato amplificato con primer specifici per un locus SSR polimorfico. Il confronto tra i profili allelici a più loci SSR permette di distinguere e individuare le diverse varietà di pomodoro.*

dell'ibridazione dalla forza ionica, una non elevata stabilità chimica e una non perfetta specificità nel riconoscimento di sequenze contenenti un solo mismatch, come è il caso appunto negli SNPs. Tali svantaggi possono essere superati dall'uso di sonde a PNA (fig. 3a), analoghi oligonucleotidici a scheletro pseudopeptidico neutro. I PNA formano ibridi con sequenze di DNA complementari (in base ai classici appaiamenti di tipo Watson-Crick) di elevata stabilità, maggiore dei corrispondenti duplex DNA-DNA, in genere indipendenti dalla forza ionica e sono più specifici nel riconoscimento di mismatch. A questo si aggiunga che, in quanto pseudopeptidi, i PNA godono anche di un'elevata stabilità chimica. Per il riconoscimento di SNPs è inoltre possibile utilizzare PNA chirali derivati da ammino acidi con catene cariche positivamente (fig. 3b), che aumentano la specificità nel riconoscimento delle sequenze complementari di DNA (Sforza et al., 2000). I PNA possono proficuamente sostituire i DNA nella costruzione di arrays dedicati alla rivelazione di specifiche sequenze geniche, come già dimostrato nel caso della rivelazione

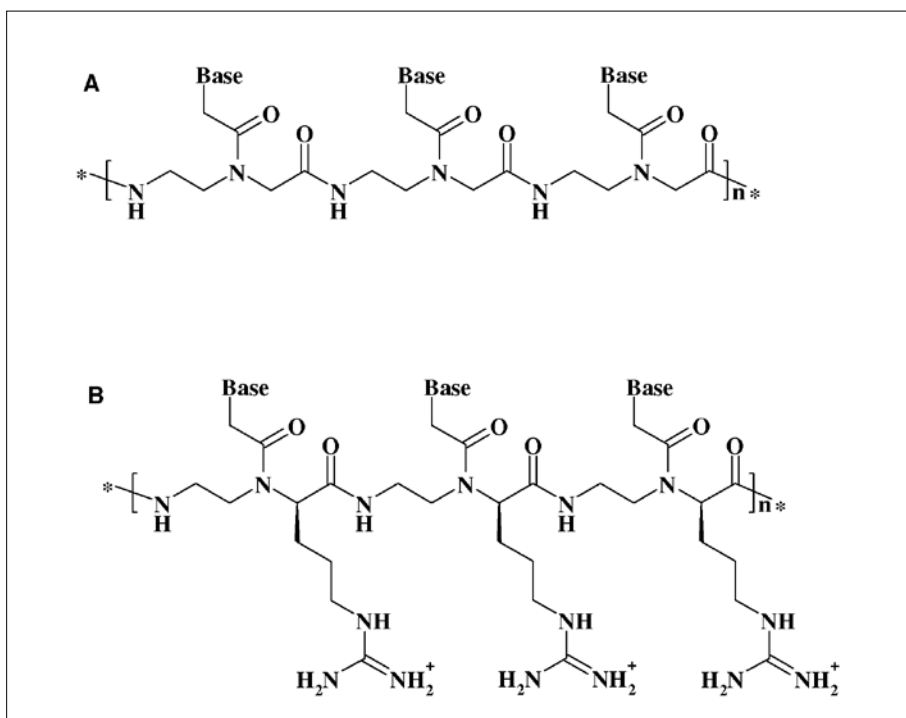


Fig. 3 *Acido Peptido Nucleico (PNA) a struttura standard (a) e modificato con catene laterali derivate da D-arginina (b)*

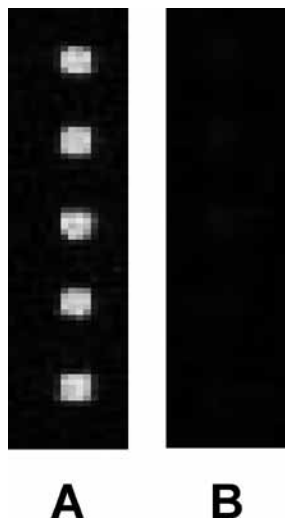


Fig. 4 *Test preliminari con PNA array per la discriminazione delle varietà di pomodoro attraverso riconoscimento di SNP specifici. Risultati con DNA estratto da bacche di varietà Talent (a) e Leader (b)*

di DNA proveniente da OGM o da allergeni nascosti (Rossi et al., 2006). Recentemente, è stato dimostrato che PNA modificati sono molto efficienti per la rivelazione di SNPs nel genoma umano mediante arrays dedicati (Calabretta et al., 2009).

Nell'ambito del progetto GenoPom sono stati progettati e sintetizzati sei PNA modificati per la sintesi di un test-array da utilizzarsi per la discriminazione di diverse varietà di pomodoro, mediante riconoscimento di SNPs specifici, in prodotti freschi e trasformati. Un esempio dei risultati ottenuti in esperimenti preliminari è mostrato in figura 4, dove è riportata la differenza di segnale ottenuta con DNA estratto da bacche di due varietà diverse.

CONCLUSIONI

I marcatori molecolari per la discriminazione degli organismi viventi sono principalmente impiegati in tre aree: tassonomia, ecologia e scienza forense. Tra queste, la scienza forense, e in particolare l'analisi in filiera, ha il maggior rilievo nel settore agro-alimentare. Le applicazioni delle tecniche di analisi del DNA includono l'identificazione di specie e varietà vegetali, di organismi contaminanti, di patogeni e di OGM. Due sono gli aspetti cruciali di queste applicazioni, ovvero il problema della frammentazione degli acidi nucleici nelle matrici processate e la necessità di sviluppare metodologie ad alta processività facilmente trasferibili e riproducibili tra i diversi laboratori. La nostra

attività di ricerca ha dimostrato che è possibile impiegare SSR e SNPs per la tracciabilità genetica di prodotti trasformati della filiera pomodoro.

Razze animali e varietà vegetali specificamente adattate a particolari ambienti sono le risorse fondamentali per rendere un prodotto tipico. Nel caso del pomodoro, questa importante biodiversità può essere conservata promuovendo la sostenibilità economica dei sistemi locali di coltivazione e trasformazione. Tale scopo deve essere innanzitutto perseguito con una adeguata protezione giuridica che include lo sviluppo di marchi di qualità e degli strumenti analitici per la loro difesa. In questa prospettiva, le nostre attività di ricerca non solo confermano che i marcatori molecolari del DNA sono uno strumento efficace per proteggere e distinguere i prodotti di qualità (Melchiade et al., 2007; Rao et al., 2006), ma indicano anche che alcuni marcatori possono essere impiegati con successo per l'identificazione genetica dei materiali di filiera. Noi ci auguriamo che la tutela dei prodotti tipici da parte delle istituzioni regionali e nazionali includa anche indagini molecolari, prima e dopo l'istituzione dei marchi di qualità.

RIASSUNTO

Il rispetto della normativa europea sull'etichettatura dei prodotti alimentari e l'esigenza di proteggere da sostituzioni fraudolente i prodotti tipici rappresentano due importanti motivazioni per lo sviluppo di metodi di autenticazione dell'identità genetica dei prodotti di filiera. In questo lavoro si presentano e si discutono applicazioni dei marcatori del DNA per la tracciabilità dei prodotti in ingresso ed in uscita della filiera agro alimentare del pomodoro. I risultati indicano che alcuni marcatori del DNA basati sulla PCR rappresentano uno strumento versatile ed innovativo per identificare le varietà impiegate nella produzione degli inscatolati di pomodoro, nonostante il DNA isolato dalle matrici alimentari sia altamente degradato. È probabile che le tecniche basate sul DNA saranno un approccio sempre più diffuso per identificare le varietà e le specie vegetali sia in prodotti singoli che miscele, in quanto tali tecniche sono facili da impiegare, affidabili, informative e ben si prestano ad analisi quantitative e ad alta processività.

ABSTRACT

Compliance with the European legislation on food labelling and the demand of protection for typical products against fraudulent substitutions are two major reasons that prompted the development of analytical methods for the authentication of the genetic identity in agro-food chains. In this work we show and discuss some applications of DNA markers for the traceability of products entering and the tomato food chain. The results indicated that some PCR-based DNA markers can be used as an innovative and

versatile tool for identifying the varieties used in the production of tinned tomatoes, despite the DNA isolated from the food matrix is highly degraded. It is likely that the DNA-based techniques will be an increasingly popular approach to identify crop varieties and species, in both single and mixed products, as these techniques are easy to use, reliable, informative and amenable to quantitative and high-throughput analysis.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREAKIS N., GIORDANO I., PENTANGELO A., FOGLIANO V., GRAZIANI G., MONTI L.M., RAO R. (2004): *DNA fingerprinting and quality traits of corbarino cherry-like tomato landraces*, «J. Agric. Food Chem.», 52, pp. 3366-3371.
- BREDEMEIJER G.M.M., COOKE R.J., GANAL M.W., PEETERS R., ISAAC P., NOORDIJK Y., RENDELL S., JACKSON J., RÖDER M.S., WENDEHAKKE K., DIJCKS M., AMELAINE M., WICKAERT V., BERTRAND L., VOSMAN B. (2002): *Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties*, «Theor. Appl. Genet.», 105, pp. 1019-1026.
- CALABRETTA A., TEDESCHI T., DI COLA G., CORRADINI R., SFORZA S., MARCHELLI R. (2009): *Arginine-based PNA microarrays for APOE genotyping*, «Mol. Biosyst.», 5, pp. 1323-1330.
- CARAMANTE M., RAO R., MONTI L.M., CORRADO G. (2009): *Discrimination of 'San Marzano' accessions: A comparison of minisatellite, CAPS and SSR markers in relation to morphological traits*, «Sci. Hort.», 120, pp. 560-564.
- GARCÍA-MARTÍNEZ S., ANDREANI L., GARCÍA-GUSANO M., GEUNA F., RUIZ J.J. (2006): *Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars*, «Genome», 49, pp. 648-656.
- GERMINI A., ROSSI S., ZANETTI A., CORRADINI R., FOGHER C., MARCHELLI R. (2005): *Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food*, «J. Food Chem.», 53, pp. 3958-3962.
- KHLESTKINA E.K., SALINA E.A. (2006): *SNP markers: Methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat*, «Russ. J. Genet.», 42, pp. 585-594.
- MARTINEZ I., BATHEN T., STANDAL I.B. (2003): *Destructive and non destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs*, «Trends Food Sci. Technol.», 14, pp. 489-498.
- RAO R., CORRADO G., BIANCHI M., DI MAURO A. (2006): *(GATA)(4) DNA fingerprinting identifies morphologically characterized 'San Marzano' tomato plants*, «Plant Breeding», 125, pp. 173-176.
- ROSSI S., SCARAVELLI E., GERMINI A., CORRADINI R., FOGHER C., MARCHELLI R. (2006): *A PNA-array platform for the detection of hidden allergens in foodstuffs*, «European Food Research and Technologies», 223, pp. 1-6.
- SCHLOTTERER C. (2004): *The evolution of molecular markers – just a matter of fashion?*, «Nature Rev Genet», 5, pp. 63-69.
- SFORZA S., CORRADINI R., GHIRARDI S., DOSSENA A., MARCHELLI R. (2000): *DNA binding of a D-lysine-based chiral PNA: direction control and mismatch recognition*, «Eur. J. Org. Chem.», pp. 2905-2913.