

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 Arbequinae 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 germ-plasm: 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.

