

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

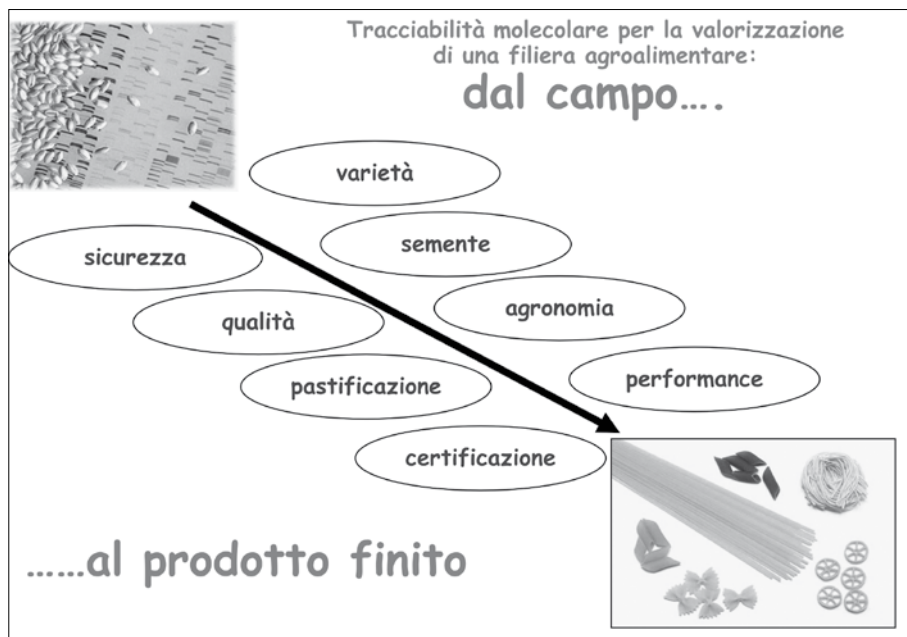


Fig. 1 Le metodiche di tracciabilità molecolare sono applicabili a diversi step del processo di filiera della produzione di pasta italiana

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-

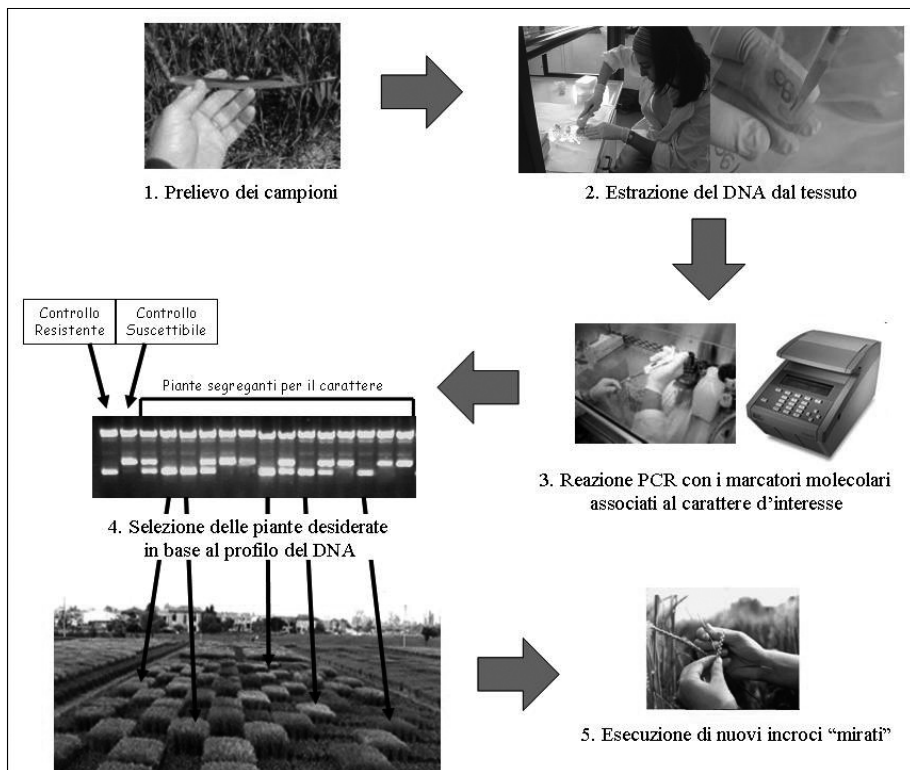


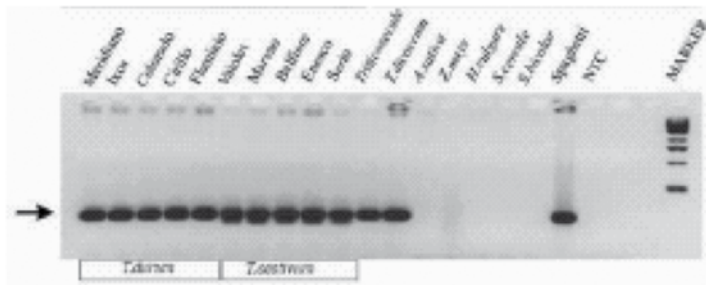
Fig. 2 Schema esemplificativo dell'impiego di MAS (Marker Assisted Selection) per l'ottenimento di nuove varietà di cereali. (per gentile concessione del dr. Enrico Francia)

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.

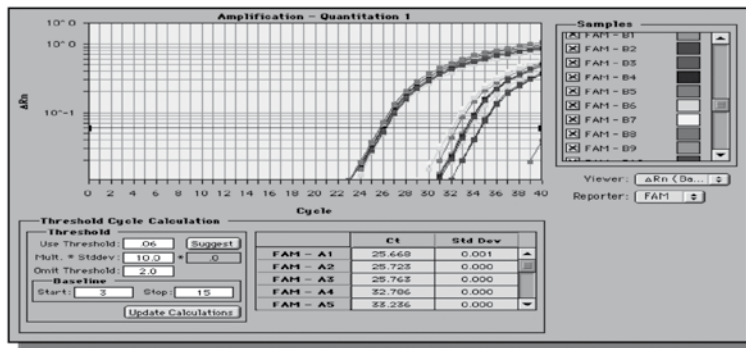
TRACCIABILITÀ DI SPECIE E DI GENOTIPO

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

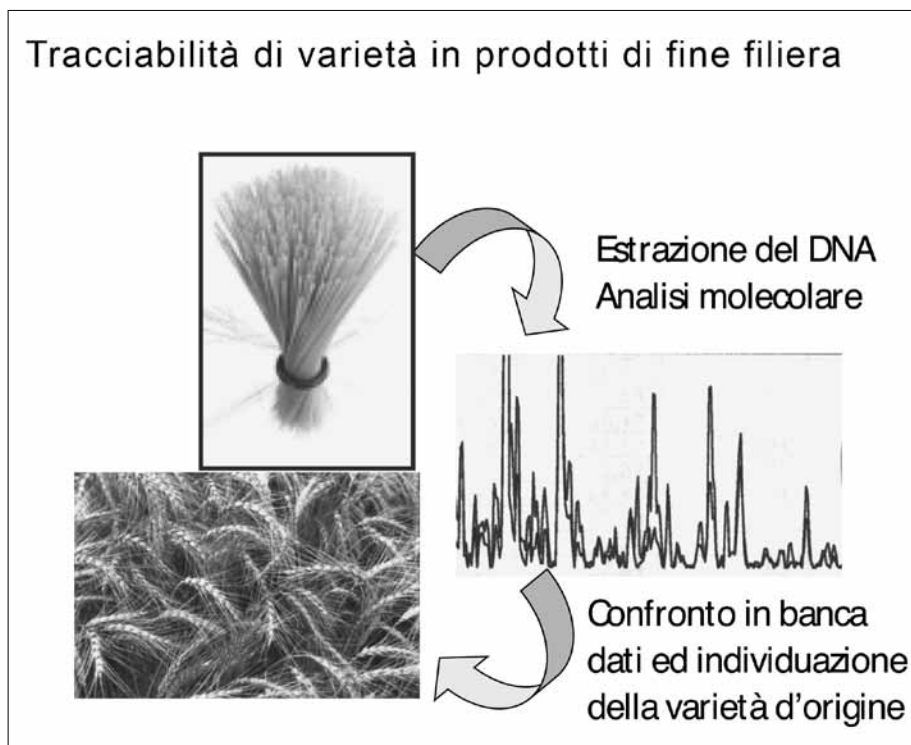


Fig. 4 La tracciabilità molecolare può essere applicata alla certificazione di autenticità di pasta monovarietale (Terzi et al., 2004b)

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-

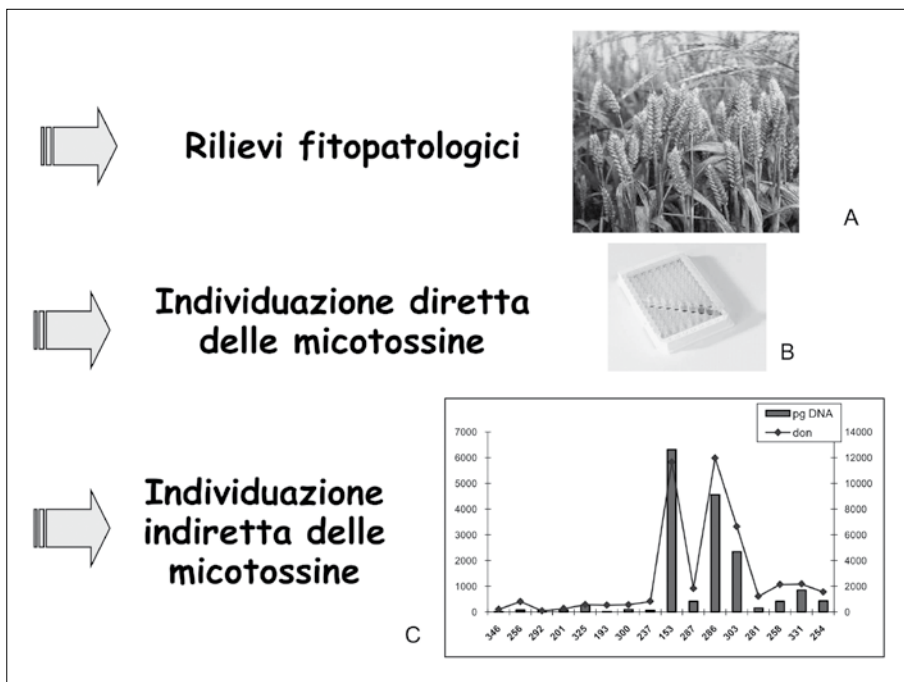


Fig. 5 Strategie dirette (rilievi fitopatologici, caratterizzazione chimica e immunoenzimatica della eventuale presenza di micotossine) e indirette (individuazione, caratterizzazione e quantificazione di DNA fungino) per il monitoraggio di fusariosi in produzioni cerealicole. A=cereali colpiti da fusariosi; 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.