

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento di Scienze Ambientali

Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE

XXII CICLO

2007-2009

BIOTECNOLOGIE GENETICO-MOLECOLARI

APPLICATE ALL'ANALISI DI FILIERA

Docenti Guida:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Dott.ssa Marta Marmioli

Docenti Guida:

Dott.ssa Maria Luisa Savo Sardaro

Coordinatore del Dottorato:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Dottorando:

Dott.ssa Manuela Turci

*La teoria è quando si sa tutto ma non funziona niente.
La pratica è quando funziona tutto ma non si sa il perché.
In ogni caso si finisce sempre con il coniugare la teoria con la pratica:
non funziona niente e non si sa il perché!*
A. Einstein

Riassunto

Nel corso del periodo di dottorato sono state sviluppate metodologie molecolari per la tracciabilità alimentare applicabili alla filiera di trasformazione del pomodoro. Tale filiera è stata scelta in quanto il pomodoro è una coltura orticola che riveste notevole importanza a livello globale. Il pomodoro è la seconda coltura più consumata al mondo dopo la patata e la più popolare coltura da giardino. Le piante di pomodoro vengono cresciute in modo ubiquitario nella maggior parte del mondo. Nonostante l'elevata diffusione del pomodoro a livello mondiale questo alimento non è considerato ad alto valore nutrizionale, tuttavia un pomodoro medio fornisce il 47% della dose giornaliera di vitamina C, il 22% della dose giornaliera di vitamina A ma solo 25 calorie. Nella dieta delle popolazioni americane il pomodoro è la maggior fonte di vitamine, minerali e antiossidanti fenolici tra cui vanno ricordati gli antiossidanti licopenici che proteggono le cellule dai radicali all'ossigeno che sembrano essere legati all'insorgenza di cancro. (Foolad, 2007)

Le metodologie molecolari basate sull'analisi del DNA consentono di effettuare analisi, per il controllo della qualità e della genuinità dei prodotti in tempi brevi e con risultati sensibili. Per questo motivo la prima problematica analizzata è stata la procedura di estrazione del DNA dalle matrici prese in esame (pomodoro fresco, passata di pomodoro, salsa di pomodoro, polpa di pomodoro a pezzi, pomodori pelati, concentrato di pomodoro e sugo all'arrabbiata), in modo da mettere a punto metodiche genomico-molecolari che possano essere applicate alla tracciabilità degli alimenti. L'elevato livello di processamento dei campioni di interesse determina un importante effetto degradativo del DNA presente all'interno degli stessi, per questo si è reso necessario testare 7 diverse metodiche di estrazione di DNA. La valutazione del metodo che meglio si adatta alle caratteristiche delle matrici prese in considerazione è stata effettuata analizzando diversi parametri a cui è stato assegnato un peso secondo l'approccio matematico definito dalla "Fuzzy Logic" abbinato con gli "Expert Weigth".

Dopo aver identificato la metodica di estrazione più adatta è stato effettuato un test per determinare il livello di degradazione del DNA estratto da tutte le matrici processate. A questo scopo sono state identificate 7 coppie di primer in grado di fornire, a seguito di reazioni di amplificazione mediante la tecnica di PCR, frammenti di amplificazione di lunghezza differente di 100pb in un range tra le 90pb e le 700pb. In lavori precedenti

(Hammer, 2008) era stato dimostrato che il frammento di maggior lunghezza amplificabile da matrici quali “passate di pomodoro” è di 506pb, per quanto riguarda le prove effettuate nel caso di questo lavoro sono stati ottenuti frammenti di lunghezza massima di 400pb per le matrici meno processate, mentre per quelle più lavorate, la lunghezza massima ottenibile è stata di 300pb.

Un problema importante, relativo alla commercializzazione dei pomodori, è legato ad eventuali frodi nei confronti del consumatore dovute alla sostituzione di prodotti DOP (denominazione di origine protetta) e IGP (identificazione geografica protetta) con prodotti generici a basso costo. A tale scopo sono state scelte 20 cultivar di pomodoro da mensa e da industria. Il DNA estratto da queste cultivar è stato amplificato, in reazioni di amplificazione mediante PCR, con 12 coppie di primer per microsatelliti (SSR). Dopo elettroforesi capillare sono stati identificati profili allelici utilizzati per ottenere matrici di distanze con cui è stato costruito un albero filogenetico (UPGMA) con il software WinBoot. Data l'elevata vicinanza genetica degli ibridi commerciali di pomodoro presi in esame si è ottenuta una distizione poco netta dei gruppi (cluster); è stato comunque possibile distinguere, con qualche eccezione, i pomodori da industria da quelli da insalata. Calcolando il $P_{(ID)}$ (probabilità di identità) è stato possibile individuare il numero minimo di SSR utilizzabili per distinguere una varietà tra quelle prese in considerazione se mischiata con altre con una probabilità di errore $p < 0,05\%$ (per gli SSR presi in esame il numero minimo utilizzabile è quattro). È stato amplificato e caratterizzato con alcuni SSR il DNA estratto dalle matrici commerciali, in questo modo è stato possibile rilevare alleli in comune tra il DNA estratto dalle matrici “passate” e dalle cultivar; indicazione importante dell'applicabilità della metodologia alla tracciabilità dei prodotti provenisti dalla filiera commerciale del pomodoro.

L'ultimo aspetto preso in considerazione in questo lavoro è stato studiare l'influenza dell'arsenico sullo sviluppo delle specie di pomodoro commerciali. L'arsenico può essere naturalmente presente nell'ambiente, ma le fonti maggiori di contaminazioni da tale elemento sono dovute all'attività umana. Lavori precedenti hanno dimostrato come diverse piante di interesse agronomico, come fagiolo, riso e pomodoro, sono in grado di assumere l'arsenico presente nel terreno e trasferirlo alle parti edibili della pianta. L'ingestione di vegetali contaminati da arsenico è la maggiore in cui l'uomo entra in contatto con il metalloide, per questo si è reso necessario studiare i meccanismi di interazione tra arsenico e pomodoro. A tale scopo sono state effettuate prove di germinazione in vitro di 8 cultivar

commercili a diverse concentrazioni di arsenito (As(III)) e arseniato (As(V)) in presenza e in assenza di silicio. Le stesse cultivar sono state fatte crescere in terriccio universale e, arrivate all'età di tre mesi, trattate con As(V) in presenza e assenza di silicio. Le varietà che sono risultate più interessanti, cioè quelle che hanno mostrato un comportamento definibile accumulatore o escludere, quasi sempre più tolleranti, verranno testate tramite crescita in vitro. Tali dati potranno essere utilizzati come indicazione per la coltivazione di determinate varietà in regioni i cui terreni e acque per l'irrigazione sono contaminati da arsenico.

Bibliografia

- *"Genome mapping and molecular breeding of tomato"* Foolad M.R., International Journal of Plant Genomics 2007, 2007:52-58.
- *"Foods derived from genetically modified organisms and detection methods"* Hemmer W., BATS report 2/97, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland 2008.
- *"The influence of arsenic concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants"* Carbonell-Barrachina A.A, Burlo F., Burgos-Hernandez A., Lopez E., Mataix J., Scientia Horticulturae 1997, 71:167-176.
- *"Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants – effect of arsenite on plant growth and yield"* Barrachina A.C., Carbonell F.B., Beneyto J.M., Journal of plant nutrition 1995, 18:1237-1250.
- *"The response of tomato "Lycopersicon Esculentum" to different concentration of inorganic and organic compounds of arsenic"* Tulstos P., Szakova J., Pavlikova D., Balik J., VERSITA biologia, Bratislava 2006, 61:91-96.

Indice

INTRODUZIONE	10
La Tracciabilità Alimentare	11
La Sicurezza Alimentare	12
Il Libro bianco della Comunità Europea.....	13
Legislazione Europea in ambito di sicurezza alimentare.....	15
Pubblicità ed etichettatura degli alimenti.....	17
I prodotti tipici.....	20
Cosa possono fare le biotecnologie per la sicurezza alimentare.....	21
La Food Genomics	23
Individuazione delle frodi.....	27
Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi nei prodotti a base di carne.....	28
Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi nei prodotti a base di pesce.....	30
Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi sui molluschi.....	32
Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi nei prodotti lattiero-caseari.....	33
Applicazione della food genomics all'identificazione degli allergeni alimentari.....	35
Le filiere alimentari e agroalimentari	37
La filiera del pomodoro.....	38
La Storia.....	38
Classificazione Botanica.....	39
Caratteristiche botaniche della specie.....	40
Le varietà commercializzate.....	41
Fabbisogno e approvvigionamento di sementi.....	42
Pratiche colturali.....	43
Terreno e successioni colturali.....	43
Lavorazioni del terreno.....	44
Fertilizzazione.....	44
Impianto.....	46
Irrigazione.....	47
Raccolta.....	48
Le fasi della filiera del Pomodoro.....	48
Lavaggio.....	49
Cernita.....	49
Produzione di pomodori pelati.....	49
Produzione di passate di pomodoro.....	50
Concentrato di pomodoro.....	51
Il succo di pomodoro.....	52
Ketchup.....	52
Succo di pomodoro essiccato in polvere e Flocchi di pomodoro.....	53
Problemi tipici riscontrabili nei prodotti a base di pomodoro.....	53
Frodi.....	53
Contaminanti.....	54
Microrganismi.....	55
MESSA A PUNTO DI UN METODO DI ESTRAZIONE DI DNA APPLICABILE AI DIVERSI PRODOTTI DELLA FILIERA DI TRASFORMAZIONE DEL POMODORO	58
Introduzione	59
L'estrazione del DNA da matrici complesse.....	59
Cambiamenti del DNA durante la produzione di alimenti.....	59
I contaminanti del DNA.....	61

Gli artefatti di PCR.....	61
Scopo della ricerca.....	62
Materiali e metodi.....	63
I Campioni utilizzati.....	63
Metodi di estrazione del DNA testati.....	63
<i>Protocollo basato su SDS</i>	63
<i>Metodo CTAB</i>	64
<i>Modifica del metodo CTAB</i>	64
<i>QIAamp DNA Stool Minikit</i>	65
<i>NucleoSpin Food</i>	65
<i>ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit</i>	65
<i>Wizard kit</i>	65
Quantificazione del DNA estratto.....	66
Primer utilizzati per PCR in singolo.....	66
Test di amplificabilità del DNA estratto mediante PCR.....	67
Studio di degradazione del DNA mediante PCR.....	68
Fuzzy logic.....	70
Risultati e discussione.....	72
Qualità e quantità del DNA estratto.....	72
Amplificabilità del DNA estratto.....	74
Livello di degradazione del DNA estratto dalle diverse matrici.....	75
Valutazione dell'efficacia dei metodi di estrazione mediante la Fuzzy logic.....	76

CARATTERIZZAZIONE VARIETALE DI ALCUNE CULTIVAR DI POMODORO LOCALI DA MENSA E DA INDUSTRIA - IL PROBLEMA DELLA “IDENTITY PRESERVATION” (IP)..... 79

Introduzione.....	80
L'importanza del riconoscimento varietale.....	80
<i>Alcuni esempi di riconoscimento varietale a fini commerciali</i>	80
Identificazione varietale del riso Basmati.....	80
Identificazione varietale della patata.....	81
Identificazione varietale del grano tenero nella pasta.....	82
Identificazione varietale delle olive all'interno dell'olio di oliva.....	82
I marcatori molecolari.....	84
<i>RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)</i>	85
<i>AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)</i>	86
<i>RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	86
<i>SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)</i>	88
<i>SNP (Single Nucleotide Polymorphism)</i>	88
<i>SSR (Simple Sequence Repeat)</i>	89
Artefatti di genotipizzazione ottenibili mediante l'impiego di SSR.....	90
Scopo della ricerca.....	91
Materiali e Metodi.....	92
I campioni utilizzati.....	92
<i>Campioni fogliari</i>	92
<i>Campioni commerciali</i>	92
Estrazione del DNA genomico da foglie.....	92
Estrazione del DNA genomico da pomodori e derivati.....	92
Quantificazione del DNA estratto.....	93
Primer utilizzati per l'analisi SSR.....	93
Amplificazione del DNA estratto.....	94
Analisi dei marcatori molecolari.....	95

Costruzione di un albero filogenetico.....	95
Valutazione del pannello di microsatelliti in analisi	95
Risultati e discussioni.....	97
Genotipizzazione delle varietà analizzate	97
Applicazione della tecnica degli SSR	100
Prospettive future	102
ANALISI DELL'EFFETTO DELLA PRESENZA DI ARSENICO NEL TERRENO SULLA CRESCITA DELLE PIANTE DI POMODORO	103
Introduzione.....	104
L'arsenico	104
Fattori che determinano la presenza di arsenico nell'ambiente	104
<i>Fattori naturali che influenzano la presenza di Arsenico nell'ambiente</i>	104
<i>Fattori antropici che influenzano la presenza di Arsenico nell'ambiente</i>	105
Comportamento dell'arsenico nel suolo	107
Il comportamento dell'arsenico nell'uomo	109
Il comportamento dell'arsenico nelle piante	110
Il comportamento delle piante di pomodoro in presenza di arsenico.....	112
L'importanza del silicio	113
Scopo del lavoro	114
Materiali e Metodi.....	115
Varietà analizzate	115
Terreni di crescita	115
<i>Terreni per le colture in vitro</i>	115
<i>Terreno per la crescita in vivo</i>	115
Prove di germinazione in vitro.....	116
Prove di crescita in terreno.....	116
Prove di crescita in vitro	117
Campionamento	117
<i>Prove di crescita in terriccio</i>	117
<i>Prove di crescita in vitro</i>	118
Analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM/EDX)	118
Analisi statistica	120
Risultati e discussioni.....	121
Prove di germinazione	121
Prove di crescita in terriccio	123
Prospettive future	134
CONCLUSIONI FINALI	135
<i>Sigle e abbreviazioni</i>	139
BIBLIOGRAFIA	140
SITOGRAFIA	141
BIBLIOGRAFIA.....	142
<i>Ringraziamenti</i>.....	165

INTRODUZIONE

La Tracciabilità Alimentare

Quando si parla di tracciabilità, in generale, occorre far riferimento ad alcune definizioni contenute nelle principali norme nazionali ed internazionali. Secondo la normativa ISO 8402, per tracciabilità si intende *“la capacità di risalire alla storia e all’uso o alla localizzazione di una entità mediante identificazioni registrate”*; tale definizione viene poi ripresa e migliorata all’interno della norma UNI EN ISO 9000 ed espressa come *“capacità di risalire alla storia, all’utilizzazione o all’ubicazione di ciò che si sta considerando”*.

Tuttavia, le principali definizioni alle quali fare riferimento per la tracciabilità alimentare sono contenute nella norma UNI 10939 (Sistemi di rintracciabilità nelle filiere agroalimentari - Principi generali per la progettazione e l’attuazione), che definisce la *“rintracciabilità di filiera”* come *“la capacità di ricostruire la storia e di seguire l’utilizzo di un prodotto mediante identificazioni documentate relativamente ai flussi materiali e agli operatori di filiera”* e nel Regolamento (CE) n. 178/2002, alla base di tutta la legislazione europea in materia di sicurezza alimentare e stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare. Tale regolamento istituisce inoltre l’Autorità europea per la sicurezza alimentare, fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare e definisce la rintracciabilità come *“la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione”* (articolo 3, comma 15).

Pertanto, le procedure di tracciabilità sono state rese obbligatorie da tale regolamento (178/2002) a partire dal 2005 allo scopo di far sì che tutto ciò che entra nei prodotti destinati ad alimentazione umana (dai mangimi per gli animali che entrano a far parte del consumo umano fino agli ingredienti e additivi) possa conservare una traccia della propria storia; in questo modo è possibile seguire il percorso di un alimento partendo dalle materie prime fino alla tavola del consumatore, al fine di identificare una filiera produttiva per garantire la sicurezza alimentare del cittadino-consumatore.

La normativa vigente in materia di sicurezza alimentare estende le norme di tracciabilità a tutti i prodotti agroalimentari, non solo ai prodotti più a rischio per la salute pubblica, quali carni, pesce e uova, per i quali si sono verificate emergenze sanitarie che hanno indotto il legislatore ad intervenire.

Occorre però fare una distinzione tra "tracciabilità" e "rintracciabilità". Anche se questi due termini vengono usati spesso come sinonimi, ma in realtà identificano due processi speculari: la tracciabilità è il processo che segue il prodotto da monte a valle della filiera in modo che, in ogni stadio vengano lasciate opportune tracce (informazioni); la rintracciabilità è il processo inverso: deve essere in grado di raccogliere le informazioni precedentemente rilasciate.

Per permettere l'identificazione o rintracciabilità di ogni passaggio di trasformazione durante il ciclo produttivo di ogni prodotto la tracciabilità viene suddivisa in tre tipi:

- "Upstream Traceability" o tracciabilità a monte: riguarda le fasi antecedenti la produzione come la coltivazione agricola, il trasporto e la prima trasformazione;
- "Internal Traceability" o tracciabilità interna: si applica a tutti i passaggi di produzione del prodotto alimentare all'interno di un unico attore; in questo tipo di tracciabilità deve essere chiarito in modo esplicito in che punto della produzione entra ogni ingrediente, che processo di stoccaggio e trasformazione subisce e come viene conservato il prodotto finito;
- "Downstream Traceability" o tracciabilità a valle: viene applicata a tutti i processi di distribuzione fino al consumatore finale.

Da quanto detto si evince che la tracciabilità non fornisce una particolare qualità aggiuntiva ai prodotti, è solo uno strumento neutro che comporta però un'assunzione di responsabilità, in campo di tutela della salute pubblica, da parte di ciascun attore della filiera alimentare.

Nonostante il sistema di tracciabilità tenda a favorire il consumatore, ponendo in atto tecniche per il riconoscimento delle materie prime degli intermediari e del prodotto finito, solleva alcune polemiche: da parte del produttore sulla realizzabilità delle pratiche all'interno di un sistema produttivo reale, mentre da parte del consumatore sul livello di ripercussione economica delle pratiche di tracciabilità sul prezzo finale del prodotto.

La Sicurezza Alimentare

La sicurezza alimentare viene considerata come la possibilità di garantire in modo costante e generalizzato acqua ed alimenti per soddisfare il fabbisogno energetico umano che l'organismo necessita per la sopravvivenza e la vita, in condizioni igieniche.

La sicurezza degli alimenti è una responsabilità che coinvolge tutti i soggetti della "filiera alimentare", e deve essere assicurata durante tutto l'articolato percorso che gli alimenti devono compiere per giungere sulla nostra tavola. I produttori di materie prime, le aziende

che le trasformano in alimenti finiti, chi li trasporta, chi li vende e chi li prepara nei luoghi pubblici di ristorazione devono seguire regole precise, stabilite dalle autorità competenti, per garantire che gli alimenti siano ineccepibili dal punto di vista della sicurezza.

L'industria di prima e seconda trasformazione seleziona le materie prime e si preoccupa di immagazzinarle correttamente fino al momento del loro utilizzo. In seguito le trasforma in prodotti finiti grazie, da una parte, all'abilità, alle conoscenze scientifiche e alla preparazione tecnica delle proprie maestranze specializzate, dall'altra parte, ad impianti e processi tecnologici di grande affidabilità. I prodotti vengono quindi confezionati, etichettati, imballati, immagazzinati e preparati per il trasporto. Quest'ultima fase è molto importante e delicata, assicura al consumatore un prodotto in perfette condizioni di conservazione.

In particolare, per tutti quegli alimenti che devono mantenere determinate condizioni, devono essere indicate le modalità di trasporto e conservazione.

L'ultimo anello di questa articolata catena è il consumatore, che sceglie ed è responsabile della fase finale del processo di conservazione nella propria abitazione. Per gustare le qualità originarie dei prodotti acquistati è, infatti, indispensabile rispettarne le temperature e le norme di conservazione sia durante il trasporto che a casa.

Secondo le statistiche dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, però, ben il 12,9% delle intossicazioni alimentari si verifica nell'ambiente domestico. Il ruolo del consumatore è quindi di fondamentale importanza ed è proprio al consumatore che la Commissione Europea vuole fornire informazioni efficaci e chiare che consentano di conoscere gli alimenti e di trattarli in piena sicurezza.

Il consumatore è, infatti, l'ultimo anello della catena alimentare. Tutto l'impegno dell'industria e degli altri soggetti della filiera, in materia di sicurezza alimentare, è volto a offrirgli un prodotto buono, sano e soprattutto sicuro.

Il Libro bianco della Comunità Europea

Le motivazioni che hanno spinto la Comunità Europea al varo del regolamento 178/02 (Libro Bianco sulla sicurezza alimentare) sono incentrate soprattutto sulla sicurezza alimentare che il consumatore si aspetta da un prodotto. Infatti, i principali obiettivi che la Comunità Europea persegue possono essere riassunti nei seguenti punti:

- Superare l'eterogeneità delle legislazioni nazionali;
- Conquistare la fiducia dei consumatori ed operatori;

- Creare condizioni omogenee di concorrenza;
- Istituire un'autorità per gli alimenti capace di razionalizzare l'azione comunitaria nel settore e conferirle autorevolezza.

Il Libro Bianco sulla sicurezza alimentare si inserisce nel più ampio progetto della Comunità Europea di attuare una strategia completa e organica nel campo della sanità pubblica. Questo proposito viene attuato attraverso un insieme di azioni volte a completare e modernizzare la legislazione dell'Unione Europea in materia di alimentazione, in modo da renderla più coerente, più comprensibile e più elastica. Ciò dovrebbe consentire una sua migliore e più ampia applicazione e fornire una maggiore trasparenza ai consumatori garantendo un alto grado di sicurezza nel settore alimentare. Problematiche riguardanti l'alimentazione umana e animale come encefalopatia spongiforme bovina e presenza di diossina nelle carni di pollo hanno evidenziato carenze nella concezione e nell'applicazione della regolamentazione alimentare all'interno dell'Unione Europea. Queste situazioni hanno stimolato la Commissione Europea a includere la promozione di un alto livello di sicurezza alimentare tra le sue problematiche politiche per i prossimi anni. Come sottolineato dal Consiglio Europeo, riunitosi ad Helsinki nel Dicembre del 1999: *“occorre in particolare migliorare le norme di qualità e rafforzare i sistemi di controllo su tutta la catena alimentare, dall'azienda agricola al consumatore”* (Signorini et al., 2001).

Il regolamento 178/02 ha introdotto un approccio metodologico innovativo al comparto alimentare nel suo insieme; il quale si articola nel seguente modo:

- *Approccio globale*: estendere la legislazione alimentare all'intera filiera di un prodotto (dal produttore fino al consumatore);
- *Rintracciabilità*: è il vincolo di maggiore portata per l'agricoltura, viene applicato a qualsiasi alimento umano e zootecnico e per ciascuna sostanza che entra a far parte dell'alimento e lungo tutta la filiera,
- *Controlli e valutazioni condotti con metodi scientifici da soggetti indipendenti*: si seguono i principi base della certificazione di qualità. Piani di controllo e uso di analisi strumentali che impongono il vincolo che il certificatore sia un soggetto terzo;
- *Analisi del rischio generalizzato*: esteso a tutti i prodotti alimentari (uomo/animali) permette di effettuare valutazione, gestione e comunicazione del rischio;
- *Principio della precauzione su base uniforme*: questo afferma che in materia di sicurezza alimentare quando sussistono carenze conoscitive su processi o prodotti che possono

essere dannosi, ne deve essere vietata l'adozione (es.: divieto di uso di materiale di propagazione O.G.M.). così facendo si arriva ad un criterio di applicazione di detto principio in maniera uniforme su tutto il territorio comunitario.

- *Nuovi organi comunitari*: la nascita dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare.

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (Food Authority) è un organo indipendente, che in collaborazione con le Agenzie Nazionali, fornisce pareri scientifici competenti sugli aspetti legati alla sicurezza degli alimenti. La "Food Authority" funge inoltre da riferimento per la gestione di sistemi di allarme rapido e per la comunicazione con i consumatori in materia di questioni sanitarie e sicurezza alimentare.

L'istituzione dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare consente di disporre di un unico organismo specifico con le proprie autorità a supporto dell'azione normativa e operativa da parte delle istituzioni europee e di creare i presupposti di immagine affinché i consumatori riacquistino la fiducia nella politica alimentare.

Considerando quanto detto, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare è quindi chiamata a realizzare un sistema di comunicazione con le agenzie e gli organismi scientifici nazionali. Il regolamento consente alla Commissione Europea di dotarsi di un organismo di collegamento e affiancamento con gli stati membri quale il "*Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli alimenti*".

Vengono inoltre proposte nuove norme europee in materia di etichettatura per regolamentare l'intera filiera alimentare, compresa quella mangimistica, per attribuire in modo chiaro le responsabilità primarie alle industrie, ai produttori ed ai fornitori. All'interno del Libro Bianco sulla sicurezza alimentare viene assegnato un ruolo rilevante alla figura dei consumatori e al loro diritto di ottenere informazioni chiare e precise sulla qualità degli alimenti e sui loro ingredienti, per consentire loro scelte consapevoli. In base alle direttive del Libro Bianco, l'etichettatura deve diventare uno strumento utile per permettere al consumatore di avere tutte le informazioni possibili su ogni prodotto (<http://www.ambientediritto.it>).

Legislazione Europea in ambito di sicurezza alimentare

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA European Food Safety Authority) è la chiave di volta dell'Unione Europea (EU) per quanto riguarda la valutazione dei rischi relativi alla sicurezza alimentare umana e animale. L'EFSA fornisce consulenza

scientifica indipendente e comunicazione chiara sui rischi esistenti ed emergenti in ambito agro-alimentare; lavora in stretta collaborazione con le autorità nazionali e in aperta consultazione con le parti interessate.

L'obiettivo principale della politica di sicurezza alimentare della Commissione Europea è quello di garantire un alto livello di protezione della salute umana e degli interessi dei consumatori riguardo agli alimenti, tenendo in considerazione le diversità, inclusi i prodotti tradizionali e garantendo al tempo stesso l'efficace funzionamento del mercato interno.

Il principio guida della Commissione, stabilito in primo luogo nel Libro Bianco sulla sicurezza alimentare, consiste nell'applicare una strategia integrata "dai campi alla tavola", che copra tutti i settori della catena alimentare, inclusa la produzione di mangimi, la produzione primaria, la produzione alimentare, l'immagazzinamento, il trasporto e la vendita al dettaglio.

I cardini della politica europea in ambito di sicurezza alimentare prevedono alcuni punti chiave condivisi da tutti gli stati membri. I punti cardine sono basati sull'idea che i consumatori vogliono fruire di alimenti sani e sicuri, quindi il compito dell'Unione Europea è quello di garantire che il cibo consumato abbia lo stesso standard (elevato) per tutti i cittadini, che si tratti di un prodotto nostrano o importato da qualsiasi paese dentro e fuori l'UE. Gli elementi essenziali della strategia UE per la sicurezza alimentare sono:

- norme sulla sicurezza dei prodotti per l'alimentazione umana e animale;
- consulenza scientifica indipendente e pubblicamente disponibile;
- applicazione delle regole e controllo dei procedimenti;
- riconoscimenti del diritto dei consumatori di scegliere in base a informazioni esaurienti sulla provenienza dei cibi e sul loro contenuto.

A partire dal 1° Gennaio 2005 le aziende che producono alimenti e mangimi devono garantire la tracciabilità dei prodotti alimentari, dei mangimi per animali e dei loro ingredienti lungo tutta la catena alimentare. Con questa misura è stata completata la revisione totale della legislazione dell'Unione Europea in materia di sicurezza degli alimenti, iniziata anni prima. Dal 1° Gennaio 2006 ulteriori norme igieniche aggiornate sono entrate in vigore. Oltre alla legislazione generale, valida per tutti i prodotti alimentari e i mangimi, l'Unione Europea ha adottato anche leggi specifiche riguardanti specifici aspetti della sicurezza degli alimenti in generale e in particolare di determinati prodotti alimentari; quali per esempio: l'uso dei pesticidi per gli ortaggi e la frutta, degli integratori alimentari per gli animali, dei coloranti in generale, degli antibiotici e degli ormoni nella produzione degli alimenti,

l'aggiunta di vitamine, minerali e sostanze analoghe in alimenti. Anche i prodotti che sono a contatto con gli alimenti, come gli imballaggi sono soggetti ad una normativa rigorosa. Norme rigorose disciplinano la commercializzazione, la vendita, l'etichettatura e la tracciabilità dei raccolti e dei prodotti alimentari che contengono organismi geneticamente modificati (OGM). Dato l'elevato numero di normative da rispettare e il rigore delle stesse in ambito agroalimentare, quando nuovi Stati aderiscono all'Unione Europea, ed entrano quindi a far parte del mercato unico europeo, vengono spesso adottate per essi misure transitorie per consentire loro di adeguarsi alla normativa vigente. Durante il periodo di adattamento i loro prodotti alimentari, che non rispondono a queste norme, non possono essere esportati verso altri paesi dell'Unione Europea.

Pubblicità ed etichettatura degli alimenti

La pubblicità è un aspetto estremamente importante poiché i consumatori sono una parte attiva delle politiche alimentari; il Libro bianco dell'UE fa riferimento a tre linee di azione principali:

- accrescere la trasparenza sui controlli ed i pareri scientifici;
- migliorare l'etichettatura dei prodotti (comprendendo anche il difficile problema dell'indicazione delle caratteristiche nutrizionali);
- regolare la pubblicità sugli alimenti secondo parametri univoci e non contraddittori.

Secondo la Comunità Europea diventa opportuno sviluppare anche una vasta azione di educazione e formazione in materia alimentare del consumatore. In questo ambito, alcune limitate azioni sono state promosse dalla Commissione, coinvolgendo soprattutto le Associazioni dei consumatori.

Secondo le indicazioni della Direttiva Europea 89 del 2003, le etichette possono riportare una tabella nella quale è indicato (in kilocalorie) il valore energetico dell'alimento e la quantità in percentuale e in grammi dei principali nutrienti contenuti nel prodotto, ad esempio: proteine, carboidrati, grassi, fibre, vitamine e sali minerali. Tutte queste informazioni devono essere anche nella lingua del paese di vendita. Gli alimenti geneticamente modificati devono essere riconoscibili con un'appropriata dizione in etichetta o nell'elenco degli ingredienti.

Le esigenze generali da rispettare sono che *l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità* dei prodotti alimentari non possono essere tali da:

- indurre l'acquirente in errore sulle caratteristiche o sugli effetti di tali prodotti alimentari,
- attribuire ad un prodotto alimentare delle proprietà farmacologiche quali prevenzione, trattamento e di cura di una o più malattie umane riconosciute dal sistema sanitario nazionale.

Inoltre, l'etichettatura dei prodotti alimentari deve riportare le seguenti menzioni obbligatorie:

- *La denominazione di vendita*: si tratta della denominazione prevista per il prodotto dalle disposizioni comunitarie che a questo si applicano ovvero, in assenza, secondo le disposizioni legislative o gli usi dello Stato membro di commercializzazione. La denominazione di vendita dello Stato di produzione viene ammessa tranne nel caso in cui, nonostante le altre indicazioni obbligatorie e l'aggiunta di altre informazioni descrittive, possa generare confusione nello Stato di commercializzazione.

La denominazione di vendita deve comportare inoltre un'indicazione sullo stato fisico e sul procedimento di trattamento del prodotto alimentare (ad esempio: in polvere, liofilizzato, surgelato, concentrato, affumicato, ...) nei casi in cui una tale omissione potrebbe creare confusione. L'indicazione di un eventuale trattamento ionizzante è per contro sempre obbligatoria.

- *L'elenco degli ingredienti*: preceduti da un'indicazione "ingredienti"; questi devono essere elencati in ordine decrescente di importanza ponderata e designati con il loro nome specifico, con la riserva di alcune deroghe previste da:
 - l'allegato I (Categorie di ingredienti la cui indicazione della categoria può sostituire quella del nome specifico - ad esempio: "olio", "burro di cacao", "formaggio", "verdura", ...)
 - l'allegato II (Categorie di ingredienti obbligatoriamente designati con il nome della loro categoria, seguito dal nome specifico o dal numero CE - ad esempio: colorante, acidificante, emulsionante, umettante, ...)
 - l'allegato III (Designazione degli aromi) della direttiva.

In alcuni casi, l'indicazione degli ingredienti non viene richiesta, per esempio: per la frutta e per la verdura fresca, per le acque gassate, per gli aceti di fermentazione, per i formaggi, per il burro, per il latte e per la crema fermentata, nonché per i prodotti che contengono

un solo ingrediente, in questi casi la denominazione di vendita è identica al nome dell'ingrediente o permette di determinare la natura dell'ingrediente senza confusione.

La normativa prevede che l'etichetta contenga, per alcuni ingredienti, anche:

- *La quantità degli ingredienti o delle categorie di ingredienti espressa in percentuale*: ciò è obbligatorio quando gli ingredienti figurano nella denominazione di vendita, sono posti in rilievo sull'etichetta o sono essenziali per caratterizzare un elemento determinato: alcune eccezioni sono tuttavia previste.
- *La quantità netta*: questa indicazione deve figurare espressa in unità di volume per i prodotti liquidi e in unità di peso per gli altri prodotti. Disposizioni particolari sono tuttavia previste per i prodotti alimentari venduti al pezzo e per i prodotti alimentari solidi presentati in un liquido di copertura.
- *La data di durata minima/massima*: questa data comprende il giorno, il mese e l'anno, tranne per gli alimenti di durata inferiore a 3 mesi (sono in tal caso sufficienti il giorno e il mese), gli alimenti di durata massima di 18 mesi (sono sufficienti in tal caso il mese e l'anno) o di una durata superiore a 18 mesi (è sufficiente l'indicazione dell'anno). La data di durata non è richiesta nel caso di frutta e verdura fresche non trattate, dei vini e delle bevande contenenti dal 10% di alcool o più, delle bevande dissetanti non alcoliche, dei succhi di frutta e delle bevande alcoliche in recipienti di oltre 5 litri destinati alle collettività, dei prodotti di panetteria, di confetteria e pasticceria, degli aceti, del sale da cucina, degli zuccheri solidi, delle gomme da masticare e dei gelati individuali. Per quanto riguarda alcuni prodotti alimentari particolarmente deperibili, occorre indicare, oltre alla data limite di consumo, anche i seguenti dati:
 - *Le condizioni particolari di conservazione e di utilizzazione*;
 - *Il nome o la ragione sociale e l'indirizzo del fabbricante, o del confezionatore* ovvero di un venditore con sede nel territorio della Comunità;
 - *Il luogo d'origine o di provenienza*, nel caso in cui una sua omissione possa indurre il consumatore in errore;
 - *Le istruzioni per l'uso*, se necessario;
 - *La menzione del titolo alcolometrico volumico* acquisito per bevande con un titolo superiore all'1,2 % di alcool in volume.

Infine, va ricordato come le indicazioni da fornire devono essere facilmente comprensibili, visibili, leggibili e indelebili. Tuttavia sono previste alcune disposizioni particolari per quanto riguarda:

- *Le bottiglie di vetro riutilizzabili e gli imballaggi di piccole dimensioni*
- *Gli alimenti preimballati*: le indicazioni obbligatorie devono figurare sul preimballaggio o su un'etichetta collegata. Allorquando i prodotti preimballati vengono commercializzati a un livello anteriore alla vendita al consumatore finale o sono consegnati a collettività per essere trattati, le indicazioni possono figurare soltanto sui documenti commerciali purché la denominazione di vendita, la data di durata minima e il nome e l'indirizzo del fabbricante o del confezionatore figurino sull'imballaggio esterno del prodotto alimentare;
- *Gli alimenti presentati non preimballati alla vendita o gli alimenti imballati in occasione della vendita su richiesta del compratore*: gli Stati membri devono determinare le modalità di presentazione delle indicazioni obbligatorie.

I prodotti tipici

Con il sempre maggior interesse da parte di organi di comunicazione (mass media) e dei consumatori verso i prodotti tipici regionali si avverte la mancanza di contributi di studio e di articolate valutazioni che, nella prospettiva della filiera agroalimentare e dell'agricoltura in particolare, possano offrire indicazioni esaustive sul ruolo e sulle problematiche del settore.

L'VIII Rapporto Nomisma sull'Agricoltura Italiana (Nomisma 2005) intende offrire un preciso contributo in tal senso puntando l'attenzione al tema delle produzioni tipiche intese quali realtà che mantengono vincoli produttivi diretti con il territorio di origine e, quindi, con i sistemi agricoli di riferimento.

Partendo dalla quantificazione dell'effettivo ruolo economico detenuto dalle produzioni tipiche, in particolare i prodotti alimentari con denominazione U.E., nel sistema agroalimentare italiano sia in termini diretti che indotti, e completando il quadro con confronti internazionali ed approfondimenti tematici (aspetti normativi, analisi di filiera, politiche di settore), la ricerca biotecnologica applicata mira ad identificare i vincoli di sviluppo insiti nelle singole filiere al fine di indicare le possibili aree ed ipotesi di intervento.

Questo anche con la finalità di definire i tratti fondamentali di un impianto organico di politica per le produzioni tipiche che, al momento, stenta a trovare un'univoca ed efficace definizione, sia a livello nazionale che comunitario.

Tutta l'Europa è ricca di un'immensa varietà di prodotti alimentari, tuttavia quando un prodotto diventa conosciuto al di fuori dei confini nazionali si trova in un mercato in cui altri prodotti si definiscono genuini e ostentano uno stesso nome. Questa concorrenza sleale non solo scoraggia i produttori ma risulta fuorviante per i consumatori. Per questa ragione nel 1992 la Comunità Europea ha creato alcuni sistemi noti come DOP (Denominazione di origine protetta), IGP (Identificazione geografica protetta) e STG (Specialità Tradizionale Garantita) per promuovere e tutelare i prodotti agroalimentari.

La *Denominazione d'Origine Protetta* (DOP) identifica la denominazione di un prodotto la cui produzione, trasformazione ed elaborazione devono aver luogo in un'area geografica determinata e caratterizzata da una perizia riconosciuta e constatata identificata dal consorzio di tutela e indicata nel disciplinare di produzione.

L'*Indicazione Geografica Protetta* (IGP), il legame con il territorio è presente in almeno uno degli stadi della produzione, della trasformazione o dell'elaborazione del prodotto. Inoltre, il prodotto gode di una certa fama grazie anche alla tradizione storica.

Una *Specialità Tradizionale Garantita* (STG) non fa riferimento ad un'origine ma ha per oggetto quello di valorizzare una composizione tradizionale del prodotto o un metodo di produzione tradizionale.

Cosa possono fare le biotecnologie per la sicurezza alimentare

In ambito di sicurezza alimentare le biotecnologie offrono diverse nuove prospettive. In queste aree le ricerche sono volte all'applicazione delle biotecnologie nel campo della nutrizione animale, della fisiologia, della qualità e sicurezza dei prodotti con particolare attenzione all'applicazione delle stesse allo sviluppo di nuovi "strumenti diagnostici" e test genetici per migliorare il livello di tracciabilità alimentare.

Questo tipo di ricerca consente inoltre un aggiornamento culturale di fondamentale importanza in grado di fornire le basi per una chiara e corretta comunicazione all'opinione pubblica delle applicazioni e dell'impatto delle biotecnologie sulla sicurezza alimentare e sulle produzioni animali ai fini dell'idoneità al consumo, della tutela della salute pubblica e del benessere animale e ambientale.

Nella società moderna, la ricerca di un rapporto ottimale tra sapere e salute alimentare, diventa una norma di prevenzione necessaria per il benessere dei cittadini. La sicurezza alimentare è considerata una delle priorità sia dall'opinione pubblica sia dalle istituzioni.

In quest'ottica aumenta l'esigenza di fare in modo che tutta la produzione agro-alimentare ed industriale del cibo venga garantita da una certificazione che ne attesti l'origine e segua le modificazioni che la materie prime subiscono durante la trasformazione lungo la filiera, dato l'aumento della complessità delle tecniche di lavorazione e produzione messe in atto. L'importanza di un completo controllo della catena alimentare, per garantire sicurezza e ridurre al minimo i rischi, costituisce il motivo base per svolgere ricerche nel settore della valutazione, caratterizzazione e controllo delle caratteristiche qualitative degli alimenti (Unioncamere, Unione Italiana Delle Camere Di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura, 2003).

Le biotecnologie offrono interessanti prospettive nel settore della sicurezza alimentare per quanto riguarda l'identificazione varietale nei vegetali, l'introduzione di nuove varietà, la certificazione del materiale commercializzato (controllo dell'identità varietale in tutti i processi di propagazione, tutela dei brevetti e dei costitutari, definizione dell'originalità di una nuova varietà), la tutela della DOP (denominazione di origine protette), dell'IGP (indicazione geografica protetta) e della AS (attestazione di specificità). È possibile applicare approcci di tipo biotecnologico alla selezione assistita con marcatori molecolari (MAS), agli studi tassonomici, nonché a tutte le attività correlate con la ricerca scientifica pura (Gentile, 2003).

La sicurezza alimentare riveste un ruolo di notevole interesse per ciò che riguarda le ricerche in campo biotecnologico.

La produzione industriale di alimenti comporta l'utilizzo di fertilizzanti, antiparassitari, anticrittogamici, diserbanti, l'attuazione di manipolazioni chimico-industriali, con additivi, conservanti, coloranti, aromi artificiali e bio-chimici, ormoni e antibiotici perseguendo obiettivi di costante miglioramento delle procedure di trasformazione (Manzelli, 2004). Tutte queste procedure accrescono l'incertezza sul rischio per la salute del consumatore; in quest'ottica il concetto di "qualità" riveste una notevole importanza non solo per le qualità organolettiche del prodotto ma che si estende a nuovi parametri.

In questa prospettiva la sicurezza alimentare riveste un ruolo determinante anche in ambito socio-culturale, portando ad un'ampia crescita culturale attraverso un sistema di educazione

permanente dei cittadini. L'obiettivo è fornire al consumatore tutte le informazioni necessarie per conoscere il percorso di un alimento dalla produzione alla tavola. Il problema attuale pertanto si concretizza in alcune specifiche peculiarità che comprendono: ricerca, buone pratiche di produzione, salubrità, genuinità, qualità e rintracciabilità. Questi parametri sono tra loro strettamente connessi e identificano la sicurezza alimentare, non tanto come assenza di nocività e di pericolosità, ma come un continuo e costante controllo a livello dell'intera filiera produttiva. In particolare si rende necessario difendere e valorizzare le materie prime, il territorio e la biodiversità (Federalimentare, Federazione Italiana dell'Industria Alimentare, 2004).

La Food Genomics

La "Food Genomics" nasce in parte dall'esigenza dei consumatori di ricevere chiare ed accurate informazioni sugli alimenti che acquistano, per fare delle scelte consapevoli per la loro dieta ed anche dal diritto/dovere dei produttori di tutelare gli standard previsti dalla legge. Quindi l'etichettatura degli alimenti deve descrivere con rigore e accuratezza la composizione dei prodotti; questo in modo particolare se l'alimento è stato processato, rendendo gli ingredienti non facilmente distinguibili.

Uno degli ambiti in cui la "Food Genomics" risulta utile è quello della determinazione delle frodi alimentari. Le frodi alimentari infatti sono modifiche apportate intenzionalmente ai prodotti alimentari per ricavarne illeciti guadagni. Le frodi più comuni possono essere classificate in:

- adulterazioni;
- sofisticazioni ;
- falsificazioni;
- contraffazioni.

Le adulterazioni propriamente dette sono dovute alla sostituzione di una parte del prodotto con un altro di diversa origine o più basso costo economico. Alcuni esempi di adulterazione sono l'aggiunta di orzo torrefatto nel caffè macinato, l'aggiunta di acqua al vino o al latte e l'asportazione di una parte pregiata del prodotto come ad esempio l'eliminazione dei grassi dal latte, l'aggiunta di oli a basso costo ad olio pregiato.

Le sofisticazioni sono aggiunte di sostanze non previste dai disciplinari di produzione. Esempi tipici di sofisticazione sono rappresentati dall'aggiunta di coloranti alla pasta per farla

sembrare all'uovo, di clorofilla alle confezioni di piselli per ravvivare il colore verde, o di nitriti alle carni per farle sembrare più rosse. La legislazione consente il miglioramento di un prodotto, ma occorre rispettare le norme che prevedono il tipo e la quantità di additivi che è possibile aggiungere, per non incorrere in una sofisticazione.

Le falsificazioni sono le frodi più gravi nel settore agroalimentare, consistono nella sostituzione di un prodotto con un altro, un esempio è l'utilizzo della margarina al posto del burro.

Le contraffazioni, infine, si verificano soprattutto a livello di marchi di prodotti tipici che vengono usati indebitamente (contraffazioni dei marchi formaggio parmigiano, mozzarella di bufala della Piana del Sele).

Un'etichettatura "fraudolenta" può portare a conseguenze serie per la salute umana, specialmente nei confronti di consumatori portatori di allergie e/o intolleranze alimentari. Le allergie alimentari sono considerate un grave problema per la tutela della salute pubblica, specialmente nei paesi sviluppati. Recentemente l'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'Unione Europea hanno emanato una lista di allergeni, in ordine di potenziale pericolosità, che devono essere riportati in etichetta (Direttive 2000/13/EC e 2003/89/EC).

Una corretta etichettatura è necessaria per consentire al consumatore una scelta consapevole, in coerenza con credi religiosi o stili di vita come il vegetarianismo. La legislazione in materia di etichettatura è quindi una necessità non solo per tutelare il consumatore, ma anche per garantire le stesse industrie alimentari da una potenziale concorrenza sleale.

I metodi analitici usati per l'identificazione di determinate specie animali o vegetali in prodotti alimentari sono basati sull'analisi di proteine e del DNA (acido deossiribonucleico). L'identificazione di proteine avviene principalmente attraverso l'identificazione immunologica (Haza et al., 1999; Kaw et al., 2008) e tecniche elettroforetiche e cromatografiche (Richter et al., 1999; Veloso et al., 2002; Ferreira et al., 2003).

La "Food Genomics" è l'uso della Genomica, e quindi delle sue tre componenti (genetica intesa come l'uso di marcatori molecolari, automazione e bioinformatica), in campo alimentare.

La genomica è una branca della biologia molecolare che si occupa dello studio del genoma degli organismi viventi; in particolare studia la struttura, il contenuto, la funzione e l'evoluzione dell'intero genoma.

La genomica si è sviluppata grazie allo sviluppo di tre componenti che si sono coordinate: la genetica, che studia la natura dell'eredità; l'aumento di strumentazioni automatizzate all'interno dei laboratorio per le analisi ad alta densità di DNA, RNA (acido ribonucleico) e proteine; la bioinformatica che consiste nell'applicazione delle conoscenze informatiche alle informazioni genetiche.

La genetica ha permesso di comprendere come alcuni fenotipi possano essere influenzati direttamente dai geni e come i tratti quantitativi dipendano da un numero elevato di geni e dall'interazione tra genotipo e ambiente (Falconer e MacKay, 1996). La scoperta delle strutture e dei ruoli del DNA e dell'RNA hanno portato la genetica ad evolversi nella genetica molecolare, che a sua volta ha portato all'indicazione che l'eredità nelle generazioni successive è legata alla presenza di specifiche sequenze nucleotidiche.

L'innovazione delle strumentazioni automatizzate di laboratorio per le analisi ad alta densità di DNA, RNA e proteine e l'accessibilità di queste da parte di numerosi laboratori è dipeso dalla crescita della conoscenza della biochimica degli acidi nucleici. La capacità di generare dati molecolari sulle sequenze (nucleotidiche e proteiche) è aumentata esponenzialmente durante i decenni passati e i costi per l'ottenimento di un dato sono scesi drasticamente. L'utilizzo di queste strumentazioni ha permesso, e permette tuttora, di monitorare simultaneamente il comportamento di un numero massiccio di geni da una popolazione di RNA messaggeri e ha reso possibile osservare come l'espressione genica differenziale possa influenzare alcune vie biosintetiche basilari. (Lockhart e Winzeler, 2000). In questo modo sono state chiarite anche alcune vie di espressione e si stanno cominciando a identificare i passaggi limitanti di queste vie. Nello stesso modo è stato possibile iniziare studi, tuttora in corso, per determinare come cambiamenti ambientali possano influire sull'espressione genica.

La Bioinformatica si colloca al confine tra biologia, matematica, statistica e scienze computazionali; è una disciplina che utilizza le conoscenze dell'informatica per identificare e allineare le sequenze di DNA e proteina, per individuare la putativa funzione e struttura di un gene, e per predire come i geni o i loro prodotti interagiscono per creare una rete genetica. La bioinformatica, grazie ad algoritmi in grado di assegnare ipotetiche funzioni alle sequenze nucleotidiche, fornisce gli strumenti che permettono di descrivere le basi genetiche di un fenotipo e facilita la predizione del fenotipo da sequenze di geni e dalle informazioni associate ad essi (Perteau e Salzberg, 2002).

La genomica a sua volta viene suddivisa in due branche: la genomica strutturale e la genomica funzionale. La genomica strutturale studia la struttura fisica dei genomi, incluso la sequenza e l'organizzazione dei geni; si occupa di generare mappe fisiche che descrivono la localizzazione dei geni sui cromosomi, raccoglie le informazioni sulla struttura dei geni stessi, incluse le regioni promotrici, le regioni codificanti e le sequenze terminatrici. La genomica funzionale, invece, si focalizza sui prodotti genici, sui trascritti e sulle interazioni tra geni, creando mappe di giunzione, di "linkage", raccogliendo informazioni sull'interazione genica, sui profili di espressione genica, e sull'associazione di geni specifici con un determinato fenotipo.

Nei decenni scorsi si è assistito ad un incremento senza precedenti nella comprensione del genoma di un vasto numero di organismi. Tra questi, la pubblicazione del genoma sequenziato della prima pianta, *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative (AGI), 2000) e più recentemente la pubblicazione del genoma sequenziato di due sottospecie di riso *Oryza sativa* (Goffe et al, 2002; Yu et al., 2002) rappresentano le grandi pietre miliari della biologia vegetale (Leader, 2005).

La Food Genomics comprende tutte le tecniche genomiche applicate all'analisi degli alimenti e degli ingredienti che li costituiscono, attraverso tutte le fasi di produzione della filiera alimentare.

Le metodiche molecolari basate sulla Polymerase Chain Reaction (PCR) offrono un valido supporto per l'identificazione delle frodi rivelandosi di facile realizzazione, sensibili, specifiche ed economiche, rispetto alle tradizionali analisi chimiche. L'uso di sistemi di analisi "hightrouput" quali microarray e micro-chip abbinati ad una continua crescita dei sistemi di miniaturizzazione potranno permettere lo sviluppo di sistemi sempre più rapidi e di facile applicazione.

Il DNA inoltre è più stabile rispetto alle proteine, è presente in tutti i tessuti ed è più resistente alle alte temperature, tipiche dei processi industriali di preparazione degli alimenti. La PCR permette in generale di amplificare sequenze specifiche partendo sia da DNA sia da RNA, analizzando estratti di varia natura, anche con composizione estremamente complesse come ad esempio: sangue, capelli, tessuti di diversa origine, alimenti, resti archeologici datati milioni di anni. Negli ultimi anni gli sviluppi nel campo della genomica, della bioinformatica e l'utilizzo di nuove metodologie di analisi in grado di gestire numeri sempre maggiori di campioni, l'aumentata conoscenza sul DNA estratto dagli alimenti, hanno portato alla nascita della "Food Genomics".

Gli sviluppi delle metodologie molecolari hanno reso possibile l'individuazione di differenze nel DNA di individui appartenenti a popolazioni, specie o generi diversi che consentano la loro identificazione e/o classificazione. Tali sequenze identificative o descrittori sintetici sono dette "marcatori molecolari". Analizzando i residui di DNA presenti nell'alimento finito è possibile risalire all'organismo (o agli organismi) che ha fornito la materia prima e stabilire la conformità con quanto dichiarato dal produttore (Marmioli et al., 2003).

Individuazione delle frodi

Le indagini da effettuare per verificare se un alimento è adulterato o meno non sono semplici e in molti casi richiedono di conoscere preventivamente il tipo di adulterazione e, in alcuni casi, è necessario stabilire anche l'entità dell'adulterazione stessa. Attualmente sono state sviluppate molte tecniche analitiche sia chimiche sia biochimiche per determinare la composizione degli alimenti tuttavia le metodologie molecolari hanno preso piede anche nel campo della tracciabilità alimentare. Molte tecniche analitiche non sono in grado di distinguere tra ingredienti strettamente correlati, basta pensare al caso delle adulterazioni dell'olio d'oliva con l'olio di nocciolo. Nonostante ciò le analisi basate sul DNA hanno un potere discriminante maggiore, in quanto la definizione di una varietà, o di una specie, dipende unicamente dalle sequenze di DNA presenti nel suo genoma. Il DNA inoltre è più resistente alla degradazione dovuta alle trasformazioni alimentari rispetto ad altre molecole organiche e quindi può essere ritrovato anche in alimenti altamente processati.

La maggior parte delle tecnologie basate sul DNA messe a punto fino ad ora per determinare l'autenticità degli alimenti prevedono l'uso della PCR. L'applicazione delle tecniche di PCR per l'amplificazione di DNA presente all'interno degli alimenti ha dei limiti. Occorre considerare che il DNA negli alimenti, a causa dei processi di produzione, è particolarmente degradato, per cui i frammenti bersaglio non dovrebbero essere più lunghi di 200 bp, per questo motivo occorre che anche l'estrazione del DNA da queste matrici sia ottimizzata sia per avere un quantitativo di DNA sufficiente per le analisi sia per ridurre o eliminare gli inibitori della PCR.

Sono stati messi a punto metodi robusti basati sul DNA in grado di determinare o confermare l'identità di diversi tipi di carne, di pesce, per identificare le varietà di patate impiegate nei derivati, per distinguere le linee originali di riso Basmati e gli ibridi dal riso a chicchi lunghi, per determinare la presenza di tessuti neuronali nella carne processata. Ad oggi, è possibile

quantificare la presenza di soia geneticamente modificata in diversi prodotti alimentari, così come la presenza del grano comune nella pasta di grano duro, e di diverse specie di carne nei prodotti di macelleria (Woolfe and Primrose, 2004).

Nelle indagini forensi alimentari i problemi maggiori che si incontrano nell'utilizzo di tecnologie basate sul DNA sono:

- Il recupero di DNA in qualità e quantità sufficienti da matrici alimentari complesse;
- Il livello di degradazione del DNA dovuta al processamento degli alimenti

Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi nei prodotti a base di carne

Le prospettive di applicabilità, soprattutto nel campo della tracciabilità dei prodotti alimentari a base di carne, sono stati la forza motrice da cui si sono sviluppati i maggiori studi sul genoma degli animali impiegati nelle produzioni alimentari. È un fatto oggettivo che, ad oggi, tutte o quasi, le procedure di tracciabilità dei prodotti alimentari di origine animale sono basate su tecniche che utilizzano il DNA al fine di garantire l'esatta provenienza degli alimenti (Lasagna et al., 2005).

Un'adulterazione frequente dei prodotti alimentari di origine animale è la sostituzione o l'aggiunta di carne di maiale (*Sus scrofa*), più economica, a preparati di carne di manzo (*Bos taurus*). La contaminazione con carne di maiale può portare, per il consumatore, problemi di intolleranze, allergie nonché all'introduzione di microrganismi patogeni peculiari di questa specie; sono inoltre emergenti anche problematiche etniche e religiose legate all'utilizzo di questo tipo di carni. La prima tecnica per determinare la presenza di carne di suino in miscele di carne fresca di suino e manzo è stata pubblicata da Meyer et al. nel 1994. La metodologia si basa sui CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), questa tecnica prevede la generazione di frammenti RFLP (Random Fragment Length polymorphism) del gene codificante per il citocromo b che è un gene polimorfico.

Attualmente le analisi sul gene codificante il citocromo b vengono ampiamente utilizzate per determinare le specie animali e aviarie nei prodotti di macelleria e nei prodotti ittici. Il gene codificante per il citocromo b è localizzato sul DNA mitocondriale, è un gene presente in multicopia quindi è più abbondante e facilmente rintracciabile, in più il DNA mitocondriale sopporta meglio il processamento perché è protetto dalla struttura del mitocondrio che lo contiene (Woolfe and Primrose, 2004; Aida et al., 2007; Che et al., 2007).

Questo metodo è stato ampiamente utilizzato per mettere a punto alcuni test sui prodotti di macelleria. Più tardi, Hunt ed altri (1997) hanno utilizzato sequenze di DNA satellite specie-specifiche come sonde in “Southern blot” per identificare carne di capra, di coniglio, di agnello, di maiale e di manzo nelle materie prime, nei prodotti cucinati e in scatola.

L'utilizzo del gene del citocromo b presenta un limite nel caso in cui l'identificazione della specie adulterante debba essere quantitativa. Per ovviare a questo inconveniente sono stati individuati geni alternativi a singola copia. Un esempio è il gene codificante per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Utilizzando una breve sequenza di questo gene, di lunghezza inferiore a 125 bp, è possibile distinguere tra il maiale, il manzo, l'agnello, il pollo e il tacchino. Il metodo basato sul gene GAPDH può identificare fino allo 0,5% di ogniuna di queste specie target in presenza di una o più delle altre specie, anche nella carne in scatola e in presenza di altri ingredienti come l'amido di patata (Woolfe and Primrose, 2004). In un lavoro successivo di Laube et al., (2003) viene inoltre riportata la possibilità di poter identificare tracce di carne di suino e di manzo in miscele di diciotto differenti specie animali con un limite di rivelazione pari a 0.1% (w/w).

Oggigiorno tuttavia, nel caso della carne, l'uso dell'analisi dei CAPS è stato sostituito con l'uso del “TaqMan[®] assay”, che determina i polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP), utilizzando sonde marcate in modo fluorescente disegnate su questo tipo di marcatori.

La tecnologia Real-Time PCR ha permesso lo sviluppo di approcci quantitativi basati sull'utilizzo di sonde TaqMan raggiungendo limiti di rivelazione pari a 0.80 pg di DNA bersaglio in miscele complesse. (López-Andreo et al., 2005; López-Andreo et al., 2006). La PCR si rivela inoltre uno strumento utile e in grado di affiancare le normali analisi microscopiche, nella determinazione della presenza di resti animali in mangimi per la zootecnia. (Martín et al., 2007).

Un secondo aspetto toccato dalla normativa è la definizione di carne, gli avanzi di lavorazione non sono considerati “carne”, quindi in etichetta deve essere dichiarata l'identità e il contenuto di tessuto non muscolare. L'abilità di identificare il tessuto neuronale all'interno dei prodotti a base di carne assume una decisa rilevanza per la salute pubblica. Un traguardo importante da raggiungere in ambito di tracciabilità delle carni è la possibilità di riconoscere i diversi tessuti della stessa specie ed essere in grado di quantificarli, perché tutti i tessuti presentano esattamente lo stesso DNA. Una soluzione a questo problema è stata proposta da McDowell e dal suo gruppo e consiste nell'esplorare le differenze nello stato di metilazione

dei promotori tra il tessuto muscolare e non. Queste differenze epigenetiche nella metilazione del promotore sono associate alla specifica e permanente attivazione dei geni, il cui stato (attivato/non attivato) può essere diverso in tessuti differenti. Di conseguenza l'impiego di questa strategia può permettere la distinzione dei tessuti. A tale scopo il gruppo di McDowell ha utilizzato il promotore del gene codificante per la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), utilizzando miscele di tessuti, il sistema è stato in grado di determinare la contaminazione nel tessuto muscolare fino allo 0,01% (w/w) per quanto riguarda il tessuto spinale, mentre per quanto riguarda contaminazioni da tessuto cerebrale la tecnica è risultata meno sensibile (Woolfe and Primrose, 2004).

Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi nei prodotti a base di pesce

Le frodi commerciali legate a sostituzione di specie pregiate con specie di minor pregio non espressamente dichiarate in etichetta, incidono in modo rilevante sul valore commerciale di un alimento. L'identificazione di specie nell'ambito dei prodotti ittici preparati e trasformati assume grande importanza alla luce delle nuove disposizioni comunitarie in materia di tracciabilità e rintracciabilità alimentare. Il Reg. CE 2065/2001, relativo alle norme per l'etichettatura dei prodotti ittici, prevede l'indicazione in etichetta della denominazione commerciale, della denominazione scientifica, del metodo di produzione e della zona di cattura solo per taluni prodotti della pesca.

Quando una specie ittica viene sostituita con un'altra, il danno per il consumatore non è solo di tipo economico-commerciale (sostituzione con una specie di minor pregio), ma potrebbe anche avere risvolti di carattere sanitario. In Italia alla fine degli anni settanta, alcune persone morirono a seguito di avvelenamento da tetrodotossina, per aver mangiato tranci di pesce palla (*Tetraodon miurus*) al posto di code di rospo (*Lophius piscatorius*).

Per questo motivo il legislatore ha espresso divieto di commercializzazione di alcune specie di pesce, oltre ai tetraodontidae troviamo i canthigasteridae, diodontidae, molidae (D.Lgs 531/92 art. 5), alcuni squaliformi (*Somniosus microcephalus*, *Carcharhinus leucas*) ed i gempilidae (*Ruvettus pretiosus*, *Lepydocibium flavobrunneum*), presenti nelle acque nazionali (nota Min. 15420/AL.22 ISS, Uff. IX del 5/7/1999 nonché la nota EFSA del 30 /8/2004, n. Q 2004, 016).

Altri tipi di frode nel settore ittico sono rappresentati dalla sostituzione di bivalvi sgusciati precotti nostrani con bivalvi esotici, non sempre raccolti in aree controllate per la presenza di

biotossine (termoresistenti), dalla sostituzione di filetti di pesce persico nostrano o di cernia, con il persico del Nilo, più volte sottoposto a divieti commerciali per problemi igienico-sanitari perché proveniente da zone con acque inquinate.

In quest'ottica le analisi di laboratorio devono essere in grado di fornire risposte rapide e specifiche per l'identificazione corretta dei prodotti ittici, anche quando l'identificazione di specie ittiche diventa incerta a causa della rimozione delle caratteristiche tassonomiche in seguito ai processi di cottura o preparazione. Le tecniche analitiche in grado di individuare differenze a livello molecolare diventano quindi fondamentali per identificare le diverse specie.

In questi anni le metodiche di laboratorio più affidabili per il riconoscimento di specie sono l'isoelettrofocalizzazione o focusing isoelettrico (IEF) delle proteine e le tecniche di biologia molecolare basate sulla PCR. La tecnica IEF è risultata molto valida sia per l'identificazione di prodotti freschi sia congelati. Negli Stati Uniti la Food and Drug Administration (FDA) ha realizzato una "Regulatory Fish Encyclopedia" dove, per quasi un centinaio di specie ittiche commercializzate, vengono fornite informazioni riguardo le caratteristiche morfologiche e i traccianti della IEF metodo AOAC (Association Of Analytical Communities, 1990), a cui saranno associati, in futuro, informazioni sulle sequenze di DNA.

Le metodologie basate sulla PCR per l'identificazione delle specie ittiche riguardano sia amplificazioni su DNA genomico sia su DNA mitocondriale (Asenio et al., 2001; Pascoal et al., 2008), utilizzando primer specie specifici (Céspedes et al., 1998), PCR RFLP (Hold et al., 2001; Quintiero et al., 2001), PCR SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) (Asenio et al., 2001) e RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (Asenio et al., 2002).

Wolf et al., (1999) hanno descritto una semplice metodica basata sulla tecnica PCR RFLP per identificare ventitre diverse specie di pesce tra cui, salmone, tonno e merluzzo bianco. Attraverso l'uso di questa tecnica, analizzando una regione specifica del citocromo b, è stato possibile discriminare anche tra carne proveniente da dieci specie di salmone fresco.

L'elettroforesi capillare abbinata alla metodologia dei marcatori molecolari RFLP ha portato allo sviluppo di un'analisi capace di discriminare tra dieci differenti varietà di pesce bianco. Il test è stato applicato a pesce fresco, congelato e parzialmente lavorato. Il risultato ha permesso la realizzazione di una serie di profili RFLP, riproducibili, che possono essere

utilizzati per analisi di “fingerprinting”, senza necessità di avere a disposizione materiale di riferimento (Dooley et al., 2005).

Un'altra possibile frode a livello commerciale consiste nella sostituzione di sogliola (*Solea solea*) con halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). La tecnica PCR RFLP, analizzando sequenze mitocondriali del citocromo b, ha portato all'identificazione delle due specie in modo soddisfacente sia utilizzando primer specifici (Lahiff et al., 2001) sia primer universali come richiede la metodica RFLP classica (Skurikhina et al., 2008).

Anche il tonno è una specie ittica soggetta a frequenti adulterazioni e sofisticazione, in particolare quando lavorato e inscatolato. I maggiori problemi derivano dalla sostituzione di specie appartenenti alla stessa famiglia *Thunnidae*, ma anche all'utilizzo di altre tipologie di pesci come gli squaliformi. Rehbein et al., (1998) hanno utilizzato l'analisi dei polimorfismi di conformazione a singolo filamento (SSCP) di tre ampliconi del gene codificante per il citocromo b per distinguere tra diverse specie di tonno e sarda nei prodotti in scatola. Più tardi, questo stesso gruppo ha semplificato il metodo sequenziando un amplicone di 464 bp del gene per il citocromo b e ha selezionato sei profili RFLP da utilizzare per distinguere dieci specie di salmone (Russel et al., 2000). Venti laboratori in Europa hanno valutato il metodo cercando di identificare dieci campioni sconosciuti attraverso il confronto con i profili RFLP delle specie autentiche ottenendo il 96% di successo (Hold et al., 2001). La scoperta che tale amplicone di 464 bp è altamente polimorfico ha permesso la corretta identificazione di ventuno su ventiquattro specie ittiche (Hold et al., 2001). L'approccio quantitativo per l'identificazione di specie è stato proposto nel 2005 da Lopez e Pardo, in questo contesto è stato sviluppato un saggio basato sull'impiego della tecnologia TaqMan, attraverso sonde disegnate sulla sequenza del gene 16S ribosomiale, per discriminare tra tonno pinna gialla, più pregiato (*Thunnidae albacares*) e tonno pinna blu (*Thunnidae allunga*) meno pregiato.

Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi sui molluschi

La corretta etichettatura dei prodotti risulta importante al fine di identificare la presenza di molluschi per tutelare le categorie di consumatori allergiche a tali prodotti. Di conseguenza la Direttiva 2003/89/CE, specifica che l'etichettatura deve riportare gli ingredienti che possono essere potenzialmente allergenici, tra questi viene riportata la presenza di pesce e crostacei (Reg. CE 104/2000; Reg. CE 2065/2001; Reg. CE 178/2002; Reg. UE n. 852, 853 e Reg. UE 854/2004).

Ruditapes decussatus, *Venerupis pullastra* e *Ruditapes philippinarum* sono le specie di vongole comunemente disponibili nei supermercati, la prima specie è la più pregiata e apprezzata del consumatore, quindi soggetta più frequentemente a sostituzioni fraudolente. Per differenziare tra queste tre specie Fernández et al., (2000) hanno sviluppato una tecnica basata sui marcatori PCR RFLP, utilizzando primer specie specifici per il gene dell'actina, un ulteriore lavoro dello stesso gruppo ha migliorato tale tecnica sviluppando la PCR SSCP applicata al medesimo gene; in questo modo si distinguono le tre diverse specie (Fernandez et al., 2002).

Un secondo prodotto ittico che riveste notevole importanza dal punto di vista commerciale sono le cozze. Con il termine “cozze” si raggruppano un vasto numero di genere e di specie, ma il genere comunemente usato per la commercializzazione fresca e la preparazione di alimenti è il genere *Mytillus*. La vendita di questi prodotti privi di guscio e congelati rende difficile l'identificazione attraverso caratteristiche morfologiche. Sono state sviluppate tecniche PCR-RFLP e di sequenziamento applicati alla tracciabilità a livello molecolare di questi prodotti. Il sequenziamento del gene ribosomiale 18S e la successiva analisi RFLP hanno permesso di identificare e discriminare tra quattro specie di molluschi (*Mytillus californianus*, *Perna viridis*, *Perumitylus purpuratus* e *Semimytilus algosus*) (Rego et al., 2002); mentre l'identificazione di quattro specie di *Mytilus* (*M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* e *M. chilensis*) è stata invece realizzata da Santaclara et al., (2006) attraverso l'amplificazione selettiva del gene per la proteina adesina e la sua successiva analisi RFLP.

Applicazione della food genomics all'individuazione delle frodi nei prodotti lattiero-caseari

Le più comuni frodi nel settore lattiero-caseario sono rappresentate dalla sostituzione di latti ad alto valore aggiunto (Pecora, Capra, Bufala, Asina) con latte vaccino; tali frodi diventano importanti per la salute pubblica, soprattutto per i consumatori allergici.

L'identificazione della specie vaccina di provenienza del latte è di fondamentale importanza per verificare la conformità ai disciplinari di produzione di molti prodotti lattiero-caseari con denominazione DOP/IGP (Maudet et al., 2001; Bottero et al., 2003). La sostituzione con latte diverso da quello contemplato nei disciplinari di produzione è un reato di particolare gravità e si configura come frode in commercio. Le metodologie basate sulla PCR hanno trovato, negli ultimi anni, una sempre più vasta applicazione nell'identificazione di specie negli alimenti di origine animale.

Nel 1993 Lipkin et al., hanno dimostrato come le cellule somatiche presenti nel latte possano essere usate come fonte di DNA; da qui sono stati sviluppati numerosi approcci, basati sulla PCR, in grado di differenziare latte proveniente da vacca, pecora, capra e bufala (Bania et al., 2001; Mayer, 2005). Branciaro et al., (2000) hanno dimostrato che è possibile estrarre DNA amplificabile da latte pastorizzato, filtrato, ultrafiltrato e in polvere. Ulteriori lavori hanno dimostrato come sia possibile ottenere DNA conforme per le analisi non solo partendo dalle diverse tipologie di latte ma anche da formaggi, questo ha portato alla possibilità di identificare eventuali adulterazioni con latte non conforme ai disciplinari di produzione (Plath et al., 1997; Mafra et al., 2004; Meyer, 2005).

Plath et al., (1997), amplificando il gene della beta-caseina, hanno sviluppato una metodica PCR RFLP in grado di discriminare tra latte proveniente da vacca, pecora, capra e bufala. La stessa metodica è stata applicata a formaggi preparati con miscele standard di questi differenti tipi di latte, con un limite di determinazione dello 0,5% (w/w).

Utilizzando primer specie specifici mitocondriali, Maudet and Taberlet (2001) hanno abbassato il limite di rivelazione allo 0,1% (w/w), riuscendo a identificare latte di vacca in formaggi standard realizzati con miscele note di latte proveniente da vacca e pecora. Gli stessi autori hanno riportato l'identificazione attraverso PCR di latte prodotto da vacche "Prim'Holstein", latte molto pregiato e usato normalmente per la produzione di formaggi francesi. La possibilità di operare in "multiplex PCR" ha permesso di verificare contemporaneamente la presenza di latte derivante da vacca, pecora e capra in formaggi commerciali, utilizzando primer specifici disegnanti sui geni 12S e 16S rRNA (Bottero et al., 2003).

La mozzarella di bufala campana è tra i prodotti più a rischio di adulterazione per l'impiego, durante il processo di lavorazione, di latte di specie diversa da quella indicata dal disciplinare; specialmente il latte vaccino. Il disciplinare di produzione di questo formaggio fresco, tipico dell'Italia meridionale, consente la produzione della mozzarella esclusivamente da latte di bufala e specifica le metodiche ufficiali utilizzate per controllare e rilevare le possibili sofisticazioni dovute all'aggiunta di latte di valore nutrizionale ed economico inferiore. Nel 2008 Reale et al., amplificando con primer specifici la sequenza del citocromo b sono riusciti a identificare, con un limite di 1% (w/w), tracce di latte di vacca in ventidue mozzarelle di bufala campana su trenta campioni analizzati. La sensibilità della metodica è stata poi saggiata per l'identificazione di latte di vacca nelle acque di lavorazione dei formaggi, con un limite

variabile tra 0.5% e 0.1% (w/w) (Lopez Calleja et al., 2005). L'approccio quantitativo basato sulla tecnologia TaqMan in Real-Time PCR ha dimostrato che molti campioni commerciali di mozzarella sono contaminati da latte di vacca (Lopparelli et al., 2007).

Altro esempio di adulterazioni identificabili attraverso le metodiche di PCR è la sostituzione con latte di capra di latte proveniente da ovini. L'identificazione della presenza di latte di capra in formaggi di ovino è stata effettuata amplificando la regione di genoma mitocondriale codificante per il 12S rRNA. Tale tecnica ha una sensibilità dell'1% (w/w) (Lopez-Calleja et al., 2005). Gli stessi autori hanno poi trasferito questa analisi in Real-Time PCR per l'identificazione di latte grezzo e trattato in miscele capra/pecora per verificare la fattibilità dell'analisi quantitativa, riscontrando una sensibilità compresa nell'intervallo tra 0.6% e 10% (w/w). (Fajardo et al., 2007).

Applicazione della food genomics all'identificazione degli allergeni alimentari

I metodi di analisi molecolari basati sulla PCR trovano una vasta applicazione nel settore dei prodotti alimentari di origine vegetale, sia nella identificazione varietale, come nel caso dei cereali (Terzi et al., 2005) o dei legumi (Weder 2002), ma anche per la determinazione di potenziali allergeni (Poms et al., 2004).

I cereali, come grano, riso, orzo, sono caratterizzati dalla presenza di proteine di riserva (glutine) nocivi per i consumatori affetti da celiachia. Un'etichettatura dettagliata e veritiera diviene quindi fondamentale per la tutela di questa fascia di consumatori. La celiachia è un'intolleranza permanente al glutine, sostanza proteica presente in avena, frumento, farro, kamut, orzo, segale, spelta e triticale. L'incidenza di questa intolleranza in Italia è stimata in un soggetto ogni 100/150 persone. Ogni anno vengono effettuate 5.000 nuove diagnosi ed ogni anno nascono 2.800 nuovi celiaci, con un incremento annuo di circa il 10%. Per curare la celiachia, attualmente, occorre escludere dalla dieta alcuni degli alimenti più comuni, quali pane, pasta, biscotti e pizza, ma anche eliminare le più piccole tracce di farina da ogni piatto. Questo implica un forte impegno di educazione alimentare. La dieta senza glutine, condotta con rigore, è l'unica terapia che garantisce al celiaco un buono stato di salute.

In ottemperanza al "Codex Alimentarius Commission" della FAO (Food and Agriculture Organization) gli alimenti con la dicitura "assenza di glutine" devono essere prodotti con ingredienti che non contengano prolamine derivate dal frumento, grano duro, riso, orzo, avena, in una percentuale non superiore allo 0.002% (w/w).

I metodi per la ricerca di glutine nei cibi sono basati essenzialmente sull'analisi delle proteine (Poms et al., 2004). Un'alternativa al saggio immunologico, è stata sviluppata utilizzando primer specifici in grado di identificare una contaminazione da glutine inferiore all'1% (w/w) in diversi prodotti commerciali. La tecnica di PCR quantitativa competitiva è stata poi applicata a quindici campioni etichettati come privi di glutine per testare il metodo su prodotti commerciali (Dahiden et al., 2001).

Metodiche di analisi attraverso lo studio dei profili di dissociazione in Real-Time PCR sono state utilizzate su diversi prodotti commerciali per l'identificazione di grano, riso, orzo e avena, i risultati si sono rivelati ben correlati con le tradizionali analisi ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) condotte sui medesimi campioni (Sandeberg et al., 2003).

Le problematiche legate alle allergie alimentari non coinvolgono soltanto il campo medico, ma impongono nuove attenzioni da parte dell'industria alimentare e del settore della ristorazione collettiva. La probabilità di contaminazioni durante la produzione di alimenti preconfezionati o durante la preparazione di piatti pronti è molto alta, per questo motivo è alto il rischio per i soggetti allergici di entrare in contatto con allergeni, anche in modo accidentale. Viste le gravi conseguenze di una reazione allergica, si rende sempre più importante la necessità di adottare sistemi in grado di monitorare le possibili contaminazioni incrociate durante la produzione.

La nocciola (*Corylus avellana L.*) è un potenziale allergene spesso usata come ingrediente in molti prodotti alimentari, sia come pasta sia come olio. Sono stati sviluppati molti metodi per la rilevazione di tracce di nocciola negli alimenti. Uno dei primi è stata una reazione di PCR convenzionale visualizzata su gel di agarosio (Holzhauser et al., 1999) che aveva come bersaglio la sequenza del gene Cor a 1. Questa è stata poi progressivamente migliorata ed affinata, arrivando all'utilizzo delle tecniche Real-Time PCR e PCR-ELISA (Holzhauser et al., 2002). Holzhauser et al., (2002) hanno dimostrato che l'analisi attraverso la PCR-ELISA rispetto ai saggi immunologici risulta maggiormente affidabile su campioni alimentari che hanno subito un processamento termico pesante raggiungendo limiti di rivelazioni pari allo 0,001% (w/w). In seguito è stata sviluppata una PCR accoppiata a cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con una sonda PNA (acido peptidonucleico) (Nielsen et al., 1999) sequenza-specifica (Germini et al., 2005). Nel 2007 Piknova et al., hanno realizzato un approccio quantitativo basato sull'impiego di sonde TaqMan raggiungendo un limite di rivelazione pari allo 0,01% (w/w) su preparati standard di pasta di nocciola.

Le arachidi (*Arachis hypogaea* L.) sono un altro potenziale allergene, nel 2003 è stato pubblicato il primo protocollo in Real-Time PCR per la rilevazione di tracce di arachide in alimenti complessi (Hird et al., 2003); successivamente è stato sviluppato un altro sistema di primer e probe per Real-Time PCR, che è stato confrontato con un saggio di tipo sandwich ELISA: i due metodi hanno dato risultati paragonabili ed entrambi si sono dimostrati idonei a rilevare tracce di arachide negli alimenti complessi come i prodotti da forno commerciali (Stephan e Vieths, 2004). Un metodo introdotto di recente accoppia la PCR convenzionale ad una piattaforma array a sonde PNA per la rivelazione simultanea di nocciola e arachide (Rossi et al., 2006).

Le filiere alimentari e agroalimentari

Per filiera alimentare si intende tutto il percorso che determina la produzione di un alimento, quello che succede “dalla terra alla tavola”, dalle materie prime a quello che mangiamo. È un processo che coinvolge tutti gli attori del sistema: agricoltori, produttori di mangimi e sementi, allevatori, industria di trasformazione, trasportatori e distributori, commercianti all’ingrosso e al dettaglio, fino al consumatore. L’obiettivo comune è offrire al consumatore un prodotto di qualità, sicuro per la salute, differenziato, a prezzo soddisfacente e distribuito in modo efficace e capillare.

L’impegno di tutti i responsabili di ciascuna fase della filiera alimentare nell’esecuzione accurata dei propri compiti, nel rispetto delle norme vigenti e nell’adozione di tecnologie adeguate, è condizione indispensabile per garantire il mantenimento della qualità di ogni alimento, sia in termini di sicurezza sia di gusto.

Per questo motivo la rintracciabilità dei prodotti è considerata una vera e propria pre-condizione del nuovo modo di concepire le filiere alimentari. La rintracciabilità ha la funzione di:

- individuare le eventuali responsabilità;
- ritirare dal mercato in modo mirato un prodotto non conforme,
- garantire il consumatore sulla sicurezza alimentare.

I presupposti base affinché sia possibile rintracciare un prodotto sono:

- documentare i vari passaggi compiuti lungo la filiera
- disporre di elementi conoscitivi e metodici per gli accertamenti strumentali.

La filiera del pomodoro

La Storia

Il Pomodoro o *Solanum lycopersicum* L. è una pianta erbacea che appartiene alla famiglia delle Solanacee, è una pianta originaria della parte meridionale del Nord America e della zona del centro-Sud America in particolare nell'area compresa tra Messico e Perù.

La coltivazione del pomodoro fu introdotta in Europa dagli Spagnoli nel XVI secolo come pianta ornamentale ritenuta velenosa per il suo alto contenuto di solanina. Nel 1544 il pomodoro venne classificato come pianta velenosa dall'erborista Pietro Mattioli; nello stesso periodo al pomodoro venivano attribuiti poteri eccitanti ed afrodisiaci tanto che veniva impiegato dagli alchimisti per produrre filtri magici e pozioni d'amore. Queste proprietà afrodisiache venivano richiamate anche dai nomi che le varie popolazioni europee avevano assegnato al pomodoro: *love apple* gli inglesi, *pomme d'amour* i francesi, *libesapfel* i tedeschi e *pomo d'oro* gli italiani. Altre fonti fanno risalire il nome pomodoro all'espressione pomo dei Mori, perché questo frutto appartiene alla stessa famiglia delle melanzane (solanacee) ortaggio storicamente preferito nel mondo arabo. Con l'evolversi delle conoscenze sul pomodoro e dei diversi linguaggi le espressioni classiche sono state abbandonate e sostituite dal termine azteco *tomatl*. Nella realtà il termine azteco originario era *xitomatl* che significa grande *tomatl* mentre il *tomatl* era una pianta simile al pomodoro ma più piccola con frutti di colore verde-giallo.

Non si conosce ancora il momento esatto in cui il pomodoro è passato da frutto ornamentale a frutto commestibile, anche perché i primi coltivatori peruviani utilizzavano i frutti a solo scopo ornamentale. In Francia nel 1640 la nobiltà di Tolone regalò al cardinale Richelieu quattro piante di pomodoro come atto di ossequio e nello stesso periodo era usanza che gli uomini offrissero piante di pomodoro alle dame come atto d'amor gentile. In questo modo la coltivazione di pomodoro si sviluppò in tutto il bacino del Mediterraneo partendo dalla Spagna attraversando il Marocco trovando un clima idoneo soprattutto in Italia.

Le prime prove dell'utilizzo del frutto come alimento commestibile fresco, spremuto e bollito per farne sugo sono state trovate in varie regioni dell'Europa meridionale nel XVII secolo. La coltivazione di pomodoro a scopo alimentare si è sviluppata principalmente alla fine del Settecento soprattutto in Francia e nell'Italia meridionale. In Francia il pomodoro veniva consumato soltanto alla corte del re; in Italia invece si diffuse rapidamente tra tutta la popolazione.

Le tecniche di conservazione di questo frutto vennero definite nel 1762 in seguito agli studi di Lazzaro Spallanzani che notò come gli estratti fatti bollire e posti in contenitori chiusi non si alterassero. Nel 1809 Nicolas Appert, un cuoco parigino pubblicò l'opera "*L'art de conserver les substances alimentaires d'origine animale et végétale pour plusieurs années*", dove fra gli altri alimenti era citato anche il pomodoro.

Negli Stati Uniti ed in genere nelle Americhe, da cui proveniva, l'affermazione del pomodoro come ortaggio commestibile trovò invece molte più difficoltà per la diffusa convinzione popolare dei suoi poteri tossici. Tuttavia, nel 1820 il colonnello statunitense Robert Gibbon Johnson decise di mangiare, provocatoriamente, davanti ad una folla prevenuta e sorpresa, un pomodoro senza per questo morirne. Si pensa anche che avversari politici di Abraham Lincoln convinsero il cuoco della Casa bianca a preparare una pietanza a base di pomodoro per avvelenarlo. Dopo la cena, la congiura fu scoperta, l'episodio contribuì a rendere popolare il pomodoro e Lincoln ne divenne un appassionato consumatore.

Nonostante tutto il pomodoro è stato inserito nei primi trattati gastronomici europei nel 1819 nell'edizione del "Cuoco Galante" scritta dal cuoco napoletano di corte Vincenzo Corrado, nel quale venivano riportate numerose ricette con pomodori sia farciti che fritti, ma senza mai abbinarlo a pasta o pizza.

Bisognerà aspettare il 1839 per vedere proposte le ricette della pasta col pomodoro e la pasta al ragù nella seconda edizione della "Cucina Teorico Pratica" di Ippolito Cavalcanti, Duca di Buonvicino, che codificò un'usanza diffusa nel popolino.

Classificazione Botanica

Il pomodoro è stato classificato scientificamente per la prima volta da Carlo Linneo nel 1753 nel genere *Solanum*, come *Solanum lycopersicum* (*lycopersicum* deriva dal latino e significa pesca dei lupi).

Nel 1768 tuttavia Philip Miller cambiò il nome, sostenendo che le differenze dalle altre piante del genere *Solanum*, quali patata e melanzana, erano sostanziali, tali da giustificare la creazione di un nuovo genere: da qui il nuovo nome scientifico di *Lycopersicon esculentum*. Questo nome ebbe notevole successo, sebbene fosse contrario alle regole di nomenclatura vegetale, secondo cui, se si sposta la specie in un nuovo genere, il nome della specie (*lycopersicum*) non deve essere cambiato, ma solo il nome del genere: H. Karst corresse l'errore nel 1881 e pubblicò il nome formalmente corretto *Lycopersicon lycopersicum*.

La controversia sul nome scientifico del pomodoro non è tuttavia finita. Innanzitutto il nome di Miller era fino a poco fa il più usato, nonostante l'errore indicato prima. Poi, le moderne tecniche di biologia molecolare hanno permesso di creare precisi alberi filogenetici, che hanno indicato come il pomodoro in realtà faccia parte veramente del genere *Solanum*, dando sostanzialmente ragione a Linneo. Il nome ufficiale è oggi quindi *Solanum lycopersicum* L., sebbene il nome di Miller rimanga ancora in uso in molte pubblicazioni.

Caratteristiche botaniche della specie

Il pomodoro è considerato, in coltura, pianta annuale anche se è tendenzialmente perenne nelle zone di origine. L'accrescimento ed il portamento della pianta viene classificato come determinato o indeterminato a seconda del tipo di crescita: nano, eretto, cespuglioso, con brevi internodi, asse principale e rami laterali che terminano, dopo pochi internodi, con un fiore o una infiorescenza, assenza di germogli laterali.

La fioritura è scalare con progressiva formazione delle infiorescenze in tempi diversi e successivi internodi lungo il fusto principale e secondario. L'infiorescenza è un racemo ascellare o terminale contenente 4-12 fiori, penduli, che si aprono scalarmene. Il fiore è ermafrodita, autofertile, proterogino: la recettività dello stigma (4-8 giorni) inizia alla schiusura della corolla mentre la deiscenza delle antere, che si verifica all'interno del tubo anterico, inizia 1-2 giorni dopo l'antesi. La struttura delle antere, con le teche saldate lateralmente e appese a sottili filamenti, fa sì che esse vibrino al minimo scuotimento facendo cadere il polline sullo stigma e sul tubo anterico. L'autoimpollinazione è favorita dal lungo periodo di recettività dello stigma e dalla posizione dello stigma nei fiori brevistili. Nel caso di fiori longistili lo stilo si trova esposto all'esterno, con elevata probabilità di impollinazione incrociata. La specie è prevalentemente autogama, data la struttura del fiore, con possibilità di alloincrocio che può variare dallo 0,5% al 10% a seconda della varietà e dell'ambiente di coltivazione. L'impollinazione incrociata è essenzialmente di tipo entomofilo. Le varietà di *Lycopersicum pimpinellifolium* L. a stilo protrudente e le varietà a "foglia di patata" di *Lycopersicum esculentum* danno fecondazione incrociata così come anche i primi fiori doppi delle varietà di pomodoro tipo "beefsteak". Il frutto del pomodoro è una bacca di grandezza, colore e dimensioni molto variabili. L'endocarpo è suddiviso in due o più logge, delimitate da setti radiali, contenenti tessuto placentare nel quale si trovano avvolti i semi. Il rapporto percentuale tra le diverse sostanze che compongono il frutto varia notevolmente a seconda del genotipo e delle condizioni colturali e climatiche. Mediamente, la polpa e il succo

costituiscono il 96%-97%, la buccia il 1,5%-2,5% e i semi 1%-1,5%. Il peso di mille semi è di 2,5-3,5 g.

Le varietà commercializzate

Secondo la convenzione UPOVA (Regolamento CE2100/94) per varietà si intende “un insieme di vegetali nell’ambito di un unico taxon botanico del più basso grado conosciuto che possa essere: 1) definito mediante l’espressione delle caratteristiche che risultano da un gruppo o combinazione di genotipi; 2) distinto da qualsiasi altro insieme vegetale mediante l’espressione di almeno una delle caratteristiche e 3) Considerata come unità in relazione alla sua idoneità a moltiplicarsi invariato.”

Le varietà commercializzate sono distinte in due categorie in base alla loro destinazione: per il consumo fresco e per la trasformazione industriale con eventuale utilizzo anche allo stato fresco. Nell’ambito di tali tipologie, le varietà destinate all’industria sono costituite per il 50% da ibridi e per il 50% da varietà a libera impollinazione mentre, per le varietà destinate al consumo fresco, oltre l’85% è costituito da ibridi e il 15% da varietà a libera impollinazione. Le varietà sono caratterizzate dal tipo di accrescimento (determinato, semideterminato, indeterminato), dalla forma e colore del frutto (tonda, allungata, quadrata, ovale, cherry, a grappolo, collettate ecc.). Attualmente risultano iscritte al Registro Nazionale delle Specie Orticole 350 varietà di pomodoro delle quali, circa il 70%, è costituito da ibridi, mentre, ben 65 varietà tradizionali cosiddette “ante 70” risultano iscritte nella sezione “b” del Registro Varietale. Quest’ultima tipologia di varietà prevede che le sementi possano essere controllate soltanto nella categoria “standard” e come tali non sono controllate nella successione genealogica. Tali varietà continuano ad essere coltivate soprattutto per i mercati hobbistici e semiprofessionali. Per quanto riguarda la selezione, la conservazione delle varietà iscritte al Registro, il mantenimento del germoplasma e della purezza per le varietà tradizionali (cosiddette “ante ’70”) avviene in Italia, così come il mantenimento delle linee parentali delle ditte costitutrici italiane. Per le varietà ibride delle ditte estere e multinazionali, nella maggior parte dei casi, la conservazione del germoplasma e dei parentali avviene in altri paesi comunitari o terzi.

Nonostante l’attività di miglioramento genetico del pomodoro a livello nazionale venga effettuato solo da poche aziende costitutrici, il numero di varietà presentate per l’iscrizione al registro nazionale è abbastanza elevato. Ogni anno vengono, infatti, iscritte al Registro

nazionale mediamente 25 nuove varietà di pomodoro. Nel Catalogo Comunitario delle specie ortive risultano iscritte oltre 2500 varietà di pomodoro (www.cpvo.europa.eu).

Fabbisogno e approvvigionamento di sementi

Le sementi di pomodoro distribuite in Italia, nel 2004, sono state stimate dall'ISTAT in 233,1q per il pomodoro da industria e 108,8q per il pomodoro da mensa. In base ai consuntivi statistici pervenuti all'ENSE, nel 2001, sulle sementi di pomodoro della categoria "standard", i quantitativi prodotti risultano 1236,9q, dei quali 353,7q per il riconfezionamento e 883,2q per il primo confezionamento.

L'utilizzo di seme varia dai 0,3 a 1Kg/Ha per gli investimenti consigliati nella semina del pomodoro in pieno campo, dalle 20.000 alle 40.000 piante/Ha per il trapianto del pomodoro da mensa e da 25.000 a 50.000 piante/Ha per il trapianto del pomodoro da industria in pieno campo.

Le sementi utilizzate in Italia sono quasi tutte provenienti e di origine estera in quanto l'intero processo di moltiplicazione del seme avviene in diverse zone del mondo dove il costo della mano d'opera è molto basso. La parte finale della produzione relativa alla selezione, confettatura e confezionamento finale avviene in Italia. A causa dell'elevato impiego di mano d'opera richiesta per le operazioni manuali d'incrocio nella produzione degli ibridi, le aziende sementiere hanno ormai da molti anni dislocato l'attività di moltiplicazione delle varietà ibride di pomodoro nei paesi asiatici quali India, Cina, Thailandia e Turchia e nei paesi del Centro e Sud-America quali Costa Rica, Brasile e Cile. Le superfici coltivate in Italia per la produzione di sementi di pomodoro sono state stimate, nel 2004, a 317 ettari (fonte AIS), e riguardano soltanto varietà a libera impollinazione prevalentemente destinate ai mercati del Nord Africa e dell'Est Europa. La produzione media di seme è di 100-150 Kg/Ha per il pomodoro da industria e 150-200 Kg/Ha per il pomodoro da mensa.

Le superfici a seme sono localizzate in prevalenza in Emilia Romagna con 302 ettari, dove risiedono molte industrie di trasformazione; seguono la Lombardia con 8 ettari, le Marche con 5 ettari e la Puglia con 2 ettari. La produzione e l'estrazione del seme dal frutto è connessa al processo di lavorazione industriale del pomodoro che rende possibile l'utilizzo industriale della polpa del frutto. Le sementi di pomodoro distribuite in Italia appartengono alla categoria "standard" per la quale non è previsto il controllo della successione genealogica dei materiali in riproduzione. Le sementi prodotte sono destinate per l'80% al mercato professionale e per il 20% al settore hobbistico. Le ditte che commercializzano sementi di

pomodoro risultano circa 70, mentre, quelle che effettuano le moltiplicazioni del seme sono in numero molto limitato (6-7). Le ditte sementiere selezionano, confezionano o riconfezionano le sementi riprodotte in Italia e all'estero direttamente o, tramite la lavorazione in conto terzi, presso altre aziende produttrici. Essendo ormai sempre meno diffusa la pratica della semina diretta, l'impianto della coltura avviene prevalentemente tramite il trapianto di piantine di pomodoro, pertanto le sementi sono prevalentemente acquistate dalle aziende vivaistiche specializzate nella produzione commerciale di piantine richieste dalle aziende agricole per il trapianto.

Pratiche colturali

Terreno e successioni colturali

Il pomodoro da industria si adatta a diversi tipi di suolo, tuttavia sono da evitare le condizioni estreme, terreni molto sabbiosi o argillosi e compatti, da preferire invece terreni a medio impasto, tendenti all'argilloso, per migliorare la qualità organolettica del prodotto finale. I limiti di pH del terreno dovrebbero oscillare tra pH 5,5/6 - 7,5/8. Per controllare meglio le malattie fungine, il terreno deve essere ben aerato e lavorato in modo da evitare il ristagno d'acqua.

Il pomodoro è una tipica pianta da rinnovo quindi non deve mai succedere a se stesso in quanto diffonde nel terreno parassiti fungini specialmente *Verticillium* e *Fusarium*, nematodi ed insetti. La rotazione classica prevede frumento/pomodoro, che da ottimi risultati essendo il piano produttivo già ricco. Vi sono anche vecchie rotazioni diffuse soprattutto in Emilia e nella Bassa Padana che possono sostituire la rotazione classica:

- pomodoro/frumento bulato/trifoglio pratense;
- pomodoro/frumento/medica/medica/medica/frumento/pomodoro
- pomodoro/frumento/girasole/frumento/medica/medica/medica/orzo/pomodoro.

L'evoluzione della coltivazione non porta più a praticare la consociazione, anche se su piccole estensioni è comunque consigliabile e dà ottimi risultati soprattutto con le brassicacee comuni come il cavolo tra le file del pomodoro, o, per tutta l'epoca, con il Mais.

Non è consigliabile coltivare pomodoro su terreni investiti precedentemente ad altre Solanacee come patate, melanzane e peperoni. Inoltre, bisogna evitare di coltivare nelle zone limitrofe a carciofaie, asparagiaie, oliveti e vigneti, al fine di prevenire la diffusione di virusi trasmesse da insetti.

Lavorazioni del terreno

Le operazioni colturali devono iniziare con un'aratura principale ad una profondità di circa 30/35cm, eseguita preferibilmente nel periodo estivo-autunnale precedente all'impianto, con terreni in tempera. Si consigliano lavorazioni a doppio strato, al fine di evitare un'eccessiva ossidazione della sostanza organica. Le lavorazioni del terreno vengono concluse con 1 o 2 sarchiature e/o fresature. La sistemazione del terreno ha lo scopo di favorire una gestione ottimale delle risorse idriche evitando fenomeni di asfissia e/o ruscellamento.

Fertilizzazione

La fertilizzazione è elemento di grande importanza non solo per la crescita e la produzione del pomodoro, ma anche per il controllo di malattie e di parassiti, quindi è indispensabile concimare il terreno almeno 30 giorni prima della semina o del trapianto. La concimazione migliore è da considerarsi in relazione al terreno dove si effettua la coltivazione. Per questo motivo è consigliabile effettuare analisi del terreno almeno ogni 5 anni, al fine di individuare il giusto apporto di nutrienti. Ogni rapporto di analisi deve contenere i seguenti parametri minimi: tessitura; sostanza organica; pH; conducibilità elettrica; macroelementi e Sodio.

Le esigenze nutrizionali per la crescita del pomodoro sono elencate qui di seguito:

Azoto: è l'elemento da trattare con maggiore attenzione, perché un eccesso può provocare un'elevata vigoria, che provoca una scalarità di maturazione e maggior suscettibilità ad attacchi fungini. L'assorbimento dell'azoto aumenta progressivamente per diventare rilevante durante il periodo di produzione dei frutti. La carenza in azoto si manifesta con una colorazione verde chiaro delle foglie ed una riduzione della crescita. L'eccesso può provocare una vegetazione eccessiva ed un ritardo nella produzione, e secondo il periodo in cui l'eccesso si manifesta, si possono formare frutti cavi all'interno. La combinazione di un eccesso di azoto e di un apporto scarso in fosforo e potassio può favorire difetti di colorazione. Quando le quantità di azoto sono troppo elevate, si può avere un effetto depressivo sulla crescita. Sul terreno, il pomodoro non sembra avere particolari preferenze tra le forme nitriche ed ammoniacali.

Fosforo: è un elemento che interviene nella crescita delle radici, nella fioritura, nella fecondazione e nella maturazione. I frutti contengono più del 75% delle asportazioni totali. Esso ha un'azione sulla precocità, infatti si è constatato che l'impiego del fosforo determina

un apparato radicale ben formato e migliora la precocità. Le carenze si manifestano con sintomi classici, fusto e parte inferiore delle foglie prendono una colorazione violacea. Le carenze possono essere dovute a mancanza di fosforo nel terreno, attacco parassitario alle radici (nematodi), temperatura del terreno troppo bassa e scarsa luminosità

Potassio: secondo diversi autori, il potassio, ha un'azione sulla qualità (gusto e colore) del frutto e sulla resistenza alle malattie. Come per il fosforo, il potassio favorisce la radicazione. Le carenze si manifestano con una colorazione chiara del fogliame, in seguito appaiono delle macchie decolorate, che necrotizzano. Una carenza di potassio favorisce i difetti di decolorazione sui frutti mentre un eccesso induce carenza di magnesio. Il pomodoro preferisce fertilizzanti senza cloro, nel caso di utilizzo di cloruro di potassio in pieno campo, esso dovrà essere incorporato nel terreno in autunno, al fine di permettere la lisciviazione del cloro.

Magnesio: Il fabbisogno di magnesio varia secondo la produzione e le tecniche di coltivazione. Una corretta somministrazione di magnesio evita in parte i problemi di fermezza e consistenza della polpa dei frutti. Le carenze si manifestano con un ispessimento ed una clorosi internervale delle foglie. Le principali cause di carenza da magnesio dipendono da: carenza dell'elemento nel terreno, mancato assorbimento causato da un eccesso di potassio, asfissia radicale e assenza d'acqua.

Calcio: gioca un ruolo importante per il pomodoro. Una cattiva assimilazione di quest'elemento, dovuto generalmente ad una cattiva gestione dell'irrigazione, provoca la "necrosi o marciume apicale" (BLOSSOM END ROT).

Zolfo: questo elemento è indispensabile alla crescita del pomodoro ed alla formazione e maturazione dei frutti. Da parte di studi olandesi è stato dimostrato che il pomodoro avrebbe un elevato fabbisogno in solfati e che si possono manifestare delle carenze in assenza di fertilizzanti contenenti solfati.

L'apporto di elementi nutritivi alla coltivazione di pomodoro deve essere finalizzato all'ottenimento di una produzione di qualità. I valori degli elementi fertilizzanti da fornire alla coltivazione vanno rapportati ad una produzione media della zona considerando che nelle "Norme di buona pratica agricola" approvate dalla Commissione Europea sono riportati i seguenti valori: "in un terreno di media fertilità e per produzioni intorno a 70-80t/Ha di bacche, le dosi da distribuire sono: 120Kg/Ha di azoto, 120Kg/Ha di anidride fosforica, e 100 Kg/Ha di ossido di potassio" e che le quantità massime di unità fertilizzanti da apportare per ettaro non devono

superare le seguenti soglie: 200 unità di azoto (N), 250 unità di anidride fosforica (P_2O_2) e 150 unità di ossido di potassio (K_2O).

È consigliabile quindi distribuire il 30% della dose totale di azoto nelle fasi successive all'attecchimento delle piantine e la parte rimanente durante l'intero ciclo colturale fino e non oltre i 30 giorni dalla raccolta. L'apporto dei concimi azotati va ridotto a favore di quelli fosfatici nella fase precedente alla fioritura, per evitare eccessi di vigore vegetativo e scarsa fioritura. Il 50% dei concimi fosfatici deve essere distribuito prima dell'aratura principale, ed il rimanente 50% durante l'intero ciclo colturale. Inoltre i concimi potassici devono essere utilizzati solo nel caso in cui i terreni siano carenti in ossido di potassio disponibile, vanno distribuiti nella fase di pre-trapianto fino all'invasatura. È consigliabile apportare sostanza organica, per arricchire il terreno di elementi nutritivi, migliorare le condizioni strutturali e rallentare i fenomeni di stanchezza delle piante.

La coltivazione di pomodoro, in generale, non necessita l'aggiunta al terreno di micronutrienti particolari rispetto a quelli che si trovano già presenti naturalmente nel terreno. Tuttavia, nelle regioni più siccitose e dove i terreni sono più ricchi di sali è buona pratica fornire sali di silicio alle piante di pomodoro in pieno campo. Il silicio, infatti, aumenta la presenza di acqua intracellulare che diluisce i sali minerali che le piante assorbono dal terreno.

Impianto

Il trapianto delle plantule di pomodoro viene effettuato quando le piantine sono fra i 12 ed i 16 cm, allo stadio di 4 - 6 foglie vegetate; il terreno deve aver raggiunto una temperatura di almeno 15°C. L'impianto della coltura può essere a fila singola o binata. Se si decide di utilizzare l'impianto a fila binata è consigliabile mantenere una distanza pari a cm 30-50 sulla fila e tra le fila della bina e 160/180 cm tra asse bina e asse bina. Se al contrario viene scelto l'impianto a fila singola le distanze da mantenere sulla fila dovrebbero essere pari a 30-40cm e a 100-130 cm tra le file.

La densità di piantine per ettaro dipende dalla tipologia di frutto considerato, se vengono seminate piante a frutto allungato la densità d'impianto consigliata è di 27.000-30.000 piante/Ha che può arrivare fino a 35.000-38.000 piante/Ha per le varietà con vegetazione contenuta e compatta. Se si scelgono varietà con frutto tondo la densità d'impianto consigliata è di 30.000-35.000 piante/Ha mentre per le varietà con frutto cherry la densità d'impianto consigliata sale fino a 45.000 piante/Ha.

Irrigazione

Per le acque utilizzate per l'irrigazione è necessario effettuare analisi di diversi parametri almeno ogni 5 anni e i valori devono rispettare le condizioni indicate dalla seguente tabella.

Parametro analizzato	Valore
pH	6,5-7.6
Conducibilità elettrica	<2,5 mS/cm
Salinità	<2,5g/l
SAR	<10
Cloruri	<250ppm
Nitrati	<120ppm
Solfati	<2.200ppm
Bicarbonato	<5meq/l
Coliformi fecali	assenza
Coliformi	<2 CFU

Tabella 1 – descrizione dei parametri chimico- fisici medi delle acque di irrigazione per i pomodori

Le esigenze idriche del pomodoro sono elevate: l'apporto complessivo oscilla intorno ai 5.000-7.000m³/Ha per la tipologia allungata e tonda, ai 1.500–2.000 m³/Ha per il pomodorino. Il metodo di irrigazione consigliato è quello localizzato a goccia, poiché permette alla pianta di avere un apporto idrico costante, con conseguente vantaggio sulla sintesi degli zuccheri.

Il numero di interventi irrigui varia da 30 a 50 per il metodo di irrigazione a goccia, durante l'intero ciclo colturale, in funzione dell'andamento climatico, della natura del terreno e della durata dei turni.

È importante effettuare interventi irrigui nei momenti critici quali: subito dopo il trapianto per favorire l'attecchimento delle piantine, nella fase di sviluppo dell'apparato fogliare con la contemporanea emissione dei fiori per evitarne la cascola e nella fase che va dall'allegazione

all'invasatura per sostenere l'ingrossamento dei frutti. È consigliabile sospendere le irrigazioni almeno una settimana prima della raccolta.

Raccolta

L'epoca di raccolta dipende dalla varietà, dalle condizioni pedoclimatiche e dalla destinazione del prodotto; può essere in casi rari manuale, nella maggior parte dei casi meccanicamente con macchine semoventi/trainate, purché il prodotto non risulti danneggiato. Il momento ottimale per la raccolta meccanica coincide con il raggiungimento della maturazione dell'80% di prodotto in campo, mentre per la raccolta manuale si può raggiungere una maturazione del 90-95%.

Durante la raccolta il prodotto deve essere selezionato, eliminando il prodotto verde, spaccato, marcio ed altre impurità.

Le fasi della filiera del Pomodoro

Il pomodoro viene trasformato dall'industria in varie forme: concentrato, pelato, succhi e cocktail, ketchup per coprire circa il 60% del pomodoro prodotto in Italia. La lavorazione industriale del pomodoro, come di tutti gli altri vegetali, può essere suddivisa in due categorie in funzione del tipo di lavorazione subito dagli ingredienti:

- **Conserve:** sono prodotti trattati in modo da essere conservati a temperatura ambiente per lungo tempo; hanno subito trattamento termico o altro trattamento lecito inattivante degli enzimi e letale per i microorganismi che possono alterare gli alimenti.
- **Semiconserve:** sono prodotti trattati in modo da essere conservabili per breve tempo e solo in determinate condizioni di temperatura e di umidità, sotto pressione; possono essere a loro volta suddivisi in semiconserve a pH superiore a 4.5, pastorizzate o racchiuse in contenitori ermetici e conservate a temperature non superiori a 5°C; semiconserve a qualsiasi pH, stabilizzate mediante l'aggiunta di sostanze che inibiscono i microorganismi.

Le varietà più idonee per l'utilizzo nella trasformazione industriale sono tendenzialmente a buccia spessa, che resiste agli urti, di colore rosso vivo e ricche di sapidità e di aroma. Per la trasformazione devono essere scartati i frutti ammalati o deteriorati. Per la raccolta si devono impiegare gabbiette in legno o in polietilene. È importante evitare il riscaldamento del

prodotto raccolto, per evitare l'aumento di pH (~5) che favorisca lo sviluppo del *Bacillus coagulans* al quale sono attribuite alterazioni del sapore del frutto.

Il pomodoro deve essere avviato al più presto alla trasformazione, in ogni caso entro 48 ore dalla raccolta, conservandolo in ambiente fresco, ventilato e coperto, per contenere l'inquinamento batterico.

Prima della lavorazione si effettua la campionatura per suddividere i frutti tra prima qualità, seconda qualità e scarto; seguono il lavaggio e la cernita.

Lavaggio

L'operazione di lavaggio deve essere molto rigorosa per consentire la completa eliminazione dei prodotti chimici impiegati in agricoltura che di norma persistono sul prodotto oltre ad eliminare le sostanze casualmente presenti come foglie, pietre e terriccio. Il primo lavaggio viene effettuato tramite vasconi in cui l'acqua viene agitata e rinnovata in continuo; i pomodori subiscono un secondo lavaggio in un altro vascone, quindi un terzo lavaggio per aspersione in cui i frutti vengono nuovamente lavati e sciacquati tramite getti d'acqua a pressione mentre scorrono sopra un nastro trasportatore. Alla fine di queste tre fasi di lavaggio il prodotto passa alla fase di cernita.

Cernita

È il processo di separazione dei prodotti sani e conformi alla pezzatura, alla densità, al tipo desiderato e aventi lo stesso grado di maturazione. Questa operazione viene di norma eseguita manualmente su tavoli muniti di nastri trasportatori per meglio discernere i prodotti difettosi. In alcuni casi la cernita può essere coadiuvata da una cellula fotoelettrica in grado di riconoscere il prodotto anomalo e di deviarlo in un canale secondario. Dopo il processo di cernita i pomodori sono pronti per essere lavorati.

Produzione di pomodori pelati

Per la preparazione di pomodori pelati vengono utilizzati pomodori oblunghi perché questa forma favorisce le operazioni di pelatura; inoltre la loro polpa presenta una buona consistenza, che tende a rimanere tale anche dopo le lavorazioni successive. Dopo il lavaggio e la cernita i pomodori subiscono la scottatura in acqua bollente, dopodiché a temperatura più bassa si effettuano pelatura e inscatolamento. È importante che il riempimento limiti al massimo gli spazi vuoti. Si può eseguire un preriscaldamento, a scopo disareante, alla

temperatura di 60°C per 6-15 min; segue subito l'aggraffatura e poi la sterilizzazione a 94-95°C, se il prodotto ha pH inferiore a 4.4 o a temperature di 105°C se il pH è superiore a 4.4.

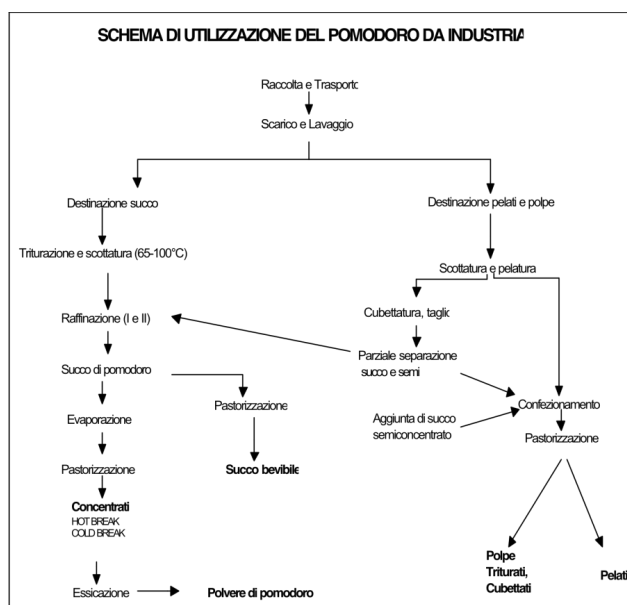


Figura 1 – diagramma di flusso della trasformazione industriale del pomodoro da industria

Produzione di passate di pomodoro

I pomodori utilizzati per la preparazione di passate di pomodoro hanno solitamente forma rotondeggiante, devono avere consistenza elevata che può essere naturale del frutto oppure acquisita tramite immersione in una soluzione di cloruro di calcio. Le passate vengono ottenute tagliando variamente i pomodori in parte privati di semi e della buccia, quindi confezionati tali e quali o con aggiunta di succo di pomodoro, concentrato o meno. I prodotti prendono denominazioni differenti in funzione delle dimensioni dei pezzi della polpa e possono essere: triturato, polpa, cubettato, fettine o filetti.

La normativa CEE 1764/86 suddivide questi prodotti in:

- polpa a grana e pezzatura più o meno grossolana ottenuta da pomodori pelati più o meno spremuti triturati e polpe ottenuti da pomodori pelati eventualmente sgrondati di semi e liquido placentare;
- pomodori tagliati con forme e dimensioni dei pezzi predeterminate, ottenute da frutti preliminarmente pelati che prendono il nome di cubettati, fettine o filetti in funzione del tipo di taglio.

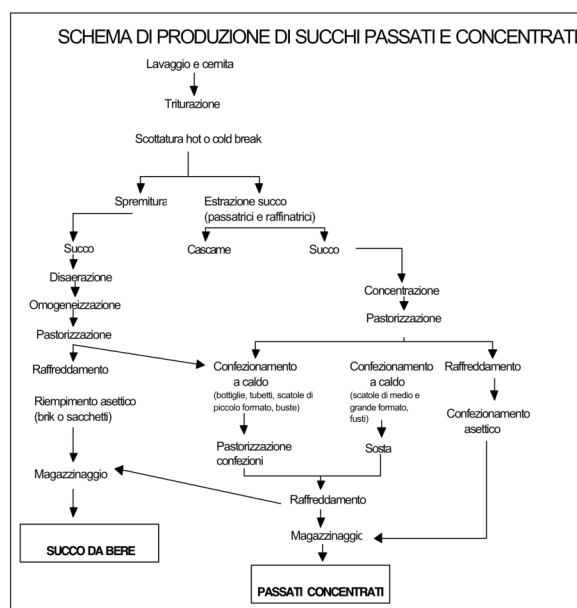


Figura 2- Diagramma di flusso della produzione di concentrato di pomodoro e succo di pomodoro

Concentrato di pomodoro

Il concentrato di pomodoro è ottenuto mediante setacciatura della polpa di frutto fresco e successiva concentrazione del succo polposo ottenuto dalla setacciatura. Dopo il lavaggio e la cernita i pomodori vengono triturati, separati dai semi, scottati alla temperatura di 60-70°C per diminuire la consistenza della polpa e facilitare il distacco della buccia con la successiva operazione di setacciatura. Per aumentare la densità del concentrato di pomodoro occorre aumentare la temperatura di scottatura fino a 90-95°C in modo da inattivare gli enzimi pectolitici e non degradare la pectina che addensa il concentrato. Dopo questo riscaldamento il triturato è avviato ai setacci che separano le bucce e i semi dalla parte liquida.

Il triturato, a questo livello di lavorazione, passa attraverso tre setacci: la passatrice dotata di fori di diametro di 0,9-1,1 mm e di battitori che provocano la fuoriuscita della polpa (cascami) mentre la parte che costituisce lo scarto rimane sul primo setaccio e viene eliminata in un secondo momento tramite una tramoggia di scarto. Il secondo e il terzo setaccio hanno fori rispettivamente di 0,6 e 0,45 mm e hanno il compito di estromettere gli scarti più piccoli; a questo punto della lavorazione il triturato viene definito raffinato o super-raffinato.

Dopo il processo di raffinatura il triturato viene immerso in grosse vasche dove viene sottoposto a evaporazione di una parte dell'acqua tramite ebollizione. L'alta temperatura

impiegata per attuare l'evaporazione provoca vari danni al prodotto: modifica il colore, caramellizza gli zuccheri, distrugge alcune vitamine, modifica il gusto. Occorre quindi operare in modo che il danno termico sia ridotto al minimo possibile compatibilmente con l'efficacia del trattamento; si preferisce quindi utilizzare basse temperature sottovuoto applicate per tempi lunghi.

Dal primo passaggio di concentrazione si ottiene un prodotto preconcentrato con un residuo secco del 12%. Il preconcentrato viene immesso in una vasca con aggiunta di salamoia e inviato tramite una pompa allo sterilizzatore alla temperatura di 90°C. Segue il riempimento a caldo in contenitori preventivamente trattati con vapore vivo in banda stagnata oppure in tubetti di alluminio o in piccoli fusti. Se si utilizzano grossi contenitori, dopo la chiusura, devono essere capovolti per sterilizzare il fondello quindi raffreddati rapidamente con acqua. Quando vengono utilizzati contenitori di dimensioni più ampie si effettua un trattamento termico a bagnomaria bollente per alcuni minuti.

Il succo di pomodoro

Per ottenere il succo di pomodoro da bere direttamente i frutti subiscono il lavaggio, la cernita, la triturazione, il preriscaldamento a 70-90°C, segue la spremitura mediante estrattori elicoidali che spingono il triturato verso setacci. Si ottiene una resa del 60-70% in succo, che viene sottoposto a vuoto spinto con lo scopo di disarearlo. Il succo disareato subisce omogeneizzazione che lo frantuma in particelle uniformi con diametro di qualche µm. Si applica poi un trattamento sterilizzante a 121°C per 45s, un raffreddamento attorno ai 95°C e a questa temperatura si procede all'inscatolamento a pressione atmosferica con successivo raffreddamento. Può essere addizionato con NaCl, aromi, ortaggi, succo di limone o spezie.

Ketchup

Per preparare il Ketchup occorre impiegare pomodori di colore rosso intenso, di buona consistenza e sani, ai quali vengono aggiunti sale, zucchero e spezie per esaltare l'aroma del pomodoro. I pomodori devono essere lavati, sottoposti a cernita, triturati e riscaldati a 90°C. Si procede alla concentrazione del succo fino ad un residuo secco del 15-16%, questo concentrato viene poi cotto con gli altri ingredienti (40% zucchero, 35% di aceto, 4% di cipolla, 3,5% di sale, 0,2% spezie). La concentrazione raggiunge il 28-30% in residuo secco. In particolare, spezie e aceto vengono aggiunti quando è stata raggiunta una determinata concentrazione per evitare che volatilizzino durante la cottura. La cottura

prosegue fino a ottenere una concentrazione di 32-36% di residuo secco, questo viene setacciato per separare le particelle più grossolane.

Succo di pomodoro essiccato in polvere e Flocchi di pomodoro

La produzione di succo di pomodoro essiccato parte dalla disidratazione del succo ottenuto come descritto in precedenza. L'essiccazione può avvenire mediante essiccatori a cilindro o a nastro, con "spray-drying" oppure mediante ebollizione sotto vuoto del succo di pomodoro emulsionato con aria. Il prodotto ottenuto deve essere sigillato in breve tempo in contenitori ermetici sotto gas inerte. La polvere che si ottiene ha l'1,5-2% di umidità, deve essere solubile anche in acqua fredda.

I flocchi di pomodoro si ottengono a partire da pomodori tagliati a fette di 7-8mm di spessore che vengono sottoposte a essiccamento e raffreddamento secondo il grado di disidratazione desiderato.

Problemi tipici riscontrabili nei prodotti a base di pomodoro

Frodi

Il ministero delle attività produttive con il decreto 23 Settembre 2005 definisce la "passata di pomodoro" come *"prodotto ottenuto direttamente da pomodoro fresco, sano e maturo, avente il colore, l'aroma ed il gusto caratteristici del frutto da cui proviene, per spremitura, eventuale separazione di bucce e semi e parziale eliminazione dell'acqua di costituzione in modo che il residuo ottico rifrattometrico risulti compreso tra 5 e 12 gradi Brix, con una tolleranza di 3%, al netto del sale aggiunto"*.

L'Ispettorato centrale per la repressione delle frodi effettua controlli a sondaggio in tutte le fasi della produzione e della commercializzazione della passata di pomodoro attraverso ispezioni e prelievi di campioni da sottoporre ad analisi. Tali ispezioni sono volte a determinare, oltre ai parametri classici come l'igiene e la presenza di inerti (terra, sabbia o altre impurità) anche la presenza di acqua aggiunta. Quest'ultimo test consente di valutare se il prodotto è stato ottenuto da pomodoro fresco oppure da diluizione di concentrato di pomodoro proveniente da altri stati che non sono soggetti alla legislazione europea in materia di agroalimentare come Cina o India.

Il test dell'acqua aggiunta si basa sulla caratterizzazione degli isotopi di idrogeno e ossigeno presenti all'interno del prodotto e del confronto degli stessi con quelli che dovrebbero essere

presenti nelle acque territoriali dove è stato coltivato il pomodoro; questo non consente di identificare la provenienza del pomodoro utilizzato, per questo motivo diventa necessario sviluppare test che siano in grado di determinare la provenienza del prodotto in esame.

Un secondo aspetto da tenere in considerazione nell'ambito delle frodi legate all'agroalimentare riguarda i prodotti tipici regionali. In ambito di prodotti a base di pomodoro sono noti sequestri di prodotti denominati "S. Marzano" (04/02/2009) destinati all'esportazione o prodotti commercializzati come "Pomodori Pachino" (03/03/2006) che in realtà non lo sono.

Contaminanti

La legislazione sulle passate di pomodoro (decreto 23 Settembre 2005) impone che le impurezze minerali non sono superiori allo 0,1% del residuo ottico; l'acido lattico non sia presente in misura superiore a 1% del residuo ottico al netto del sale aggiunto e che la presenza di bucce e di semi non superi il limite del 4% in peso del prodotto finito.

Per quel che riguarda le contaminazioni da composti non inerti, all'interno delle passate di pomodoro possono essere riscontrati i seguenti composti:

- *idrocarburi policiclici aromatici (IPA)*. Gli IPA sono composti aromatici che si formano durante la combustione incompleta di materiali organici (es. benzine ed altri derivati del petrolio). La loro presenza nei prodotti ortofruitticoli è da attribuire principalmente all'inquinamento ambientale (suolo, aria, ...). L'elevato interesse nei confronti di queste sostanze inquinanti è legato al loro effetto sull'organismo: gli IPA sono composti cancerogeni. Nei prodotti vegetali la concentrazione degli IPA è maggiore soprattutto in superficie quando vengono coltivati in terreni limitrofi a strade molto trafficate o in aree fortemente industrializzate. Nei pomodori coltivati vicino alle vie di grande comunicazione è stata rilevata la presenza dei seguenti idrocarburi policiclici aromatici: fluorantene, pirene e benzopirene in concentrazioni rispettivamente di 6.2 ± 1.54 (mg/Kg), 2.53 ± 0.72 (mg/Kg) e 1.29 ± 0.87 (mg/Kg). Gli altri IPA individuati erano presenti in quantità minori.
- *Pesticidi*. Le tecniche agronomiche convenzionali prevedono l'impiego di insetticidi, erbicidi e fungicidi. Sono composti chimicamente molto diversi e di origine varia, il cui impiego è regolamentato da specifici Decreti Legge. Queste sostanze e i loro prodotti di decomposizione sono pericolosi anche per l'uomo quando ingeriti. La legge definisce:

- l'intervallo di sicurezza: è il tempo che deve intercorrere tra l'ultimo trattamento e la raccolta del prodotto;
- il limite di tolleranza: è la concentrazione massima residua del principio attivo permessa nell'alimento.

Partendo da pomodori contaminati, i residui dei pesticidi impiegati permangono nel prodotto trasformato, anche se le operazioni unitarie di lavaggio e pelatura e i trattamenti termici possono ridurre in modo significativo il contenuto. È bene rispettare i tempi definiti dall'intervallo di sicurezza. Nel 2001, i controlli ufficiali hanno rilevato la presenza in un numero limitato di campioni di pomodoro sia dell'insetticida piperonil butossido sia del fungicida pirazofos trifosfato.

- *Nitrati/nitriti.* Sono, insieme ai solfati e ai fosfati, i principali anioni coinvolti nella nutrizione della pianta, che li impiega nella sintesi delle proteine e nelle attività metaboliche. I nitrati non sono, comunque, costituenti tipici del pomodoro. La loro presenza può avere implicazioni sotto l'aspetto igienico-sanitario e nutrizionale e per gli effetti sulla degnatura delle scatole di banda stagnata utilizzate per il confezionamento dei prodotti di trasformazione. I nitrati sono descritti, infatti, come degli energici degnanti. A tal proposito, è importante ricordare che le operazioni di trasformazione portano ad un aumento della concentrazione di nitrati/nitriti, perchè determinano un aumento del residuo secco contenuto nel trasformato rispetto alla materia prima.
- *Metalli.* Alcuni metalli sono ritenuti dalla FAO e dall'OMS cancerogeni (cadmio, cromo, piombo, stagno). Altri (zinco, rame e ferro) hanno, invece, una specifica funzione fisiologica e rientrano nella categoria dei micronutrienti, possono, però, diventare tossici quando la loro concentrazione supera un certo limite. In alcuni campioni di pomodoro sono state rilevate concentrazioni relativamente alte di cadmio (630 ppb), ed evidenziate delle punte nel contenuto di zinco (52 ppm), dovute probabilmente all'impiego di sali zincorganici utilizzati come fungicidi, e di rame (2.36 ppm). In alcuni prodotti trasformati (succo di pomodoro) è stato riscontrato un contenuto preoccupante di piombo. La sua presenza non sembra però legata alla materia prima, dove questo metallo è stato rilevato in quantità minime.

I microrganismi negli alimenti sono sempre il risultato di una contaminazione desiderata o non desiderata. Per contaminazione si intende anche come presenza di prodotti del metabolismo microbico: tossine, ammine biogene. In funzione del ruolo del microrganismo all'interno dell'alimento questi vengono distinti in:

- protecnologici: indicatori di tipicità
- Indicatori di qualità: indicano le caratteristiche di pulizia e igiene delle tecniche di manipolazione o conservazione del prodotto.
- Indicatori di salubrità: la loro presenza è un parametro di rischio per il consumatore.

Tra gli indicatori alimentari ritroviamo microrganismi definiti patogeni alimentari che possono causare intossicazioni nel caso in cui l'alimento sia contaminato da microrganismi che si sono moltiplicati prima del consumo con produzione di tossine; oppure infezioni alimentari in cui i microrganismi possono o meno moltiplicarsi all'interno dell'alimento prima dell'ingestione e causano infezioni intestinali enterotossiche o enteroinvasive.

I patogeni più comuni presenti nei prodotti a base di pomodoro sono:

- *Bacillus cereus*: appartiene alla famiglia delle *Bacillaceae* Gram+, è un batterio bastoncellare, mobile, aerobio-anaerobio facoltativo e sporigeno. Questo microrganismo non rappresenta un pericolo per l'uomo entro certi limiti, la sua soglia di pericolosità è 10^5 cellule per grammo di alimento. I sintomi sono causati dal rilascio delle due tossine, una a basso peso molecolare (emetica) e una ad alto peso molecolare (enterotossica) dopo la lisi batterica. L'intossicazione può manifestarsi con una sindrome enterica oppure con una sindrome emetichica, entrambe di breve durata.
- *Clostridium Botulinum*: appartiene anch'esso alla famiglia delle *Bacillaceae*, è un batterio bastoncellare gram positivo, produce spore ovali o cilindriche, è anaerobio obbligato, sporofitico e produce gas. Le tossine prodotte sono proteine neurotossiche, vengono prodotte nella fase vegetativa e rilasciate durante la lisi cellulare che avviene in fase di sporulazione. La tossina libera non viene inattivata dal pH acido dello stomaco, viene quindi assorbita intatta dall'apparato gastrointestinale. I sintomi da intossicazione sono caratterizzati da disturbi gastroenterici a cui seguono coinvolgimenti neurologici.
- *Clostridium perfringens*: appartiene alla famiglia delle *Bacillaceae*, è un batterio bastoncellare gram positivo, produce spore ovali o cilindriche, non è mobile, è anaerobio, microaerofilo, sporofitico e mesofilo. È patogenico solo se presente in

concentrazioni superiori a 5 cellule per grammo di alimento. I sintomi dovuti all'ingestione della tossina sono legati all'apparato gastroenterico.

- *Escherichia coli*: appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è un batterio gram negativo, anaerobio facoltativo, catalasi positivo, ossidasi negativo e mesofilo. Sono stati riscontrati diversi ceppi patogeni tutti caratterizzati da sintomi gastroenterici, brividi, febbre e cefalea.
- *Salmonella enterica*: appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, viene suddivisa in 7 sottospecie. È un batterio gram negativo anaerobio facoltativo, bastoncellare dotato di flagelli peritrichi, non sporigeno, catalasi positivo e ossidasi negativo, riduce i nitrati a nitriti ed è mesofilo. La salmonella è infettante per l'uomo in concentrazioni di 10^5 - 10^9 cellule per grammo. La sintomatologia provocata dall'ingestione può manifestarsi in tre forme differenti: febbre tifoide, forma enterica e sindrome gastroenterica.

MESSA A PUNTO DI UN METODO DI
ESTRAZIONE DI DNA APPLICABILE AI
DIVERSI PRODOTTI DELLA FILIERA DI
TRASFORMAZIONE DEL POMODORO

Introduzione

L'estrazione del DNA da matrici complesse

Il problema principale legato all'analisi del DNA in matrici complesse, quali gli alimenti, è rappresentato dalle metodologie di estrazione. È di fondamentale importanza ottimizzare le metodiche di estrazione bilanciando i diversi parametri che entrano in gioco durante un'estrazione di DNA. Un buon metodo di estrazione dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: elevata resa finale, buona qualità del DNA estratto, rapidità di esecuzione, basso costo e dovrebbe rendere possibile all'operatore il processamento contemporaneo di molti campioni. Poiché il DNA in un alimento è altamente degradato, presente in quantità limitate e mescolato con altre molecole (composti organici, proteine e acidi nucleici di diversa origine), un buon metodo estrattivo deve contestualmente consentire di eliminare questi possibili contaminanti, inibitori di PCR ed evitare un'elevata frammentazione del DNA.

La quantità e la qualità del DNA estratto da matrici complesse dipende strettamente dal campione in analisi, infatti, la produzione di alimenti e la loro composizione chimico-fisica può introdurre un elevato grado di variabilità nell'efficacia del metodo di estrazione e nell'amplificabilità del DNA ottenuto (Di Bernardo et al., 2007; Peano et al., 2004). Inoltre, un elevato numero di specie vegetali, compreso il pomodoro, producono metaboliti secondari come composti fenolici, tannini, flavonoidi, isoprenoidi, terpeni e alcaloidi che se presenti nell'estratto possono interferire nelle analisi del DNA e inibirne l'amplificabilità (Di Bernardo et al., 2005)

Cambiamenti del DNA durante la produzione di alimenti

La presenza di DNA in alimenti processati è stata dimostrata in numerose pubblicazioni (Meyer et al., 1994; Hunt et al., 1997; Hold et al., 2001), sono però carenti lavori che analizzano il livello di stabilità del DNA durante il processamento e la conservazione degli alimenti. Per esempio, alcuni studi, hanno dimostrato che il DNA viene completamente rimosso durante la produzione di zucchero (Klein et al. 1998), altri che la temperatura e il pH sono i fattori principali che influenzano la degradazione del DNA durante la produzione di pane, altri ancora che all'interno dell'olio di oliva è possibile ritrovare una

quantità di DNA sufficiente per poter essere analizzato (Marmioli et al., 2009), anche se in analisi AFLP fornisce frammenti di dimensioni inferiori alle 250pb (Pafundo et al., 2005) indice di un'elevata frammentazione. La perdita della struttura primaria del DNA è dovuta alle diverse reazioni chimiche, tra cui l'ossidazione e l'idrolisi, che possono portare alla depurinazione e alla conseguente eliminazione delle basi azotate. A causa della risultante rottura del filamento di DNA, essa diventa più sensibile a degradazioni future e può perdere la sua attività biologica. Il trattamento a caldo e l'acidificazione sono processi comuni nell'industria alimentare: 85°C è la temperatura usata nei processi di pastorizzazione ad alta temperatura e breve tempo, e alimenti acidi (con pH di 4-4.5) sono il risultato delle fermentazioni. Nel 1972 Lindahl ed altri hanno dimostrato che il grado di depurinazione di DNA, e quindi il grado di degradazione, aumenta fortemente con la diminuzione del pH. Poiché la depurinazione è una delle principali reazioni iniziali che portano alla rottura del filamento di DNA, si può affermare che l'incremento nel grado di rottura, così come la futura degradazione del DNA, a pH 4 è ampiamente dovuta alla reazione di depurinazione per catalisi acida. Inoltre, lo stesso gruppo ha osservato che la depurinazione non è marcatamente dipendente dalla sequenza di DNA. Hemmer et al. (2002) hanno osservato che nei prodotti del pomodoro lavorato, come il ketchup, la purea o la salsa, si trovavano frammenti di DNA con lunghezza media inferiore ai 400 bp. Bauer et al. (2003) hanno evidenziato, a questo proposito, una rapida diminuzione della lunghezza massima di frammenti di DNA individuabili in condizioni acide (pH 4.75), a temperatura ambiente; Hupfer et al. (1998) hanno mostrato che frammenti di DNA lunghi 1900 bp non erano più rintracciabili dopo aver bollito la farina di mais Bt-176 per 5 minuti a pH 2-3, mentre dopo bollitura a pH 8.5-9.5 per 60 minuti i frammenti rimanevano identificabili. Una rottura del DNA dipendente dal pH è stata osservata anche durante la produzione dei prodotti da forno (Moser et al., 1999). La temperatura influisce sulla degradazione del DNA: durante la produzione del latte di soia e del tofu, Bauer et al. (2003) hanno evidenziato come durante il trattamento a caldo, la massima lunghezza dei frammenti di DNA individuabili era di 1300 bp. La temperatura rappresenta tuttavia un elemento trascurabile rispetto ad altri fattori, quali eventuali enzimi degradativi presenti negli ingredienti, o le condizioni chimiche a cui avviene il processamento, che possono accelerare o rallentare la degradazione del DNA, tra cui il pH risulta essere uno dei parametri più influenti.

I contaminanti del DNA

Il DNA estratto da matrici alimentari è molto degradato e presente in piccole quantità in seguito ai trattamenti subiti durante la lavorazione; la possibilità di poter identificare e amplificare mediante PCR tale DNA frammentato in modo corretto diminuisce drasticamente rispetto a DNA estratti da matrici non lavorate. Studi sul DNA antico hanno dimostrato che aumentando il numero di cicli della reazione di amplificazione oltre le 45 ripetizioni diviene possibile produrre ampliconi, altrimenti non identificabili (Cooper et al., 2000). Tuttavia, questo approccio, aumenta le possibilità di contaminazioni durante l'amplificazione: è necessario operare in condizioni di sterilità e introdurre controlli negativi sia di estrazione sia di amplificazione (Teletechea et al., 2005). La presenza di inibitori co-estratti insieme al DNA è uno dei maggiori problemi nelle successive analisi del campione.

Gli inibitori della PCR comprendono: composti organici e fenolici, polisaccaridi, glicogeno, grassi, collagene, metalli come ferro e cobalto (Wilson 1997; Scholz 1998), eventuali residui di cellule batteriche e qualsiasi DNA estraneo alla analisi. Gli inibitori possono: *i*) interferire con le metodiche di estrazione, *ii*) favorire la degradazione durante la purificazione degli acidi nucleici, *iii*) inibire le reazioni di amplificazione (Wilson et al., 1997). L'assenza di amplificazione è spesso imputabile alla presenza di inibitori piuttosto che alla mancata estrazione del DNA dal campione.

Il problema principale nel caso di estrazione di DNA dal pomodoro e dai suoi derivati è la presenza di enzimi che degradano il DNA, per questo, solitamente, le rese di estrazione sono basse e il prodotto è degradato. Se si analizzano sughi pronti e salse occorre porre particolare attenzione alla presenza di ingredienti aggiuntivi ai prodotti quali oli, aromi e conservanti che possono interferire con i processi di estrazione del DNA di pomodoro.

Gli artefatti di PCR

L'alto livello di degradazione e le basse concentrazioni di DNA estratto da matrici alimentari accrescono il numero di artefatti ed errori durante le fasi di amplificazione. La generazione di artefatti e errori durante le fasi di amplificazione del DNA estratto da campioni alimentari è incentivato dall'alto livello di degradazione e dalla bassa quantità. Come nel caso delle analisi sul DNA antico, anche nella tracciabilità molecolare degli alimenti

diventa di fondamentale importanza rispettare rigorosi parametri per la corretta applicazione della PCR (Pääbo et al., 2004).

Il clonaggio dei prodotti amplificati e il sequenziamento di cloni multipli diventa importante per individuare l'eterogeneità nei prodotti amplificati, dovuti alla contaminazione, al danneggiamento del DNA o ad errori durante il processo di PCR. Ogni estrazione dovrebbe includere almeno un' estrazione di controllo, che non contenga nessun campione, ma che subisca gli stessi trattamenti. Analogamente, per ogni reazione di amplificazione, controlli negativi multipli dovrebbero essere eseguiti per distinguere le contaminazioni che avvengono durante l' estrazione e quelle che avvengono durante la preparazione della PCR. Le amplificazioni devono essere ripetute dalla stessa o da più estrazioni per permettere l'identificazione di contaminazioni sporadiche e individuare eventuali cambiamenti negli ampliconi. Un ulteriore parametro da valutare consiste nella possibilità di quantificare il numero di molecole di DNA amplificabile; in questo caso l'efficienza di amplificazione dovrebbe essere inversamente correlata con la lunghezza dell'amplificato atteso.

Scopo della ricerca

Lo scopo di questo lavoro è stato testare e valutare l'efficacia di diverse tecniche di biologia molecolare basate sull'analisi del DNA quando utilizzate per la tracciabilità del pomodoro e dei suoi derivati. In particolare, il lavoro, si è focalizzato nel testare otto differenti metodi di estrazione del DNA scelti tra protocolli di laboratorio e kit disponibili in commercio. Per testare i diversi metodi di estrazione sono state scelte, in base alla loro complessità, alcune matrici provenienti da differenti lavorazioni della filiera di trasformazione del pomodoro da industria. Quindi è stata testata la quantità e la qualità del DNA estratto e l'efficienza di amplificazione mediante PCR su tali DNA. In parallelo sono stati analizzati anche altri parametri quali costi e tempi impiegati per ogni procedura; in questo modo, utilizzando un approccio matematico che combina la "fuzzy logic" e "expert weights", è stato possibile selezionare il metodo migliore per l' estrazione di DNA dalle matrici analizzate.

Materiali e metodi

I Campioni utilizzati

I campioni utilizzati sono matrici alimentari della filiera del pomodoro da industria, scelti in base alla loro complessità, sono: pomodoro fresco, salsa di pomodoro, passata di pomodoro, polpa di pomodoro, pomodori pelati San Marzano DOP, pomodori pelati, doppio concentrato di pomodoro, sugo all'arrabbiata. Tutti i campioni utilizzati provengono dal commercio e sono stati acquistati al supermercato, i prodotti processati appartengono ad un unico marchio.

Metodi di estrazione del DNA testati

Tutti i campioni analizzati sono stati preparati per l'estrazione mediante omogeneizzazione con Knifetec-1095 (FOSSTECATOR AB, Hoganas, Sweden). Le estrazioni di DNA, portate avanti con tutti i metodi di estrazione descritti di seguito, sono state effettuate partendo da 200 mg di materiale omogeneizzato. Ogni estrazione è stata condotta in triplo.

Protocollo basato su SDS

Tampone di estrazione: 0,2 mM Tris-HCl (Tris(idrossimetil)-amminometano acido cloridrico) pH 7.5; 0,25 mM NaCl (Cloruro di Sodio); 25 mM EDTA (Acido etilendiammina tetracetico); 0,5% SDS (sodio dodecil solfato)

Tampone TE: 100 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA

200 mg di campione vengono inseriti in un'eppendorf da 1,5 ml in cui vengono aggiunti 400 µl di tampone di estrazione. Il campione viene agitato mediante vortex e incubato a 65°C per 20'; dopo di che alla soluzione vengono aggiunti 250 µl di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) freddi quindi il tutto viene nuovamente agitato utilizzando il vortex. Il campione viene centrifugato per 10' a 13.000 rpm, quindi viene eliminato il surnatante e il pellet rimasto viene lavato con 250 µl di etanolo (70%). Il surnatante viene nuovamente eliminato e il pellet lasciato asciugare quindi risospeso con 25 µl di TE buffer a cui viene aggiunta RNasi A ad una concentrazione di 200 ng/µl.

Metodo CTAB

Tampone di estrazione 2X CTAB: 100 mM Tris-HCl pH8; 0,7 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB (Cetyl-trimetil ammonium bromide); 1% PVP-360 (Polivinilpirolidone); 0,2% 2-mercaptoetanol

Tampone di precipitazione 2X CTAB: 100 mM Tris-HCl pH8; 20 mM EDTA; 2% CTAB

Dopo aver riscaldato il tampone di estrazione a 60°C, vengono aggiunti 5 ml/g di campione alla provetta e il tutto viene incubato a 60°C per 20'. Alla soluzione viene aggiunto un egual volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1), il tutto viene mescolato per inversione quindi centrifugato per 5' a 1.500 g a temperatura ambiente. Il surnatante viene trasferito in una nuova eppendorf e addizionato con un ugual volume di tampone di precipitazione in modo da abbassare la concentrazione di NaCl fino a 0,4 M. Il complesso CTAB-acidi nucleici viene lasciato precipitare per 1h a temperatura ambiente e centrifugato per 5' a 2.000 g a temperatura ambiente. Il surnatante viene eliminato e risospeso in un minimo volume di NaCl 1 M, il tutto viene precipitato una seconda volta aggiungendo 2,5 volumi di etanolo assoluto e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante viene nuovamente eliminato e il pellet lavato con 500 µl di etanolo (70%) quindi centrifugato per 2' a 2.000 g. L'etanolo viene eliminato e il pellet lasciato seccare, poi risospeso in acqua deionizzata sterile.

Modifica del metodo CTAB

Tampone di lisi 2X CTAB: 100 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA 20; 1,4 M NaCl; 2% CTAB; 1% PVP

Ai campioni omogeneizzati vengono aggiunti 500 µl di tampone di lisi, quindi viene incubato per 30' a 65°C. In seguito all'incubazione, i campioni, vengono centrifugati per 10' a 12.000 g. Il surnatante viene trasferito in un nuova eppendorf sterile e addizionato di 200 µl di cloroformio; il tutto viene miscelato per almeno 30 sec. I campioni vengono poi centrifugati per 10' a 12.000 g fino ad ottenere una separazione netta tra le due fasi. La fase superiore acquosa viene trasferita in una nuova eppendorf; ad essa vengono aggiunti 2/3 del volume di isopropanolo quindi agitata per favorire la precipitazione del DNA. I campioni vengono lasciati per 1h a -20°C, successivamente vengono centrifugati per 15 min a 13.000 g

a 4°C. Il surnatante viene eliminato e il DNA lavato per due volte con 200 µl di etanolo (70%). Il pellet viene lasciato essiccare per circa 15 minuti a 37°C e successivamente risospeso in 50 µL di H₂O deionizzata sterile.

QIAamp DNA Stool Minikit

L'estrazione di DNA è stata eseguita seguendo le indicazioni fornite dal produttore (QIAGEN S.p.A., Milano Italy) nella sezione "Isolation of DNA from Stool for Human DNA Analysis".

NucleoSpin Food

L'estrazione di DNA è stata eseguita seguendo le indicazioni fornite dal produttore (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren Germany).

ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit

L'estrazione di DNA è stata eseguita seguendo le indicazioni fornite dal produttore (Invitrogen S.R.L, Milano Italy).

Wizard kit

Tampone di estrazione: 10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% SDS

Questo metodo di estrazione prevede l'utilizzo di un tampone di estrazione prodotto in laboratorio abbinato a colonnine Wizard[®] (Promega, Milano Italy) e Wizard[®] Resin.

Al campione omogeneizzato messo in un'eppendorf da 2 ml vengono aggiunti 860 µl di tampone di estrazione, 100 µl di guanidina cloridrato 5 M e 40 µl di proteinasi K 20 mg/ml; il tutto viene lasciato incubare over-night (16-18 ore) a 65°C in agitazione a 350 rpm. Dopo aver estratto l'eppendorf e averla lasciata raffreddare viene centrifugata per eliminare i residui cellulari per 20' a 14.000 rpm. Il surnatante ottenuto trasferito in una nuova eppendorf per essere trattato con 5 µl di RNasi A 500 µg/µl per 30' a 37°C. Dopo tale tempo alla soluzione viene aggiunto 1 ml di Wizard[®] Resin e il tutto viene mescolato per inversione per 5 minuti in modo da favorire il legame del DNA alla resina. La miscela viene quindi fatta passare attraverso la colonnina mediante l'applicazione di una pressione con l'ausilio di siringhe da 10 ml. Il complesso resina-DNA viene quindi lavato come indicato in precedenza con 2 ml di isopropanolo (80%). Le colonnine vengono quindi essiccate mediante

una prima centrifugazione di 30'' a 10.000 rpm, un'esposizione a temperatura ambiente di 30' e una seconda centrifugazione di 30'' a 10.000 rpm. Le colonnine vengono quindi raccordate con provette da 1,5ml per procedere all'eluizione che consiste nell'applicazione di 50 µl di H₂O deionizzata sterile alla temperatura di 70°C direttamente sul filtro della colonnina e nella centrifugazione per 1' a 11.000 rpm.

Quantificazione del DNA estratto

A causa dell'elevato livello di degradazione del DNA estratto e della bassa resa di estrazione per la quantificazione è stato utilizzato il metodo fluorimetrico abbinato all'uso di un fluorocromo sensibile: il PicoGreen[®]. Questa molecola si lega selettivamente al DNA a doppia elica, consentente quindi di ottenere una stima precisa del DNA estratto che è rimasto integro all'interno della miscela. Per la procedura di quantificazione del DNA estratto da tutte le matrici elencate in precedenza è stato utilizzato il kit Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits, (Invitrogen, USA) le misure sono state effettuate mediante un fluorimetro (Kontron Instruments, Milano, Italy). La quantificazione è stata eseguita secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice del kit e le letture fluorimetriche sono state ottenute ad una lunghezza d'onda di 485 nm in assorbimento e 530 nm in emissione.

Primer utilizzati per PCR in singolo

I primer utilizzati per effettuare il test di amplificabilità del DNA estratto sono stati estrapolati dall'articolo "Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars (He, C. et al. 2003)".

Primer	Sequenza	Tm	Lunghezza dell'amplicone
LEat002-For	5'-act gca ttt cag gta cat act ctc- 3'	59°C	203pb
LEat002-Rev	5'-ata aac tcg tag acc ata ccc tc-3'		

Tabella 2 – descrizione dei primer utilizzati per le prove di amplificabilità; in colonna 1 è indicato il nome del primer, in colonna 2 la sequenza dello stesso, in colonna 3 la temperatura di annealing utilizzata per l'amplificazione e in colonna 4 la lunghezza del frammento ottenuto

I primer utilizzati per effettuare i test di degradazione del DNA sulle diverse matrici sono stati estrapolati da alcuni articoli (citati nella tabella 3).

Primer	Sequenza	T _m	Lunghezza dell'amplicone	Bibliografia
Lat52-Rev	5'-aga cca cga gaa cga tat ttg c-3'	60°C	90pb	Yang L. et al. 2005
Lat52-For	5'-ttc ttg cct ttt cat atc cag aca-3'			
LEat002-For	5'-act gca ttt cag gta cat act ctc-3'	59°C	203pb	He et al. 2003
LEat002-Rev	5'-ata aac tcg tag acc ata ccc tc-3'			
SL10888-For	5'-aag cct cct tta cca atc agc-3'	58°C	303pb	Van Deynze A. E. et al. 2007
SL10888-Rev	5'-gcc atg aaa gtg aac tga agc-3'			
SL10811-For	5'-agc acg agt tca atc ttc gg-3'	58°C	418pb	Van Deynze A. E. et al. 2007
SL10811-Rev	5'-ggc taa tgg agt cat cct cg-3'			
SL20125-For	5'-tgc ttg gac tgc aca agg ta-3'	57°C	513pb	Van Deynze A. E. et al. 2007
SL20125-Rev	5'-aga tca tcg cca cca cca tca ac-3'			
SL10916-For	5'-cgt tcc tca tcg gtc agt tc-3'	58°C	612pb	Van Deynze A. E. et al. 2007
SL10916-Rev	5'-tac ggc caa taa gtt ccc ag-3'			
SL10101-For	5'-gaa ggt tgt tca gcc cac tc-3'	58°C	712pb	Van Deynze A. E. et al. 2007
SL10101-Rev	5'-ggt ttg cac ctg ttg agg at-3'			

Tabella 3- descrizione dei primer utilizzati per le prove di degradazione del DNA estratto; in colonna 1 è indicato il nome del primer, in colonna 2 la sequenza dello stesso, in colonna 3 la temperatura di annealing utilizzata per l'amplificazione, in colonna 4 la lunghezza del frammento ottenuto e in colonna 5 i riferimenti bibliografici dei primer

Test di amplificabilità del DNA estratto mediante PCR

Su tutti i campioni estratti con tutti i metodi di estrazione elencati è stata effettuata una reazione di PCR in triplo utilizzando i primer elencati in tabella 2. Per ogni reazione sono stati previsti controlli positivi e negativi.

Le reazioni di PCR sono state condotte in tubi da 0,2 ml in un volume totale di 25 µl. In ogni reazione di amplificazione sono stati utilizzati circa 100 ng di DNA estratto e un buffer di PCR 1X composto da: 50 mM Tris-HCl; 10 mM KCl; 5 mM (NH₄)₂SO₄ pH 8.3; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM di ogni dNTP (partendo da una soluzione 10 mM); 0,2 µM di primer forward e reverse; 0,1 µg/µl BSA (Roche Applied Science; Indianapolis, USA); 1U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science; Indianapolis, USA).

Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore Veriti 96 well (Applied Biosystem; Foster City, USA) seguendo il seguente profilo termico (Figura 3):

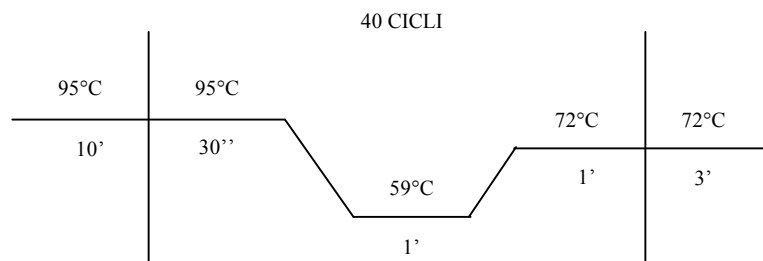


Figura 3- Profilo termico utilizzato per il test di amplificabilità sul DNA estratto

Per verificare l'avvenuta reazione di PCR un'aliquota di amplificato viene sottoposta ad elettroforesi su gel di agarosio all'2%. 100 ml di tampone TAE 1X (tris-acetato EDTA: 40 mM Tris-Acetato; 1 mM EDTA) contenenti 2 g di agarosio (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA) vengono posti a bollire e dopo aver raffreddato la soluzione fino a 50°C viene aggiunto l'intercalante del DNA Gel Red (Società Italiana Chimici, Roma, Italia) fino ad una concentrazione di 0,1X.

Dopo aver posto i campioni negli appositi pozzetti il DNA viene fatto migrare all'interno del gel applicando una tensione di 100V per 2 ore. Terminata la migrazione il DNA viene visualizzato esponendo il gel ai raggi UV. Per determinare il peso molecolare dei frammenti amplificati, vengono fatti migrare, in parallelo, campioni contenenti frammenti di DNA a peso molecolare noto: il "ladder 50pb" e "ladder 100pb" (Fermentas Inc.; Maryland, USA). I gel vengono visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA).

Studio di degradazione del DNA mediante PCR

Dopo aver selezionato, attraverso le prove precedenti, il metodo di estrazione più consono al nostro scopo, i campioni di DNA estratti con tale metodo sono stati sottoposti a test di degradazione.

Il test di degradazione consiste nell'effettuare reazioni di PCR, con primer che forniscono ampliconi di lunghezza crescente, sui DNA estratti dalle diverse matrici prese in considerazione in precedenza. Su ogni campione la reazione di PCR è stata condotta in triplo ed affiancata a controlli positivi e negativi. I primer utilizzati per questa analisi sono elencati nella tabella 3.

Le reazioni di PCR sono state condotte in tubi da 0,2 ml in un volume totale di 25 μ l. In ogni reazione di amplificazione sono stati utilizzati circa 100 ng di DNA estratto e un buffer di PCR 1X composto da: 50 mM Tris-HCl; 10 mM KCl; 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 8,3; 2,5 mM MgCl_2 ; 0,2 mM di ogni dNTP (partendo da una soluzione 10 mM); 0,2 μ M di primer forward e reverse; 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA (Roche Applied Science; Indianapolis, USA); 1U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science; Indianapolis, USA).

Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore Veriti 96 well (Applied Biosystem; Foster City, USA) seguendo il seguente profilo termico (Figura 4) : la temperatura di melting della reazione è caratteristica per ogni coppia di primer ed elencata nella tabella 3.

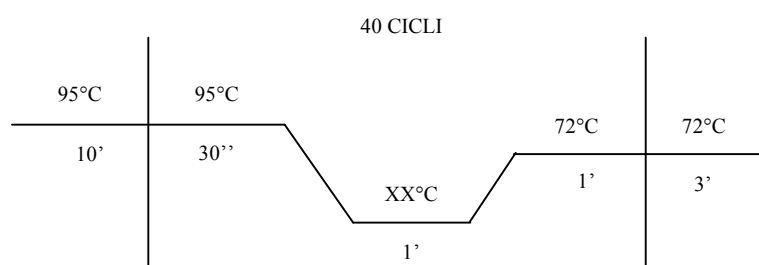


Figura 4- Profilo termico utilizzato per le prove di degradazione sul DNA estratto.

Per verificare l'avvenuta reazione di PCR un'aliquota di amplificato viene sottoposta a elettroforesi su un gel di agarosio all'2%. 100 ml di tampone TAE 1X (tris-acetato EDTA: 40 mM Tris-Acetato; 1mM EDTA) contenenti 2 g di agarosio (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA) vengono posti a bollire e dopo aver raffreddato la soluzione fino a 50°C viene aggiunto l'intercalante del DNA Gel Red fino ad una concentrazione di 0,1X.

Dopo la migrazione il DNA veniva visualizzato esponendo il gel ai raggi UV. Per determinare il peso molecolare dei frammenti amplificati vengono fatti migrare, in parallelo, campioni contenenti frammenti di DNA a peso molecolare noto: il "ladder 50pb" e "ladder 100pb" (Fermentas Inc.; Maryland, USA). I gel vengono visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA).

Fuzzy logic

La logica fuzzy, o logica “sfumata” o logica “sfocata” è un tipo di logica che permette di gestire delle relazioni che non sono né completamente vere, né completamente false. Questo avviene attribuendo a ciascuna proposizione o elemento di un “fuzzy group” un grado di verità compreso tra 0 e 1, attraverso una funzione monotona. È una logica fortemente legata alla teoria degli insiemi non omogenei ed indeterminati e, già intuita da Cartesio, Bertrand Russell, Albert Einstein, Werner Karl Heisenberg, Jan Łukasiewicz e Max Black. Venne concretizzata da Lotfi Zadeh, nel 1994 con la frase: *"Il termine logica fuzzy viene in realtà usato in due significati diversi. In senso stretto è un sistema logico, estensione della logica a valori multipli, che dovrebbe servire come logica del ragionamento approssimato. Ma in senso più ampio logica fuzzy è più o meno sinonimo di teoria degli insiemi fuzzy cioè una teoria di classi con contorni indistinti. Ciò che è importante riconoscere è che oggi il termine logica fuzzy è usato principalmente in questo significato più vasto"*.

Nella logica fuzzy l'esistenza di circostanze paradossali, vale a dire di situazioni in cui un certo enunciato è contemporaneamente vero e falso allo stesso grado, è evidenziata nel caso più palese da ciascuno dei punti d'intersezione tra una generica funzione d'appartenenza e il suo complemento, avendo necessariamente tali punti ordinata pari a $\frac{1}{2}$. Questo perché il valore di verità della proposizione in questione coincide con il valore di verità della sua negazione. Recentemente si sono sviluppati rigorosi studi della logica fuzzy "in senso stretto", studi che si inseriscono nell'antico filone delle logiche a più valori inaugurato da Jan Łukasiewicz (si veda ad esempio il libro di Petr Hájek). Tuttavia la logica fuzzy, oltre ad avere ereditato le motivazioni filosofiche che hanno dato origine alle logiche a più valori, si inquadra nel contesto più ampio delle metodologie che hanno consentito un marcato rinnovamento dell'intelligenza artificiale classica, dando vita al cosiddetto “soft computing” che ha tra i suoi costituenti principali le reti neurali artificiali, gli algoritmi genetici ed il controllo fuzzy.

Nel contesto del nostro lavoro alcuni assiomi e teoremi della fuzzy logic sono stati applicati per valutare le performance di tutti i metodi di estrazione del DNA presi in esame. E' stato utilizzata un'analisi basata sulle matrici multiple nel contesto di una metrica multipla. Siccome alcune delle matrici che abbiamo utilizzato nella valutazione sono parzialmente contraddittorie diventa di significativa importanza la possibilità di raggruppare (formare dei “cluster”) ogni risultato metrico in un sistema comprensivo in grado di fornire criteri logici per effettuare l'ordinamento (“ranking”) dei metodi presi in esame (Bellocchi et al., 2008). In

accordo con la matematica classica dato un gruppo (“set”) di elementi o una lattice (“poset”), un oggetto qualsiasi può appartenere o non appartenere ad uno o più d’uno di tali insiemi e una funzione binaria (0,1) che regola l’ordine dei sottoinsiemi di appartenenza E’ un sistema completamente ordinato in cui non c’è flessibilità perché l’oggetto in questione appartiene oppure non appartiene ad un insieme, non può appartenere solo in parte ad un insieme (discreto o continuo): è un contesto oggettivo, ma non flessibile.

Invece, nella fuzzy logic l’appartenenza di un elemento ad un gruppo, definito fuzzy set, ha molti gradi di libertà e consente al fuzzy set di avere un continuum di gradi di appartenenza, si introduce quindi un tipo di appartenenza parziale e flessibile (Zadeh, 1965). Prendendo in considerazione i nostri elementi da classificare, tutti all’interno dei numeri reali, il fuzzy set costituisce una modalità per attribuire valori di appartenenza tra 0 e 1, cioè non strettamente binari (vero/falso) (Birkhoff, 1948). La funzione che descrive il fuzzy set consente di disporre ogni valore all’interno dell’intervallo [0;1], in cui 1 rappresenta la totale appartenenza e 0 l’assoluta non appartenenza. Ogni valore nell’intervallo rappresenta un diverso livello di appartenenza.

Nel nostro caso abbiamo utilizzato la funzione fuzzy monotona $f(x, a, b)$:

$$f(x, a, b) = \begin{cases} 0 & x < a \\ \left[1 + (x - a)^3\right] / (a + b)^3 & a < x < b \\ 1 & x > b \end{cases} \quad \text{Con } x, a, b \in \mathfrak{R}$$

Equazione 1- Fuzzy Function

Tale funzione determina il grado di appartenenza di ogni output metrico con il suo gruppo. Il risultato dell’applicazione della funzione descritta in precedenza è stato valutato utilizzando la tecnica degli “expert weights” in modo da definire un set di numeri omogeneo da poter essere utilizzato per definire dei valori di ranking per i nostri parametri. Gli expert weights sono uno strumento necessario per individuare una gerarchia all’interno dei parametri presi in esame. Le gerarchie vengono assegnate dall’operatore (Decision maker DM) e per questo possono mutare in funzione delle necessità del DM che le utilizza (Bellocchi et al. 2002). L’assegnazione dei pesi è un processo interno non ben definito e documentato. I pesi vengono quindi utilizzati, dal DM, come indicatori di importanza dei parametri in competizione (Jones and Barnes, 2000).

Risultati e discussione

Per determinare quale fosse il miglior metodo di estrazione per le matrici prese in considerazione il DNA è stato estratto in triplo con tutti i metodi di estrazione presi in considerazione nella sezione precedente e ogni procedura di estrazione è stata ripetuta per tre volte.

Qualità e quantità del DNA estratto

La qualità e la quantità del DNA estratto è stata valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio, analisi spettrofotometriche e fluorimetriche.

L'elettroforesi del DNA genomico estratto da pomodoro fresco mostra che con il kit QIAamp DNA Stool Minikit si ottiene un DNA con un basso grado di degradazione; nonostante ciò il DNA estratto dalle matrici processate ha una concentrazione molto bassa che non può essere determinabile tramite elettroforesi su gel di agarosio.

L'applicazione dell'analisi spettrofotometrica è stata utilizzata unicamente per la valutazione della contaminazione proteica all'interno del campione a causa della bassa sensibilità della tecnica in casi in cui il DNA estratto sia notevolmente degradato (Singer et al., 1997). In questi casi la maggior parte dei valori dell'assorbanza dei campioni è dovuta alla presenza di nucleotidi liberi e acidi nucleici a singolo filamento. L'analisi spettrofotometrica inoltre risente delle interferenze di contaminanti aromatici come i fenoli all'interno del campione.

L'utilizzo della fluorimetria accoppiata con il fluorocromo PicoGreen[®] mostra una risposta lineare nel range da 0,1ng a 100ng di DNA (Romppanen et al. 2001) si rivela più applicabile alle nostre analisi. Questa tecnica aumenta l'accuratezza della stima della concentrazione del DNA nei campioni eliminando le interferenze legate alla presenza di contaminanti come proteine, nucleotidi liberi e composti aromatici.

I risultati della quantificazione fluorimetrica del DNA estratto da tutti i campioni con tutti i metodi sono mostrati nella tabella 4. Nell'ultima colonna della tabella 4 sono inseriti i valori p ottenuti dalla comparazione dei vari protocolli di estrazione per ogni campione effettuando il test di Kruskal-Wallis a due variabili indipendenti utilizzando il programma per analisi statistiche SPSS. Tutti i confronti sono risultati altamente significativi con un valore di $p < 0,01$, questo indica una bassa variabilità per ogni metodo quando viene applicato alla stessa matrice.

	KIT COMMERCIALI				PROTOCOLLI CONVENZIONALI			Kruskal-Wallis p-value
	WIZARD	STOOL	FORENSIC	FOOD	SDS	CTAB	CTAB MODIFICATO	
Pomodoro fresco	100 ± 2	19 ± 4	167 ± 2	115 ± 13	251 ± 1	102 ± 14	174 ± 7	0,006**
Salsa di pomodoro	13 ± 0.2	0.1 ± 0.04	9 ± 0.5	86 ± 7	112 ± 16	155 ± 10	225 ± 3	0,005**
Passata di pomodoro	10 ± 0.5	0.2 ± 0.1	12 ± 0.1	57 ± 9	145 ± 1	141 ± 5	156 ± 2	0,003**
Pelati S. Marzano DOP	19 ± 2	0.3 ± 0.04	30 ± 2	88 ± 2	101 ± 1	165 ± 2	230 ± 9	0,004**
Pomodori pelati	10 ± 0.5	0.1 ± 0.02	14 ± 0.2	57 ± 0.2	132 ± 16	110 ± 9	197 ± 0.4	0,004**
Polpa di Pomodoro	16 ± 1	0.1 ± 0.08	15 ± 0.3	65 ± 1	132 ± 1	126 ± 0.4	219 ± 0.5	0,004**
Concentrato di pomodoro	14 ± 0.5	0.1 ± 0.02	6 ± 0.1	9 ± 2	99 ± 4	103 ± 12	213 ± 3	0,004**
Sugo all'arrabbiata	18 ± 2	0.1 ± 0.02	8 ± 1	8 ± 1	128 ± 31	26 ± 0.3	212 ± 2	0,004**
Kruskal-Wallis p-value	0,003**	0,05*	0,002**	0,003**	n.s.	0,004**	0,004**	

Tabella 4- Riassunto delle rese medie in µg per grammo di prodotto estratto per tutti i metodi per tutti i prodotti; nell'ultima riga e nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività ottenuti con il test di statistica non parametrica Kruskal-Wallis. (Turci et al., 2010)

Confrontando le rese di DNA di tutti i metodi di estrazione si evidenzia che il modo CTAB modificato fornisce una resa di DNA genomico significativamente superiore rispetto agli altri metodi di estrazione ($p=0,004$). Analizzando la tabella 4 è evidente come il metodo SDS sia il migliore nel caso in cui si voglia estrarre DNA dalla matrice pomodoro fresco. Tra i kit commerciali testati si osserva che il NucleoSpin Food fornisce una resa di estrazione significativamente alta per sei matrici su otto; risulta migliore rispetto a ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit, Wizard kit e QIAamp DNA Stool Minikit.

Confrontando tutte le matrici della filiera di trasformazione del pomodoro risulta che la matrice pomodoro fresco sia il campione da cui è possibile estrarre la maggiore quantità di DNA considerando tutti i metodi di estrazione, mentre le matrici con un elevato grado di processamento, come il concentrato di pomodoro e il sugo all'arrabbiata, hanno una resa di estrazione più bassa.

Durante la maturazione le cellule del pericarpo del pomodoro vanno incontro ad un processo di endoreduplicazione che provoca una poliploidia del frutto (Bergervoet et al. 1996); questo

fattore potrebbe rappresentare un vantaggio durante l'estrazione di DNA dai prodotti a base di pomodoro, consentendo di ottenere un'elevata concentrazione di materiale genomico per unità di peso di prodotto fresco.

La quantità di DNA estratta dai campione presi in considerazione è dipendente dal tipo di matrice e dal livello di processamento; nonostante ciò, molti dei metodi testati forniscono una resa inferiore rispetto a quello descritto da Pauli et al. nel 2000 basato su un tampone contenente guanidina cloridrato seguito da una purificazione tramite colonnine Wizard. Con quest'ultimo metodo si ottiene una resa inferiore a 1 µg di DNA per 100mg di prodotto.

Amplificabilità del DNA estratto

Uno dei parametri utilizzati per stimare la qualità del DNA estratto dalle matrici alimentari è la sua possibilità di essere amplificato mediante PCR. I punti critici per l'analisi molecolare sulle matrici alimentari sono: i) la presenza di inibitori all'interno del campione di DNA da analizzare, ii) il livello del danno subito dal DNA durante le procedure di estrazione e iii) il livello di frammentazione del DNA estratto (Di Bernardo et al., 2007; Marmiroli et al., 2003; Peano et al., 2004).

Il DNA estratto dalle diverse matrici è stato amplificato con la coppia di primer disegnata sul locus Cleb1P20 descritto nella sezione materiali e metodi.

Dopo la corsa elettroforetica degli amplificati di tutti i campioni di DNA ottenuti con tutti i metodi di estrazione, è risultato che il DNA estratto dalla matrice pomodoro fresco fornisce sempre un amplificato di taglia corretta (200pb), indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato per ottenere il DNA. Prendendo in considerazione tutte i metodi di estrazione e tutti i campioni è possibile osservare che solo il DNA estratto con il metodo Wizard fornisce un prodotto di PCR della taglia attesa per tutte le matrici analizzate.

È importante notare che il successo delle amplificazioni, la complessità delle matrici e l'efficienza del metodi di estrazione, intesa come resa di DNA estratto, siano parametri indipendenti tra loro (Figura 5). Infatti, il metodo di estrazione CTAB e quello con resa di estrazione più alta, ma in molti casi la reazione di PCR non produce nessun amplificato.

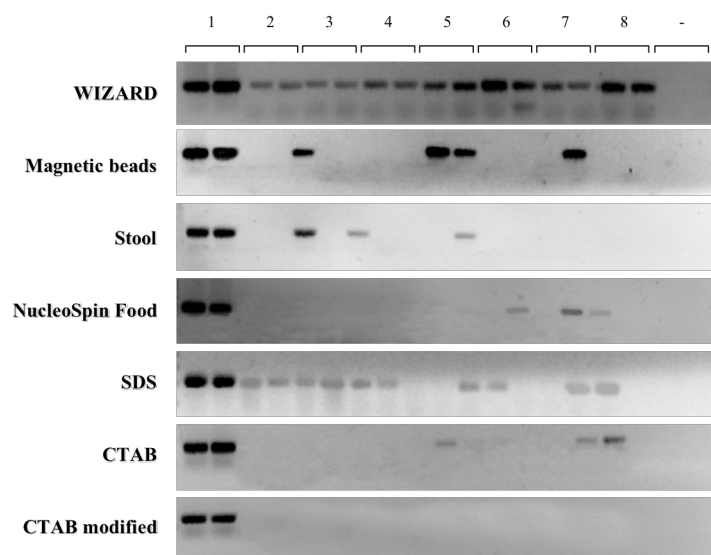


Figura 5- elettroforesi su gel di agarosio delle amplificazioni ottenute con la coppia di primer LEat002 (203pb). Nella linea 1 è stata caricata l'amplificazione del DNA estratto da pomodoro fresco, nella linea 2 l'amplificazione del DNA estratto da salsa di pomodoro, nella linea 3 l'amplificazione del DNA estratto da passata di pomodoro, nella linea 4 l'amplificazione del DNA estratto da polpa di pomodoro, nella linea 5 l'amplificazione del DNA estratto da pomodori pelati San Marzano DOP, nella linea 6 l'amplificazione del DNA estratto da pomodori pelati, nella linea 7 l'amplificazione del DNA estratto da doppio concentrato di pomodoro, nella linea 8 l'amplificazione del DNA estratto da sugo all'arrabbiata e nella linea – il controllo negativo di amplificazione. (Turci et al., 2010)

Livello di degradazione del DNA estratto dalle diverse matrici

Per quest'analisi abbiamo preso in considerazione unicamente i campioni di DNA ottenuti mediante il metodo Wizard in quanto in precedenza si è dimostrato essere l'unico metodo che ha consentito di ottenere DNA amplificabile con tutte le matrici prese in esame. La misura del livello di degradazione del DNA estratto è stata effettuata eseguendo reazioni di amplificazione con i primer riportati nella sezione materiali e metodi. Tali primer forniscono amplificati di lunghezza variabile da circa 100pb fino a 700pb. Hemmer nel 2008 ha riportato che amplificando il DNA estratto dalla passata di pomodoro è possibile ottenere frammenti di lunghezza di circa 506pb. È stato dimostrato anche che trattando il succo di pomodoro a pH 4,3 il DNA non subisce danni e non si hanno effetti sull'amplificabilità dello stesso (Bauer et al. 2003).

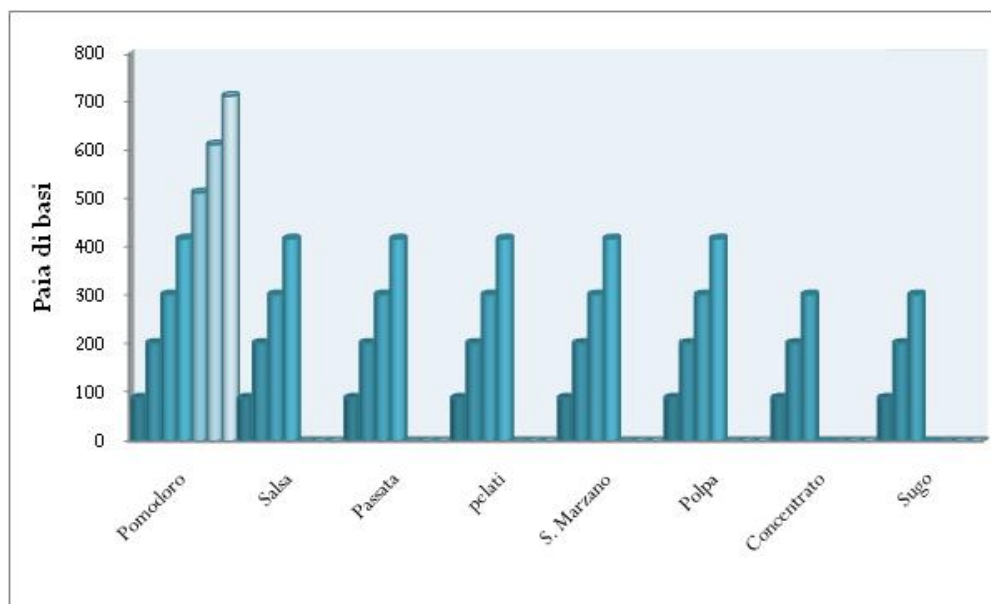


Figura 6- Schematizzazione della lunghezza degli amplificati ottenuti per ogni prodotto analizzato

Nel nostro caso è possibile ottenere amplificati per tutte le coppie di primer utilizzate per il DNA estratto dalla matrice pomodoro fresco. Analizzando i prodotti di amplificazione ottenuti dal DNA estratto dalle matrici più complesse è possibile individuare una linea di demarcazione tra le matrici meno processate, quali le passate e i pomodori pelati, e quelli più processate. Al contrario rispetto a quello affermato da Hemmer nel 2008, in questo lavoro si sono ottenuti amplificati di lunghezza non superiore alle 400pb per le matrici meno processate, mentre per il concentrato e il sugo all'arrabbiata la lunghezza massima degli amplificati ottenuti è stata di 300pb. Questi risultati indicano che mentre il DNA estratto dalla matrice pomodoro fresco è abbastanza integro, per quello estratto da matrici processate mostra una notevole frammentazione dovuta probabilmente ai trattamenti termici e meccanici subito durante la lavorazione della materia prima (Figura 6).

Nonostante questa frammentazione, è pensabile di poter utilizzare il DNA estratto dai prodotti a base di pomodoro per effettuare analisi con metodologie genomico-molecolari.

Valutazione dell'efficacia dei metodi di estrazione mediante la Fuzzy logic

Per la valutazione dell'efficacia dei metodi di estrazione presi in esame sono stati presi in considerazione, oltre alla resa di estrazione e all'amplificabilità del DNA estratto, anche parametri come tempo impiegato per l'intera reazione, tempo impiegato dall'operatore,

costo per estrazione e per reazione di PCR andata a buon fine. Nella tabella 5 sono riassunti tutti i parametri presi in considerazione per la valutazione.

	KIT COMMERCIALI				PROTOCOLLI CONVENZIONALI			Valori di Fuzzy logic e weights	
	WIZARD	STOOL	FORENSIC	FOOD	SDS	CTAB	CTAB MODIFICATO	Variabili [a, b] e intervallo di cut-off	Expert weighth v_i
Tempo operatore (min)	120	90	150	120	600	600	420	[0, 180]	1
Tempo totale	1080	90	150	120	600	600	1380	[0, 420]	1
Costo per estrazione (€)	1.77	4.91	2.59	3.63	1.5	1.15	1.12	[0, 2]	1
PCR/estrazione	250	25	330	610	1380	1160	2030	[200, 5000]	-0.001
PCR avvenute con successo per reazioni effettuate	1	0.31	0.38	0.31	0.75	0.44	0.12	[0.4, 1]	2
Costo per reazione di PCR avvenuta con successo (€)	0.07	2.16	0.18	0.10	0.08	0.16	0.23	[0, 0.4]	-1
Valore Finale	2.47	2.13	1.52	1.29	2.0	1.81	-0.19		
Ranking	1	2	4	6	3	5	7		

Tabella 5- Riassunto dei parametri presi in considerazione per effettuare la classificazione dei metodi di estrazione e relativi pesi. Nell'ultima riga sono indicati i valori ottenuti dall'applicazione della Fuzzy Function (equazione 1) mentre nell'ultima riga è riportata la classificazione dei metodi in base a questi valori. (Turci et al., 2010)

Per la stima dei costi di estrazione e di PCR riportati nella tabella 5 sono stati utilizzati i prezzi di mercato correnti. Il numero di reazioni di PCR per ogni estrazione è stato stimato valutando le rese di estrazione riportate nella tabella 5 e assumendo che ogni reazione di PCR richiede 100 ng di DNA. Uno dei parametri più importanti è il numero di reazioni di PCR andate a buon fine in rapporto al numero totale di reazioni di PCR effettuate; questo parametro deriva direttamente dal livello di amplificabilità del DNA estratto ed è tanto migliore quanto più è vicino ad uno.

Considerando solo il tempo richiesto all'operatore per effettuare l'estrazione e il tempo totale richiesto per portare e terminare l'estrazione è possibile osservare come i protocolli convenzionali necessitino di un maggior numero di ore rispetto ai kit commerciali, eccezion fatta per il kit Wizard, che ha un tempo di esecuzione molto simile ai protocolli convenzionali.

Per quel che riguarda i costi, in generale, i kit commerciali richiedono reagenti più costosi rispetto ai protocolli convenzionale, questi ultimi richiedono maggiori spese per il personale. È da tenere presente, inoltre, che il tempo di incubazione over night (O.N.), richiesto da alcuni metodi di estrazione, non è stato incluso nel computo dei costi.

Il ranking finale di tutti i metodi di estrazione è stato effettuato prendendo in considerazione tutti i parametri indicati nella tabella 5 utilizzando la logica fuzzy abbinata ad un approccio matematico definito "expert weights". L'expert weights è stato assegnato, con un variabile al grado di appartenenza, ad uno dei due gruppi fuzzy G oppure B.

Il risultato finale ha dimostrato che il kit Wizard è il metodo più efficace, mostra una buona proporzione di PCR avvenute con successo e bassi costi. Prendendo in considerazione i protocolli convenzionali il migliore risulta essere il metodo basato sul tampone SDS. Questo metodo è poco costoso, ma richiede molto tempo per essere eseguito, inoltre, le reazioni di amplificazione non sempre vanno a buon fine anche se la resa di estrazione è buona.

Concludendo è possibile affermare che il metodo più efficace per estrarre DNA, tra gli otto metodi presi in considerazione, da tutte le matrici prese in esame, risulta essere il kit Wizard, tale metodo non ha una resa di estrazione non molto elevata, ma fornisce DNA di buona qualità in grado di essere amplificato partendo da tutti campioni analizzati.

CARATTERIZZAZIONE VARIETALE DI
ALCUNE CULTIVAR DI POMODORO
LOCALI DA MENSA E DA INDUSTRIA - IL
PROBLEMA DELLA “*IDENTITY PRESERVATION*”
(IP)

Introduzione

L'importanza del riconoscimento varietale

Il riconoscimento varietale è un punto fondamentale per contrastare le frodi commerciali. Tali di frodi ledono i diritti contrattuali e patrimoniali del consumatore; avvengono nel caso in cui, nell'esercizio di un'attività commerciale, si attua la "consegna all'acquirente di una cosa per un'altra, o diversa da quella dichiarata o pattuita per origine, provenienza, qualità o quantità" (art. 155 Codice Penale). Per configurare una frode in commercio, è sufficiente una delle seguenti discrepanze rispetto a quanto indicato in etichetta: *i)* indicazione d'origine del prodotto o provenienza, *ii)* sistema di preparazione, *iii)* quantità.

Per questo motivo diventa importante sviluppare strumenti rapidi ed efficienti per permettere l'identificazione di tali frodi.

Alcuni esempi di riconoscimento varietale a fini commerciali

Identificazione varietale del riso Basmati

Il riso Basmati è apprezzato per il suo aroma distintivo, per il suo gusto speziato, per i suoi chicchi lunghi e sottili e per le sue peculiari qualità culinarie. Le varietà di riso usate per produrre il riso Basmati sono originarie delle colline ai piedi dell'Himalaya e sono state soggette a secoli di selezione e coltivazione. Sebbene queste varietà producano un chicco di alta qualità gastronomica, presentano numerosi tratti agronomici problematici come la mancanza di risposta alle fertilizzazioni, la sensibilità al fotoperiodo e la difficoltà nel raccolto, a causa dell'altezza delle piante e alla debolezza degli steli.

Per contenere questi difetti, le varietà di Basmati sono state incrociate con varietà di riso a grani lunghi moderne e migliorate, producendo un riso Basmati ibrido. Entrambe le varietà sono state approvate e considerate come Basmati, ma le varietà Basmati originali sono vendute ad un prezzo maggiore. In più, esistono alcune varietà di riso a chicchi lunghi che sono simili al riso Basmati ma che non hanno le stesse caratteristiche. Alla luce di questo, acquista fondamentale importanza riuscire ad identificare le diverse varietà di riso Basmati e riso a grani lunghi (Kush and de la Cruz, 1997; Woolfe and Primrose, 2004).

Un primo studio ha dimostrato come 12 SSLP (simple sequence length polymorphism) possano essere utilizzati per discriminare tra il riso Basmati e altri tipi di riso a chicchi lunghi, anche se è stato dimostrato che tali marcatori molecolari non sono in grado di distinguere completamente le linee ibride da quelle originarie (Bligh et al. 1998 e 2000). Per migliorare la capacità di discriminazione si è reso necessario individuare e selezionare 39 microsatelliti presenti nelle regioni cromosomali collegate ai tratti distintivi (QTL quantitative trait loci) del riso Basmati. Confrontando tre di questi microsatelliti con i 12 marcatori SSLP precedentemente identificati, è possibile discriminare con facilità ogni varietà di riso Basmati. Inoltre, utilizzando molecole fluorescenti per marcare i primer per i microsatelliti SSLP la discriminazione varietale diventa quantitativa (Woolfe and Primrose, 2004).

Identificazione varietale della patata

Le patate sono un elemento base di molte diete occidentali e vengono cucinate e consumate in diversi modi: bollite, al forno, fritte e in altri modi ancora; inoltre dal distillato di amido di patata si ottiene la vodka. Commercialmente è disponibile un ampio numero di varietà di patate, molte delle quali hanno usi finali specifici (come per esempio per la frittura) o sono apprezzate per il loro gusto e consistenza. Nella corrente legislazione europea esistono diverse normative (2200/1996) che prevedono che le patate debbano essere etichettate con il nome della loro varietà. Questo vale sia per la protezione del consumatore, sia per una forma di controllo di qualità; nasce quindi l'esigenza di sviluppare metodi affidabili per l'identificazione varietale. Inizialmente, per il riconoscimento varietale della patata, veniva utilizzata l'elettroforesi delle proteine e i profili isoenzimatici. Questi metodi però non sono particolarmente affidabili, perché tali profili dipendono dallo stadio di sviluppo e dalle condizioni di conservazione dei tuberi. Le analisi sul DNA possono risolvere alcuni di questi problemi, quindi inizialmente sono stati sviluppati dei metodi di analisi RFLP e RAPD (Gorg et al., 1992; Demeke et al., 1996; Sosinski et al., 1996). Queste tecniche continuano ad avere alcuni svantaggi per quel che riguarda il potere discriminante di conseguenza sono state sostituite dalle analisi SSLP, con cui Corbet (2001) è riuscito a differenziare 50 varietà comuni di patate cresciute in Gran Bretagna (Woolfe and Primrose, 2004).

Identificazione varietale del grano tenero nella pasta

Le analisi sulla composizione di pasta e semolino richiedono un approccio quantitativo in quanto questi generi alimentari dovrebbero essere preparati solo con farina che deriva da *Triticum durum* (grano duro). La farina prodotta a partire da cariossidi di *T. durum* è un prodotto pregiato e piuttosto costoso, l'adulterazione con farine più economiche prodotte da cariossidi di grano tenero (*T. aestivum*) è piuttosto comune. La farina adulterata produce una pasta di qualità inferiore. Il grano tenero è esaploide (allopoliploide segmentale) e ha tre genomi (A, B e D), mentre *T. durum* è tetraploide (allopoliploide segmentale stretto) e non ha il genoma D (Bryan et al., 1998). I due genomi A e B sono molto simili, mentre il genoma D è più lontano filogeneticamente. Il *T. durum*, infatti, è una varietà addomesticata dell'ancestore *T. Turgidum* (AABB) mentre il *T. aestivum* è un incrocio tra *T. turgidum* spp., *Dicococcum* e *Ae tauschii* che porta il genoma D. Quindi il genoma D è filogenicamente distinto dagli altri due perché deriva da un ancestrale molto distante che è stato introdotto solo dopo addomesticamento delle varietà *monococcum* e *turgidum* spp.. Per l'identificazione delle due specie di grano è stata identificata una sequenza (PSR 128) che mostra un elevato grado di polimorfismo tra i tre genomi e un modesto, ma un non trascurabile grado di polimorfismo all'interno dei genomi. In particolare, un introne nel genoma D è caratterizzato da una sequenza di 54 bp, assente nei genomi A e B. La lunghezza di questo introne è un marcatore efficiente per distinguere la farina di grano tenero da quella di grano duro. Attualmente, è possibile quantificare l'adulterazione con una serie di campioni di riferimento sulla pasta, preparati con la farina di grano duro adulterata con diverse quantità di farina di grano tenero (Woolfe and Primrose, 2004).

Identificazione varietale delle olive all'interno dell'olio di oliva

L'olio di oliva è uno dei più importanti prodotti dell'industria agroalimentare, infatti è tra i più importanti della dieta mediterranea non solo per le sue proprietà organolettiche ma anche per le sue proprietà benefiche sulla dieta e di conseguenza sulla salute umana. (Wahrburg et al., 2002). La sua qualità e la sua salubrità sono governati dalla legislazione internazionale con particolare riferimento alla eventuale presenza di contaminanti come: residui di pesticidi, tracce di metalli pesanti, tossine ed allergeni. (www.fda.gov/Food/FoodSafety/default.htm).

La tracciabilità suoi prodotti oleari e in particolare sull'origine dell'olio extravergine di oliva viene condotta, convenzionalmente, tramite la combinazione di analisi sensoriali chimiche e fisiche: cromatografia liquida ad alta risoluzione accoppiata a spettrometria di massa (HPLC-MS), gas-cromatografia (HPLC-GS), analisi isotopiche e nanosensori come il naso elettronico. (Arvanitoyannis e Valchos, 2007). In particolare, il riconoscimento dell'origine geografica degli oli extravergine di oliva viene effettuato mediante la caratterizzazione del contenuto in metaboliti degli stessi, in particolare attraverso la verifica della composizione degli acidi grassi e dei triacil gliceroli combinati con l'identificazione della componente fenolica o con analisi isotopiche (Ollivier et al., 2006; Galtier et al. 2007; Cavaliere et al., 2007).

Questi metodi presentano lo svantaggio di non essere però in grado di riconoscere la varietà di olive con cui è stato prodotto l'olio, in quanto il contenuto in metaboliti e il rapporto isotopico sono strettamente dipendenti dalle condizioni ambientali a cui l'albero è esposto.

Il DNA contenuto nelle piante e negli alimenti non viene influenzato da cambiamenti nell'ambiente in cui gli individui sono inseriti; è per questo che si sono sviluppate metodologie basate su marcatori molecolari in grado di caratterizzare le varietà che compongono l'olio di oliva.

Con l'utilizzo di appropriati metodi di estrazione di DNA, la scelta di opportuni marcatori molecolari, lo sviluppo di piattaforme analitiche e le possibilità di generare una "carta d'identità" attraverso la genotipizzazione del DNA si potrebbe arrivare ad un'identificazione univoca degli oli ad alto valore economico (Marmioli et al., 2009).

Il primo protocollo di estrazione del DNA da olio di oliva è stato messo a punto da Busconi et al. (2003) e da Muzzalupo e Perri (2002) che hanno applicato, modificandolo in funzione della complessità della matrice, il metodo CTAB (Doyle and Doyle 1987) ai sedimenti di un olio sperimentalmente prodotto. Altri metodi di estrazione del DNA dall'olio di oliva sono stati sviluppati durante il progetto europeo "OLIV-TRACK" (www.dsa.unipr.it/foodhealth/oliv-track/overview.html). L'attività di ricerca svolta durante il progetto ha consentito di identificare differenti approcci estrattivi: metodi basati su CTAB, come citato in precedenza, metodi commerciali che utilizzano resine che legano il DNA (Pasqualone et al., 2007; Bretone et al., 2004; Testolin e Lain 2005; Vietina et al., submitted; Pafundo et al., submitted) e metodi che prevedono trattamenti con solventi organici come esano o altri detergenti (Pafundo et al., 2005; Consolandi et al., 2008).

Per quel che concerne l'identificazione varietale degli oli di oliva sono stati pubblicati studi che prendono in considerazione l'utilizzo di marcatori molecolari SSR, AFLP e SCAR. Tra tutti i marcatori molecolari proposti gli SSR sono quelli che meglio si applicano allo scopo in quanto risultano relativamente polimorfici, possono essere facilmente adattati alle piattaforme di genotipizzazione high-throughput per l'analisi contemporanea di numerosi campioni. Tali marcatori molecolari sono stati testati, per l'utilizzo su olio di oliva, da numerosi gruppi (Testolin e Lain, 2005; Pasqualone et al., 2004; Pasqualone et al., 2007; Martins-Lopes et al., 2008; Alba et al., 2009; Ayed et al., 2009); questi lavori presentano alcune limitazioni dell'utilizzo degli SSR in quanto i profili ottenuti possono presentare bande fantasma e bande di stutter che complicano la corretta attribuzione allelica.

A causa della difficile attribuzione degli SSR spesso è preferibile l'utilizzo degli AFLP che consente di effettuare una genotipizzazione basata su loci polimorfici multipli. Con questi marcatori molecolari è stata ottenuta con corrispondenza di profilo tra foglia e olio di oliva intorno al 70% (Pafundo et al., 2005; Montemurro et al., 2008), anche se con tali marcatori non è stato possibile ottenere, da olio di oliva, frammenti superiori a 250pb (Busconi et al., 2003; Pafundo et al., 2005). Nonostante la tecnica AFLP sia molto informativa è anche molto complessa, costosa ed estremamente dipendente dal temperato che si utilizza. Partendo da questi marcatori molecolari è stato però possibile identificare AFLP varietà specifici che sono stati convertiti in SCAR. Attraverso l'utilizzo di SCAR ottenuti tramite un set di RAPID, AFLP e SAMPL (selectively amplified microsatellite polymorphic loci) applicati a foglie, Busconi et al. (2006), sono stati in grado di discriminare in modo univoco 26 varietà di olivo. Partendo da questi marcatori SCAR, che non potevano essere utilizzati direttamente su DNA estratto da olio di oliva, Pafundo et al. (2007) svilupparono una strategia che ha consentito di ottenere marcatori SCAR direttamente da olio. Lo sviluppo di tali marcatori ha portato alla possibilità di discriminazione di 59 varietà di olio di oliva in 4 gruppi principali.

I marcatori molecolari

I marcatori molecolari sono sequenze di DNA che presentano un elevato grado di polimorfismo e possono, per questo, essere usati per diversi scopi tra cui: *i*) mappatura genetica, *ii*) analisi di linkage ovvero di associazione locus-malattia, *iii*) genetica forense e test del DNA, *iv*) Food genomics.

Un secondo modo per definire un marcatore molecolare è definirlo come quel “locus genomico rilevabile con sonde (probe) o inneschi (primer) specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3'.

L'utilizzo dei marcatori molecolari comporta la rilevazione di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA; tali differenze possono essere dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni o mutazioni puntiformi.

I marcatori molecolari non subiscono interferenze da parte dell'ambiente, coprono qualsiasi parte del genoma permettendo di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili, non presentano effetti epistatici o pleiotropici, in molti casi sono codominanti consentendo così la distinzione dell'eterozigote dall'omozigote, sono strumenti di indagine estremamente efficaci ed affidabili e trovano larga applicazione nella ricerca di base e in quella applicata.

Vi sono diversi tipi di marcatori molecolari, di seguito elencherò e spiegherò le caratteristiche di alcuni dei principali marcatori molecolari utilizzati nella ricerca.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

I marcatori molecolari RAPD sono basati su polimorfismi di lunghezza di regioni genomiche amplificate. L'analisi dei marcatori molecolari RAPD è stata sviluppata contemporaneamente da due laboratori indipendenti (Williams et al., 1990 e Welsh & McClelland, 1990). È una tecnica basata sull'amplificazione di frammenti di DNA tramite PCR. L'utilizzo di tali marcatori prevede l'amplificazione del DNA non mirata a sequenze bersaglio, ma a regioni genomiche casuali, tramite l'impiego di oligonucleotidi di sole 10 bp. Il profilo elettroforetico ottenuto presenta un numero variabile di frammenti di diversa lunghezza. Inserzioni o delezioni che interessino le sequenze bersaglio, come pure mutazioni puntiformi a livello delle sequenze complementari al primer impediscono l'amplificazione del frammento e generano un polimorfismo rilevabile per la presenza o l'assenza sul gel della banda corrispondente al frammento amplificato. Queste caratteristiche rendono i RAPD dei marcatori mendeliani dominanti: non permettono di distinguere tra individui omozigoti ed eterozigoti per un dato locus.

Le analisi RAPD sono state ampiamente utilizzate sia a scopo filogenetico in ditteri (Wilkerson et al., 1993), crostacei (Roman and Dalens 1999), sia di genetica di popolazione.

Infatti, alcuni lavori descrivono come utilizzando questa tecnica sia possibile determinare come individui provenienti da popolazioni distinte potessero appartenere alla stessa specie (Baratti et al., 1999).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La tecnica AFLP è stata messa a punto da Vos et al., nel 1995; è una tecnica basata sulla combinazioni di due diverse fasi: la digestione del DNA genomico con una coppia di enzimi di restrizione e l'amplificazione selettiva dei frammenti ristretti mediante l'ausilio di primer specifici complementari alle sequenze di taglio. Questa tecnica può essere universalmente applicabile a tutti gli organismi viventi, permettere l'analisi contemporanea di un grosso numero di loci genetici, inoltre non sono necessarie informazioni sulle sequenze da analizzare. Questi marcatori presentano un'elevata riproducibilità e una realizzazione sperimentale semplice. La tecnologia AFLP è stata impiegata per analizzare il DNA estratto da diversi tipi di olio di oliva, l'analisi è stata condotta con primer fluorescenti attraverso elettroforesi capillare per caratterizzare gli ampliconi. L'elettroforesi capillare permette di discriminare frammenti molto piccoli e di dimensioni prossime fra loro. Busconi et al., (2003) hanno utilizzato marcatori AFLP, su DNA estratto da diversi oli dimostrando che i profili ottenuti erano in parte sovrapponibili a quelli ottenuti dal DNA estratto dalle foglie della cultivar di riferimento, con cui l'olio era stato prodotto. Per implementare le metodiche di tracciabilità molecolare per l'olio di oliva con l'approccio AFLP, Pafundo et al., (2005) hanno ottimizzato il protocollo descritto da Busconi et al. (2003), analizzando i diversi parametri che influiscono sull'efficienza e sull'accuratezza dell'analisi, come: il tampone di restrizione, la concentrazione di dNTP e di primer, il grado di diluizione dei prodotti di ligazione/restrizione, il tipo di Taq Polimerasi, il tipo di termociclatore, la quantità di DNA estratto da olio da utilizzare in reazione e la combinazione dei primer utilizzata nell'amplificazione selettiva.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La tecnica degli RFLP si basa sulla scoperta degli enzimi di restrizione di origine batterica, capaci di operare un taglio in punti precisi, corrispondenti a sequenze note, del DNA e sullo sviluppo della tecnologia del "clonaggio genico", che ha permesso l'isolamento e la manipolazione di specifici frammenti di DNA.

L'utilizzo degli RFLP come marcatori molecolari fu suggerita da Botstein et al, 1980. Questi autori furono i primi a proporre la valutazione delle differenze tra individui a livello di sequenze nucleotidiche del DNA. Infatti, fu scoperto che la lunghezza o la dimensione dei frammenti di restrizione di un dato locus di un cromosoma, ottenuti dopo digestione enzimatica, variava in individui della stessa specie e di specie diverse. Queste differenze furono denominate polimorfismi della lunghezza del DNA, poi utilizzati come marcatori molecolari in studi di genetica umana (per la realizzazione di mappe di associazione genetica) (Botstein et al., 1980; Donis-Keller et al., 1987).

L'analisi degli RFLP consiste nella valutazione delle differenze in peso molecolare di frammenti di restrizione omologhi ottenuti digerendo il DNA genomico con enzimi di restrizione noti. La presenza di tali polimorfismi è conseguenza diretta della variabilità naturale esistente nelle sequenze delle basi del DNA degli individui. Questa variabilità è messa in evidenza grazie all'uso degli enzimi di restrizione, endonucleasi batteriche, capaci di tagliare il legame fosfodiesterico del DNA a doppia elica in punti specifici, generalmente sequenze lunghe da 4 a 8 coppie di basi diverse per ciascun enzima.

Il DNA genomico sottoposto all'azione degli enzimi di restrizione viene pertanto tagliato in frammenti la cui lunghezza è determinata dalla posizione sul cromosoma dei siti di taglio corrispondenti alle sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione.

Il polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione esiste in quanto esiste una variabilità nel DNA di organismi diversi. Una sequenza di DNA può mutare in lunghezza in seguito ad eventi di inserzione e delezione. Tale situazione porta alla perdita di siti di restrizione, oppure alla creazione di nuovi siti di taglio o ad una variazione nella lunghezza dei frammenti di restrizione. Il filamento di DNA viene tagliato in una serie di frammenti la cui lunghezza e numero dipende dallo specifico enzima utilizzato e dal numero dei siti di restrizione distribuiti lungo il DNA. In individui geneticamente diversi sono quindi prodotti frammenti di lunghezza e di peso molecolare diversi. Infatti, se un sito di restrizione va incontro ad una mutazione, quindi non viene riconosciuto dall'enzima specifico, si avrà la formazione di due alleli (uno tagliato e l'altro no) che possono essere evidenziati in quanto vengono prodotti segmenti di DNA con lunghezza diversa.

La variabilità relativa alla lunghezza dei frammenti viene evidenziata per mezzo dell'elettroforesi su un gel di agarosio o di poliacrilamide in cui la posizione dei frammenti è proporzionale al loro peso molecolare e alla loro lunghezza, e da qui trasferiti per capillarità

su un supporto solido quale una membrana di nylon o nitrocellulosa (Southern blotting). I frammenti di DNA presenti sulla membrana, precedentemente denaturati, vengono ibridizzati con sonde anch'esse denaturate e marcate con fosforo radioattivo.

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

Tali marcatori sono ricavati da analisi molecolari effettuate mediante RAPD o AFLP. Sono costituiti da sequenze di DNA univoche per un singolo individuo o per un gruppo di individui all'interno di una popolazione più ampia. Vengono scoperti individuando, durante le analisi AFLP o RAPD mediante elettroforesi capillare, dei frammenti caratteristici di un individuo o popolazione che possono essere usati come marcatori a singolo locus. Per la prima volta sono stati utilizzati per la caratterizzazione di una sequenza specifica che era stato dimostrato essere un marcatore indiretto di resistenza ad infezioni fungine in *Oryza sativa* (Navqi et al., 1996). La conversione di marcatori AFLP e RAPD in SCAR è quindi una possibile strategia per incrementare la sensibilità nel caso in cui si lavori con campioni di DNA degradato.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Per SNP si intendono mutazioni spontanee di su un singolo nucleotide (Brookes 1999). Gli SNP sono uniformemente diffusi nel genoma e di facile identificazione. Sono comunemente usati nella caratterizzazione della struttura delle popolazioni, nelle ricerche riguardanti la storia dei geni e hanno una notevole importanza per gli studi di mappaggio tramite ricombinazione.

Gli SNP possono essere classificati in funzione dell'effetto che hanno su un gene nel seguente modo: *i)* non codificanti, sono situati nelle regioni non trascritte in 5' o in 3' UTR (Untranslated Region); *ii)* codificanti, situati in regioni esoniche. In funzione del loro effetto a livello di sequenza codificante possono ulteriormente essere suddivisi in polimorfismi di sostituzione, in cui si ha un cambiamento dell'amminoacido codificato, oppure polimorfismi sinonimi o di sostituzione neutra, ovvero si ha un cambiamento del codone ma non del corrispondente amminoacido codificato, infine si possono avere polimorfismi di non sostituzione, tali mutazioni comprendono polimorfismi sinonimi e non codificanti, che possono, in ogni caso, influenzare le funzionalità del gene se si trovano per esempio nelle regioni regolative (Gibson et al., 2004). È possibile anche classificare gli SNP in base al tipo

di mutazione che identifica il polimorfismo. Si possono, infatti, riscontrare tre possibili transversioni $C \leftrightarrow A$ ($G1 \leftrightarrow T1$), $C \leftrightarrow G$ ($G1 \leftrightarrow C1$) e $T \leftrightarrow A$ ($A1 \leftrightarrow T1$), e una sola transizione $C \leftrightarrow T$ ($G1 \leftrightarrow A1$). Nell'uomo la frequenza dei quattro tipi di SNP non è uguale, infatti i 2/3 degli SNP riguardano il tipo $C \leftrightarrow T$ ($G1 \leftrightarrow A1$), tale fenomeno è dovuto probabilmente alla reazione di deaminazione della 5-metilcitosina, che avviene frequentemente a livello dei dinucleotidi CpG (Holliday and Grigg, 1993). Il vantaggio nell'utilizzo degli SNP è dato dall'elevato numero di polimorfismi presenti e che possono essere genotipizzati e dalla loro elevata densità lungo un genoma.

Nel campo vegetale i polimorfismi di un singolo nucleotide sono stati usati per studi di genetica di popolazione, analisi filogenetiche, e per la costruzione di mappe genetiche (Chiapparono et al., 2004; Jin et al., 2003; Rafalsky 2002). L'alta flessibilità degli SNP rende tali marcatori molecolari ottimali per la loro estrema adattabilità alle piattaforme "high-throughput", come microarray e Real-Time PCR, consentendo di realizzare analisi ad ampio spettro sia qualitative che quantitative.

SSR (Simple Sequence Repeat)

SSR è acronimo di Simple Sequence Repeat o microsatelliti, le analisi per determinare questi marcatori molecolari si basano sull'identificazione di polimorfismi nelle sequenze di DNA ripetute. Gli SSR o microsatelliti sono regioni di DNA caratterizzate dalla ripetizione in tandem di una stessa sequenza di 2-5pb, per esempio $(CA)_n$, $(GCC)_n$, $(GATA)_n$. La ripetizione AT è la più frequente nelle piante, mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione AC. Tali polimorfismi sono diffusissimi e interspersi nel genoma, inoltre presentano un elevato livello di variabilità all'interno di ciascuna specie (Rafalsky et al., 1996). È stato stimato che esiste, in media, una regione ripetuta ogni 50-750 Kb, in funzione del tipo di motivo ripetuto.

Le tecniche di analisi degli SSR si basano sull'amplificazione delle regioni di interesse tramite l'utilizzo di primer specifici, complementari alle regioni che fiancheggiano le sequenze ripetute. La visualizzazione dei frammenti amplificati avviene mediante tecniche elettroforetiche. I primer consentono di amplificare singoli microsatelliti che possono differire tra individui non per il motivo di base, ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto.

Gli SSR sono una classe di marcatori molecolari capaci di mettere in evidenza, all'interno delle popolazioni analizzate, una diversità genetica difficilmente rilevabile con altri tipi di marcatori, poiché, tali polimorfismi, sono localizzati in regioni ipervariabili e non codificanti del genoma.

Artefatti di genotipizzazione ottenibili mediante l'impiego di SSR

Durante la reazione di amplificazione mediante PCR di loci microsatelliti è possibile avere un numero di artefatti che possono interferire con una chiara interpretazione e genotipizzazione degli alleli presenti nel DNA template. Taberlet et al., 1996, Hoffman e Amos, 2005 hanno discusso le numerose fonti di errori che possono incorrere durante le analisi dei dati, includendo: pattern di “stutter bands”, “allele dropout”, “non template nucleotide”, “shadow bands” e “null-allele”. Una corretta analisi dei genotipi presenti in un gruppo di campioni deve quindi tenere conto di queste diverse problematiche.

Le “stutter bands” (bande accavallate) sono un classico problema dovuto allo scivolamento dell'enzima polimerasi lungo la sequenza del microsatellite, questo comporta che per ciascun allele si abbia un pattern con più bande. In modo particolare, per campioni in cui il DNA è di bassa qualità ed è presente una miscela di due o più individui, l'interpretazione dei dati può risultare difficile. Dalle analisi di elettroforesi capillare si ottiene un picco più alto che rappresenta l'allele del microsatellite analizzato mentre i picchi laterali costituiscono i prodotti di “stutter” ($n+1$, $n-1$, $n-2$, $n-3$). Nel caso delle ripetizioni dinucleotidiche, la “stutter band” prevalente è di 2 pb più piccola rispetto al picco principale, si possono però individuare picchi di “stutter” rispettivamente di 4 pb e 6 pb più piccole. L'intensità delle “stutter bands” è generalmente minore del 10% rispetto al picco principale (Murray et al., 1993). L'utilizzo di marcatori tri o tetra-nucleotidici permette di ottenere profili elettroforetici caratterizzati da un livello minore di bande “stutter”.

L’“allele dropout” (perdita di allele) consiste invece nell'amplificazione preferenziale di uno soltanto dei due alleli, generalmente il più piccolo fra i due. La causa di questo errore è spesso dovuta al basso numero di molecole amplificabili presenti nel campione. L’“allele dropout” è direttamente correlato con la dimensione degli alleli, loci caratterizzati da una differenza molto elevata tra l'allele più piccolo e quello più grande presentano una maggiore probabilità che uno dei due alleli non venga rilevato (Bjourklund 2005).

Un altro errore dovuto alla reazione di amplificazione è dato dalla tendenza della Taq polimerasi ad aggiungere all'estremità 3' dei prodotti di PCR una adenina durante la fase di

elongazione (Clark 1990; Magnuson et al., 1996). Tale errore porta all'aggiunta di una base alla reale dimensione dell'allele. Questo problema può essere risolto predisponendo un'incubazione finale compresa tra 60°C e 72°C in modo da favorire l'aggiunta di un nucleotide a tutti i prodotti di PCR, in modo tale da rendere omogenei i risultati (Clark 1990).

L'“allele nullo” rappresenta un'altra tipologia di errore che intercorre durante l'amplificazione, è dovuto ad una mutazione nel sito di appaiamento dei primer, questo porta alla mancata individuazione di un allele in caso di campioni omozigoti, generando errori di interpretazione. Il drastico calo della percentuale di eterozigotità all'interno di una popolazione è un chiaro indice della possibile presenza di mutazioni. Per risolvere questo problema è possibile operare durante la PCR utilizzando profili termici caratterizzati da una temperatura di annealing dei primer a bassa stringenza o, in alternativa, provvedere a ridisegnare una nuova coppia di primer per il locus microsatellite in esame (Micka et al., 1996).

Le “shadow bands” (bande fantasma) sono un altro possibile errore nell'uso di marcatori microsatelliti: è dovuto alla ricombinazione erronea dei singoli filamenti durante la fase di elongazione della PCR (Murray et al., 1993). Questo fenomeno genera bande estranee ai normali profili allelici. Questo errore viene rilevato soprattutto nelle amplificazioni di sequenze con ripetizioni dinucleotidiche utilizzando un alto numero di cicli di PCR.

Scopo della ricerca

Lo scopo di questo lavoro è creare un fingerprinting di tutte le cultivar di pomodoro testate in modo da generare e valutare il minor numero di microsatelliti necessari per discriminare tutte le varietà prese in considerazione e creare un pannello di microsatelliti in grado di individuare le cultivar utilizzate per produrre le passate di pomodoro.

In particolare sono state genotipizzate 20 varietà di pomodoro da salsa e da mensa mediante l'utilizzo di 12 microsatelliti. Con i risultati di quest'analisi è stato creato dapprima un albero filogenetico quindi sono stati individuati i microsatelliti più discriminanti. Infine è stato fatto un confronto tra gli alleli riscontrati nelle cultivar prese in esame e quelli presenti nelle passate che si trovano in commercio.

Materiali e Metodi

I campioni utilizzati

Campioni fogliari

I campioni fogliari utilizzati per la genotipizzazione delle diverse cultivar di pomodoro analizzate sono stati forniti, sotto forma di pianta, dall'Azienda Agraria Sperimentale Stuard di Parma. Le cultivar analizzate sono: Ciliegia, Costoluto, Cuore di bue, Donald, Doppio, Grappolo, Guadalete, Heinz 9478, Jet, Leader, Magnum 955, Merinda, Perfectpeel, Podium, Progress, Ruphus, Stay Green, Tondo corto, UG812J, Uno Rosso.

Dopo aver messo a dimora le piantine, un paio di foglie per cultivar sono state campionate e conservate a -80°C . Prima di effettuare l'estrazione di DNA le foglie sono state macinate e ridotte in polvere con mortaio, pestello e l'aiuto dell'azoto liquido.

Campioni commerciali

Tutte le matrici commerciali analizzate sono stati preparati per l'estrazione mediante omogeneizzazione con Knifetec-1095 (FOSSTECATOR AB, Hoganas, Sweden). Le estrazioni di DNA sono state effettuate partendo da 200 mg di materiale omogeneizzato. Ogni estrazione è stata condotta in triplo.

Estrazione del DNA genomico da foglie

Le estrazioni di DNA sono state effettuate utilizzando il kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA). Tutte le estrazioni sono state portate avanti a partire da 100 mg di prodotto macinato seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

Estrazione del DNA genomico da pomodori e derivati

Le estrazioni sono state portate avanti come già descritto in precedenza nella sezione materiali e metodi, wizard kit del capitolo "Messa a punto di un metodo di estrazione applicabile ai diversi prodotti della filiera di trasformazione del pomodoro" (Pag. 68).

Quantificazione del DNA estratto

La quantificazione dei DNA estratti da prodotti commerciali non è stata effettuata a causa della bassa resa delle estrazioni, mentre quella del DNA estratto da foglia è stato effettuato mediante spettrofotometria. La quantificazione di tale DNA è stata condotta con lo spettrofotometro BIOPHOTOMETER (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Primer utilizzati per l'analisi SSR

I primer utilizzati per le analisi dei microsatelliti sono stati individuati in alcuni articoli citati nella tabella sottostante (Tabella 6) e dal database "Solanum Genomics Network" (<http://solgenomics.net/>).

SSR	Ripet.	Tm (°C)	Primer	Bibliografia
LEtat002	(tat) ₁₂	60	Fw- ACG CTT GGC TGC CTC GGA	He et al. 2003
			Rw- AAC TTT ATT ATT GCC ACG TAG TCA TGA	
LEat002	(at) ₉	59	Fw- ACT GCA TTT CAG GTA CAT ACT CTC	He et al. 2003
			Rw- ATA AAC TCG TAG ACC ATA CCC TC	
LEaat002	(aat) ₁₂	63	Fw- GCG AAG AAG ATG AGT CTA GAG CAT AG	He et al. 2003
			Rw- CTC TCT CCC ATG AGT TCT CCT CTT C	
LEga003	(ga) ₂₀	59	Fw- TTC GGT TTA TTC TGC CAA CC	He et al. 2003
			Rw- GCC TGT AGG ATT TTC GCC TA	
LEaat007	(aat) ₁₂	59	Fw- CAA CAG CAT AGT GGA GGA GG	He et al. 2003
			Rw- TAC ATT TCT CTC TCT CCC ATG AG	
LEta20	(ta) ₂₁	57	Fw- AAC GGT GGA AAC TAT TGA AAG G	He et al. 2003
			Rw- CAC CAC CAA ACC CAT CGT C	
SSR248	(ta) ₂₁	57	Fw- GCA TTC GCT GTA GCT CGT TT	Solanum Genomics Network
			Rw- GGG AGC TTC ATC ATA GTA AGC	
SSR47	(at) ₁₉	56	Fw- TCC TCA AGA AAT GAA GCT CTG A	Solanum Genomics Network
			Rw- CCT TGG AGA TAA CAA CCA CAA	
SS603	(gaa) ₈	58	Fw- GAA GGG ACA ATT CAC AGA GTT TG	Solanum Genomics Network
			Rw- CCT TCA ACT TCA CCA CCA CC	
TOM236	(at) ₁₆	56	Fw- GTT TTT TCA ACA TCA AAG AGC T	Solanum Genomics Network
			Rw- GGA TAG GTT TCG TTA GTG AAC T	
SSR70	(at) ₁₃	59	Fw- TTT AGG GTG TCT GTG GGT CC	Solanum Genomics Network
			Rw- GGA GTG CGC AGA GGA TAG AG	
SSR210	(at) ₂₀	56	Fw- CGT TGG ATT ACT GAG AGG TTT A	Solanum Genomics Network
			Rw- ACA AAA ATT CAC CCA CAT CG	

Tabella 6- elenco dei primer utilizzati per la genotipizzazione delle cultivar prese in esame; nella colonna 1 sono indicati i nomi degli SSR amplificati dai primer, nella colonna 2 sono indicati il motivo e il numero medio di ripetizioni per ogni SSR, in cololla 3 sono riportate le temperature utilizzate per l'amplificazione con ogni coppia di primer, nella colonna 4 sono riportate le sequenze dei primer e nella colonna 5 sono indicati i riferimenti bibliografici di tutte le coppie di primer.

Tutti i primer forward utilizzati per l'analisi sono stati marcati al 5' con il fluoroforo IRD700 per la rilevazione fluorimetrica tramite elettroforesi capillare dei frammenti amplificati.

Amplificazione del DNA estratto

Le reazioni di PCR sono state condotte in tubi da 0,2 ml in un volume totale di 25 μ l. In ogni reazione di amplificazione sono stati utilizzati circa 100 ng di DNA estratto e un buffer di PCR 1X composto da: 50 mM Tris-HCl; 10 mM KCl; 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 8,3; 2,5 mM MgCl_2 ; 0,2 mM di ogni dNTP (partendo da una soluzione 10 mM); 0,2 μ M di primer forward e reverse; 0,1 μ g/ μ l BSA (Roche Applied Science; Indianapolis, USA); 1U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science; Indianapolis, USA).

Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore Veriti 96 well (Applied Biosystem; Foster City, USA) seguendo il seguente profilo termico riportato in figura 7: la temperatura di annealing a cui viene fatta avvenire la reazione è caratteristica per ogni coppia di primer ed elencata nella tabella 7.

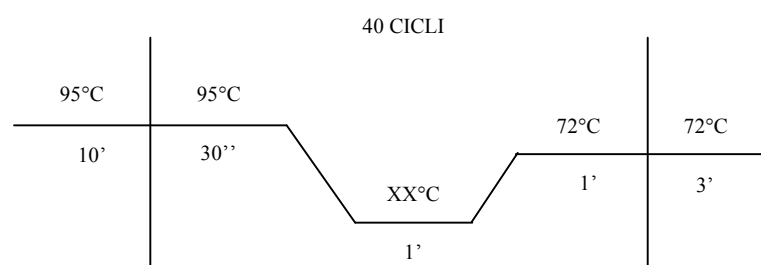


Figura 7- Profilo termico utilizzato per le reazioni di PCR con i primer per gli SSR

Per verificare l'avvenuta reazione di PCR un'aliquota di amplificato viene sottoposta ad elettroforesi su gel di agarosio al 3%. 100 ml di tampone TAE 1X (tris-acetato EDTA: 40 mM Tris-Acetato; 1 mM EDTA) contenenti 3 g di agarosio (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA) vengono posti a bollire e dopo aver raffreddato la soluzione fino a 50°C viene aggiunto l'intercalante al DNA "Gel Red" fino ad una concentrazione di 0,1 X.

Dopo la migrazione, il DNA viene visualizzato esponendo il gel di agarosio ai raggi UV. Per determinare il peso molecolare dei frammenti amplificati vengono fatti migrare, in parallelo,

campioni contenenti frammenti di DNA di peso molecolare noto: il “ladder 50pb” e “ladder 100pb” (Fermentas Inc.; Maryland, USA). I gel vengono visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA) e convertiti in immagini digitali.

Analisi dei marcatori molecolari

Le reazioni di amplificazioni avvenute con successo vengono sottoposte ad elettroforesi capillare per consentire la separazione degli ampliconi. L'elettroforesi capillare è stata eseguita mediante sequenziatore CEQ™ 2000 XL (Beckman-Coulter, USA). Ogni campione è stato preparato utilizzando 0.2 µl di CEQ™ DNA Size Standard 400 (Beckman-Coulter, USA), 0.5 µl di reazione di PCR in un volume finale di 30 µl di formammide. Le elettroforesi capillari sono state realizzate nelle seguenti condizioni: temperatura del capillare 50°C, denaturazione a 90°C per 120 secondi, iniezione a 2 kV per 30 secondi, separazione a 6 kV per 50 minuti.

Costruzione di un albero filogenetico

L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il programma winboot (www.winboot.net), tale programma utilizza il metodo di ricostruzione filogenetica UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Valutazione del pannello di microsatelliti in analisi

Per determinare l'efficienza del pannello di SSR in esame per discriminare le diverse cultivar di pomodoro prese in considerazione è stato calcolato il valore di “Probability of identity” (P_{α}) per ogni locus considerato e il valore di “total probability of identity” ($P_{(ID)}$) per tutto il pannello considerato (Waits et al. 2001). Il valore di $P_{(ID)}$ indica la probabilità che due individui presi a caso all'interno della popolazione abbiano lo stesso genotipo. Secondo Waits et al. 2001 un valore accettabile di $P_{(ID)}$, che consente di effettuare una discriminazione tra due individui all'interno della popolazione presa in esame con una $p < 0,05$, deve essere compreso tra 0,01 e 0,0001.

Per il calcolo della probability of identity è stata utilizzata la seguente formula:

$$P_{\alpha} = \sum_i (p_i)^4 + \sum_i \sum_j (2p_i p_j)^2 \quad p, i, j \in \mathfrak{N}$$

Equazione 2- Calcolo della probabilità di identità di un singolo locus

Dove p_i e p_j sono i diversi alleli trovati amplificando con la coppia di primer specifica per il microsatellite α . Per il calcolo della total probability of identity viene utilizzata la seguente formula:

$$P_{(ID)} = \prod_{\alpha} P_{\alpha} \quad \alpha \in N$$

Equazione 3- Calcolo della probabilità di identità per tutti i loci presi in considerazione

Dove α corrisponde al numero di SSR presenti nel pool. Il calcolo è stato effettuato tramite il programma Excel.

Risultati e discussioni

Genotipizzazione delle varietà analizzate

I marcatori molecolari utilizzati sono stati scelti tra quelli riportati in letteratura in funzione del loro potere discriminante indicato in bibliografia. La genotipizzazione delle cultivar di pomodoro prese in considerazione è stata condotta allestendo tre repliche di PCR sul DNA estratto dalle foglie, per ogni reazione è stato effettuato, in parallelo, un controllo negativo di PCR.

Nella tabella 7 vengono riportate le dimensioni degli alleli per i vari loci microsatelliti identificati all'interno della popolazione di cultivar di pomodoro analizzate. Dalla tabella è evidente la bassa variabilità genetica tra le cultivar prese in considerazione, per la maggior parte dei loci presi in considerazione sono stati riscontrati solo tre alleli, due dei quali si ripetono con una maggiore frequenza rispetto al terzo. Anche i loci più polimorfici, con 5 o 6 alleli, presentano un livello di variabilità limitato. Tale dato sembra in contrapposizione rispetto a quanto riportato in letteratura (Solanum Genomics Network e He et al. 2003), dove il livello di polimorfismo per i loci presi in contrapposizione era risultato molto elevato, ma le analisi effettuate in questi lavori prendevano in considerazione varietà di pomodoro ancestrali, quindi non geneticamente correlate tra loro. In questo lavoro, invece, sono state prese in considerazione varietà disponibili in commercio che sono ibridi ottenuti dall'incrocio e selezione con parentali comuni, quindi, durante questi processi di selezione, la variabilità genetica tra individui viene persa.

La genotipizzazione delle cultivar di pomodoro di riferimento consente di avere dei riferimenti stabili per le analisi di "fingerprinting" molecolare che verranno effettuate in futuro sui prodotti commerciali. Con i microsatelliti analizzati è stato possibile costruire matrici di distanze dalle quali è stato possibile ottenere un albero filogenetico UPGMA.

Dall'albero filogenetico riportato figura 8 è possibile discriminare due gruppi: uno formato dalle cultivar destinate al consumo fresco e l'altro costituito dalle cultivar destinate alla trasformazione industriale. Come si può osservare, due cultivar solitamente destinate al consumo fresco, Grappolo e Tondo Corto, sono state raggruppate assieme alle cultivar da industria. Questo fatto è dovuto, probabilmente, alla somiglianza genetica di queste due varietà con le varietà da industria, conseguenza del fatto che possono essere stati utilizzati

parentali comuni per la costruzione degli ibridi commerciali utilizzati per questa analisi. Il problema dell'errato raggruppamento può essere risolto raffinando l'analisi genetica, ovvero aumentando il numero di microsatelliti utilizzati per l'analisi o ricercando microsatelliti che presentino pattern allelici caratteristici.

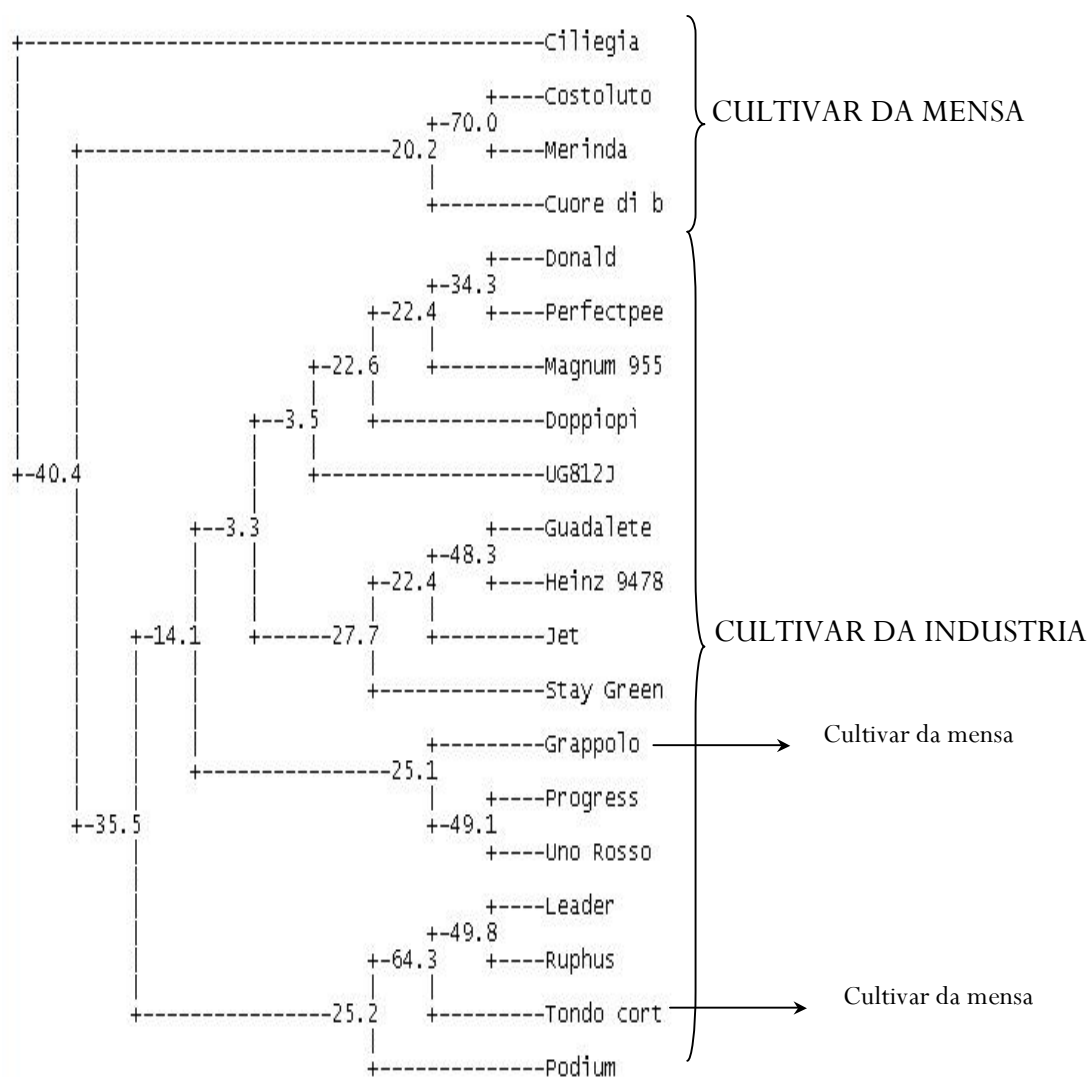


Figura 8- Albero filogenetico ottenuto mediante la tecnica UPGMA con il programma WinBoot

	LEtat002		LEat002		LEaat002		LEga003		LEaat007		LEfat20		SSR248		SSR47		SSR603		TOM236		SSR70		TOM210		
Ciliegia	198	198	201	201	98	101	231	233	93	96	196	198	241	243	191	191	250	250	187	189	115	115	218	218	
Costoluto	198	198	201	201	101	101	235	235	96	96	194	196	245	249	189	189	250	250	187	189	121	121	222	222	
Cuore di bue	201	201	201	201	101	104	235	235	96	99	196	196	241	249	189	189	250	250	183	185	119	119	222	222	
Donald	195	198	201	205	101	104	231	235	96	99	196	198	241	245	189	189	250	250	173	175	119	119	218	222	
Doppiopi	195	198	201	205	101	104	235	235	96	99	196	198	247	249	189	189	250	250	173	175	119	119	220	220	
Grappolo	198	198	201	205	101	101	233	235	99	99	198	198	241	243	189	189	252	254	173	175	119	121	218	218	
Guadalete	-	-	-	-	98	104	231	235	99	99	198	198	-	-	189	189	250	250	173	175	119	119	218	218	
Heinz 9478	195	201	201	201	98	101	231	235	99	99	198	198	249	249	189	189	252	252	173	175	119	119	218	222	
Jet	195	201	201	201	101	104	231	235	99	99	196	198	245	249	189	189	252	252	173	175	119	119	218	220	
Leader	195	195	201	205	98	101	235	235	93	96	196	198	245	249	189	199	250	250	173	175	119	119	220	220	
Magnum 955	195	198	201	201	101	104	231	235	96	99	196	196	245	245	189	189	250	250	173	175	119	119	220	220	
Merinda	198	198	201	201	101	101	231	235	96	96	196	198	245	245	189	189	252	252	187	189	119	119	222	222	
Perfectpeel	195	198	201	205	101	104	235	235	96	99	196	198	245	245	189	189	250	250	173	175	119	119	218	220	
Podium	195	198	201	201	101	101	235	235	96	96	196	200	249	249	189	189	248	250	173	175	119	119	220	222	
Progress	195	198	201	205	101	104	231	233	96	99	196	198	241	241	189	201	252	252	173	175	119	119	220	220	
Ruphus	195	198	205	205	98	101	235	235	93	96	196	198	245	249	189	189	250	250	173	175	119	119	218	218	
Stay Green	198	198	201	201	104	104	231	235	99	99	198	198	249	249	189	189	250	250	173	175	119	119	220	220	
Tondo corto	195	198	201	205	98	101	235	235	93	96	196	198	245	245	189	189	250	250	173	175	119	119	222	222	
UG812J	195	198	203	205	104	104	231	235	96	99	198	198	245	245	189	189	254	254	173	175	119	119	220	222	
Uno Rosso	195	195	201	205	101	104	231	235	96	99	-	-	241	241	189	189	252	254	173	175	119	119	220	220	

Tabella 7 - dimensioni alleliche per ogni SSR analizzato per ogni cultivar presa in esame. I numeri si riferiscono alle taglie degli alleli espressi in paia di basi.

Applicazione della tecnica degli SSR

L'utilizzo delle tecniche basate sui microsattelliti nell'ambito della rintracciabilità varietale all'interno dei prodotti alimentari consente di aumentare la sensibilità delle analisi già effettuate. La sensibilità di queste metodologie è legata soprattutto alle caratteristiche intrinseche dei marcatori molecolari presi in considerazione: diffusione all'interno del genoma, livello di polimorfismo elevato e semplicità di indagine.

Per quel che riguarda i prodotti a base di pomodoro, il riconoscimento varietale, assume un ruolo considerevole per i prodotti ad elevato valore aggiunto come quelli a marchio DOP e IGP.

SSR	Alleli riscontrati nelle foglie di pomodoro	Alleli riscontrati nei prodotti commerciali	Considerazioni
LEaat007	93-96-99	96-99	Probabile drop-out dell'allele 93
LEat002	201-205	201-205	Nessuna differenza
SSR70	115-119	96-99-119	Probabile drop-out dell'allele 115 e presenza di varietà diverse nei prodotti commerciali rispetto a quelle in esame
TOM236	175-187	175-179-190	Probabile drop-out dell'allele 187 e presenza di varietà diverse nei prodotti commerciali rispetto a quelle in esame
LEtat002	195-198	195-198-201	Probabile presenza di varietà diverse nei prodotti commerciali rispetto a quelle in esame
LEga003	235	235	Nessuna differenza
LEcaa001	103	103	Nessuna differenza
LEaat002	101-104	101-104	Nessuna differenza

Tabella 8- dimensioni alleliche (esprese in paia di basi) riscontrati nei prodotti freschi e nei prodotti commerciali.

Per verificare l'applicabilità dell'analisi basata sugli SSR ai prodotti industriali a base di pomodoro abbiamo amplificato con alcune coppie di primer indicate nella tabella 6 il DNA estratto dai prodotti commerciali elencati nella sezione materiali e metodi di questo capitolo. Nella tabella 8 sono indicati gli alleli che sono stati riscontrati nel DNA estratto da foglie di pomodoro a nostra disposizione e gli alleli che sono stati rilevati nel DNA estratto dalle

matrici commerciali. In grassetto sono stati evidenziati gli alleli riscontrati sia nel DNA estratto dalle foglie sia nel DNA estratto dalle matrici commerciali. Si osservano alcune differenze nel tipo e nel numero di alleli delle due classi di matrici analizzate, questo è dovuto al fatto che, nelle nostre analisi, non sono state prese in considerazione tutte le cultivar di pomodoro presenti sul mercato e che noi non conosciamo esattamente la composizione, a livello varietale, dei prodotti commerciali. Il ritrovamento, nei prodotti commerciali, di alleli diversi rispetto a quelli delle cultivar analizzate dipende dal fatto che per la produzione delle passate prese in considerazione probabilmente sono state utilizzate cultivar che, in questo lavoro, non sono state caratterizzate per mancanza di materiale vegetale.

La corrispondenza tra gli alleli individuati nel DNA estratto da foglie e in quello estratto da matrici commerciali fornisce un'indicazione dell'effettiva possibilità di utilizzare la tecnica di analisi dei microsatelliti per rintracciare le cultivar utilizzate durante la trasformazione industriale.

Per il calcolo dell'efficienza del pannello di loci microsatelliti presi in esame è stata utilizzata la strategia proposta da Waits et al. 2001, che prevede il calcolo di un indice per i singoli loci e per tutto l'insieme di SSR presi in considerazione ($P_{(ID)}$). Il valore di $P_{(ID)}$ calcolato, per tutto il pannello di microsatelliti in esame, corrisponde a $2,2 \times 10^{-5}$, tale valore risulta inferiore al limite indicato in precedenza nella sezione materiali e metodi (compreso tra 0,01 e 0,0001 per una probabilità $p < 0,05$), quindi il pannello individuato sembra avere un buon potere discriminante all'interno delle cultivar analizzate. Nonostante il numero di SSR preso in considerazione sia relativamente elevato (12), il valore di $P_{(ID)}$ è più alto rispetto alle attese. Questo perché le varietà di pomodoro utilizzate per la produzione, e quindi che noi abbiamo analizzato, sono ibridi commerciali con parentali comuni oppure molto affini tra di loro. Per questo motivo, la variabilità genetica delle cultivar analizzate è bassa, questo comporta la presenza di pochi alleli nei loci analizzati. Infatti, su 12 SSR presi in considerazione, ben 7 presentano solo 3 alleli; 3 presentano 4 alleli, 1 presenta 5 alleli e 1 presenta 6 alleli.

Per calcolare il numero minimo di SSR necessari per effettuare una discriminazione varietale all'interno della popolazione in esame con un valore di $p < 0,05$ è stato sempre utilizzato il valore di $P_{(ID)}$. Per ottenere un valore compreso tra 0,01 e 0,0001 utilizzando i loci analizzati sono necessari, come minimo, 4 loci tra quelli presi in esame. In particolare il valore di $P_{(ID)}$ più basso (8×10^{-3}) delle combinazioni di 4 loci tra quelli presi in considerazione si ottiene utilizzando contemporaneamente le seguenti coppie di primer: TOM236, SSR248, LEaat002

e L'etat002. L'ideale per questo tipo di analisi sarebbe utilizzare marcatori con un elevato numero di alleli oppure con descrittori allelici caratteristici delle singole varietà; in questo modo il numero di loci da prendere in considerazione si ridurrebbe drasticamente fino a 2, e in alcuni casi basterebbe addirittura un unico locus; ma data l'elevata omogeneità genetica degli ibridi di pomodoro commerciali questo non è possibile.

Nel nostro caso l'elevata uniformità genetica degli individui presi in considerazione costringe l'utilizzo di un minimo di 4 loci SSR per ottenere una probabile identità, piuttosto che la certezza, della varietà analizzata.

Prospettive future

Con il pannello di microsatelliti identificato diventa quindi possibile l'identificazione varietale dei prodotti processati. Per dimostrare questo, sono state preparate tre passate di pomodoro monovarietale e una passata di pomodoro contenente tutte e tre le varietà. Con questi prodotti è possibile verificare se il metodo messo a punto consente di individuare in modo corretto le varietà utilizzate durante la produzione oppure se è necessario aumentare la sensibilità del metodo incrementando il numero di microsatelliti.

Una volta ottimizzato il metodo di riconoscimento varietale e genotipizzate le cultivar di interesse commerciale diventerà possibile applicare tale metodica per la tracciabilità molecolare di alimenti a base di pomodoro, strumento che può essere utilizzato efficacemente per la tutela del consumatore.

ANALISI DELL'EFFETTO DELLA PRESENZA
DI ARSENICO NEL TERRENO SULLA
CRESCITA DELLE PIANTE DI POMODORO

Introduzione

L'arsenico

L'Arsenico è un metalloide appartenente al V gruppo della tavola periodica degli elementi. Ha numero atomico 33 e massa atomica di 74,9216, il numero di massa atomica dei suoi isotopi varia tra 68 e 80 ma solo l'isotopo 75 è stabile. La sua configurazione elettronica è $[As]4s^23d^{10}4p^3$ e per ogni "shell" ha rispettivamente 2, 8, 18 e 5 elettroni nello stato di ossidazione 0. L'Arsenico può presentare vari stati di ossidazione (-3, 0, +3, +5) e in natura si trova sia in forme organiche sia in forme inorganiche.

Allo stato elementare, l'arsenico, è un solido che si presenta in tre forme allotropiche: gialla (alfa), nera (beta) e grigia (gamma). La forma più stabile a temperatura ambiente è quella grigia romboedrica. La sua temperatura di sublimazione è 630°C e ha una tensione di vapore di 1 mm Hg a 372°C . A caldo reagisce facilmente con cloro e fluoro e con molti metalli e non metalli. La sua densità nella forma solida è $5,727\text{g}/\text{cm}^3$.

Fattori che determinano la presenza di arsenico nell'ambiente

L'arsenico entra nell'ambiente terrestre ed acquatico a causa della concomitante azione di fattori naturali ed antropici. I problemi ambientali legati alla presenza di questo contaminante sono dovuti alla sua naturale mobilitazione. La presenza di arsenico nell'ambiente per cause naturali è da imputare principalmente ai processi di pedogenesi, all'attività biologica e vulcanica. Per quel che riguarda le attività antropiche, l'accumulo di arsenico nell'ambiente, è dovuto soprattutto alle attività mineraria e di fusione di metalli, alla combustione di rifiuti, alla produzione di energia con combustibili fossili, quali carbone o petrolio, all'applicazione di insetticidi, erbicidi e fungicidi a base di arsenico, di fertilizzanti e di prodotti per la protezione del legno (Adriano, 2001). Sebbene, negli ultimi decenni, molti prodotti a base d'arsenico come pesticidi ed erbicidi siano stati banditi, alcuni di questi vengono ancora oggi impiegati. L'impatto sull'ambiente derivante dal largo uso fatto, soprattutto in passato, di tali composti perdurerà negli anni (Smadley e Kinniburgh, 2002).

Fattori naturali che influenzano la presenza di Arsenico nell'ambiente

L'arsenico è un elemento in traccia estremamente tossico ed ubiquitario, presente

mediamente in ogni comparto ambientale e negli organismi viventi (Cullen e Reimer, 1989). L'arsenico è presente come costituente principale in più di 200 minerali, dei quali approssimativamente il 60% sono arseniati, il 20% solfati e il restante 20% arseniti, ossidi, silicati ed arsenico elementare (As) (Smadley e Kinninburgh, 2002). Le concentrazioni più elevate dei minerali dell'arsenico si ritrovano associate a metalli di transizione come Cd, Pb, Ag, Au, Sb, P, W e Mo. Il più abbondante minerale puro dell'arsenico è l'arsenopirite (FeAsS), seguito da altri due minerali arsenosolfati quali il realgar (As₄S₄) e l'orpimento (As₂S₃).

All'interno dei diversi tipi di rocce l'arsenico si ritrova in diverse concentrazioni: nelle rocce ignee le sue concentrazioni sono generalmente basse (1,5-5 mg/kg), nelle rocce metamorfiche la sua concentrazione tende a riflettere la concentrazione delle rocce ignee e sedimentarie dalle quali derivano, nelle rocce sedimentarie la concentrazione è più alta, generalmente compresa tra 5 e 10 mg/kg (Webster, 1999), nelle sabbie e nelle arenacce la concentrazione è bassa (4 mg/kg), le argille solidificate tendono ad avere la concentrazione maggiore di arsenico (13 mg/kg).

Per quanto riguarda i sedimenti non consolidati, fanghi e argille solitamente hanno un contenuto di arsenico variabile tra 3-10 mg/kg, in funzione della loro tessitura e mineralogia. Elevate concentrazioni riflettono una forte presenza di pirite e ossidi di Fe. Un incremento di arsenico nei sedimenti si osserva in aree minerarie.

Fattori antropici che influenzano la presenza di Arsenico nell'ambiente

Attività industriali

Il triossido di arsenico (orpimento As₂O₃) è la forma più comune con cui numerose industrie liberano arsenico nell'ambiente. In particolare, le industrie che rilasciano le maggiori quantità di arsenico sono: le industrie di ceramiche, le industrie produttrici di componenti elettronici (semiconduttori, circuiti integrati e laser), le industrie di cosmetici, le industrie tessili, i colorifici, le vetrerie, le concerie e le industrie per la lavorazione del legno. L'arsenico e i suoi derivati trovano diversi impieghi nelle lavorazioni odierne: unito al piombo viene utilizzato per la preparazione di pallini da caccia; allo stato di estrema purezza trova applicazione in elettronica per le sue proprietà semiconduttrici (As-Ga arsenico e gallio); viene utilizzato anche come componente di leghe metalliche nelle quali, introdotto in piccole quantità, ha la proprietà di conferire durezza (acciaio e piombo), resistenza termica

ed evitare la perdita di zinco nell'ottone usato per le tubature dell'acqua potabile.

Attività minerarie

L'arsenico è un componente naturale dei minerali che contengono Pb, Zn, Cu e Au e, conseguentemente, durante i processi minerari di estrazione e fusione sono frequenti i fenomeni di contaminazione di suoli, sedimenti, corsi d'acqua (fiumi e laghi), acque di falda e atmosfera.

Li and Thornton (1993), studiando la contaminazione da arsenico nel suolo di alcune aree minerarie dell'Inghilterra (Derbyshire, Cornwall, Somerset), hanno riscontrato nei primi 15 cm di suolo concentrazioni di arsenico molto elevate (16-925 mg/kg di suolo). Questi autori hanno inoltre dimostrato che durante i processi di fusione dei minerali contenenti Cu, Pb, Zn e Au avviene un ingente rilascio di arsenico nell'atmosfera.

Processi di combustione del carbone

Le concentrazioni di arsenico presenti nel carbone sono piuttosto variabili (2-82 mg/kg) in funzione dell'origine geologica (Adriano et al., 1980). Sebbene concentrazioni di 2.5-17 mg/kg siano state riportate da Palmer e Klizas (1997), alcuni campioni di carbone hanno mostrato quantità del metalloide molto elevate, addirittura pari a 35.000 mg/kg (Belkin et al., 2000). La combustione del carbone, oltre a determinare il rilascio di arsenico nell'atmosfera, determina la produzione di ingenti quantità di ceneri leggere (fly ash) e pesanti (bottom ash) contenenti arsenico, il che ne riduce drasticamente le possibilità di impiego (Beretka and Nelson, 1994). È stato osservato che il contenuto di arsenico presente nelle ceneri è inversamente proporzionale alla dimensione delle particelle di cenere: le particelle di cenere più piccole sono dunque quelle più pericolose, anche perché possono essere trasportate ad una lunga distanza dal luogo di produzione e successivamente ricadere (fall-out) contaminando il suolo e le acque superficiali, nonché le zone abitate.

Attività agricola

In agricoltura l'uso indiscriminato di prodotti a base di arsenico (fino agli anni 50-60) ha determinato in vaste zone agricole, e in particolare in quelle ad intensa vocazione florovivaistica, un elevato accumulo di questo elemento. Negli ultimi anni, nei paesi maggiormente sviluppati, gran parte dei pesticidi e dei diserbanti contenenti arsenico sono

stati banditi dall'agricoltura. Tuttavia in molti paesi in via di sviluppo tali prodotti vengono tutt'oggi ampiamente utilizzati arrecando gravissimi danni al sistema suolo-acqua-pianta, e di conseguenza agli animali superiori.

In passato sono stati adoperati in agricoltura numerosi pesticidi (insetticidi e anticrittogamici) a base di arsenico: arseniato di piombo (PbAsO_4), arseniato di calcio (CaAsO_4), arseniato di magnesio (MgAsO_4), arseniato (ZnAsO_4) e arsenito (ZnAsO_3) di zinco e altri, i quali sono stati per lunghi anni utilizzati in pieno campo e soprattutto sotto serra per la difesa di specie floricole ad alto reddito. Anche forme organiche come MMAA (monometilarsonico) e DMAA (dimetilarsinico) sono tuttora in uso.

Studi condotti da alcuni ricercatori australiani hanno evidenziato che in numerosi suoli del sud dell'Australia e della Tasmania, adibiti alla coltivazione delle orchidee, le concentrazioni di arsenico superano i 2500 mg/kg. Ure e Berrow (1982) hanno rilevato, in suoli coltivati a frutteto, concentrazioni del metalloide variabili tra 366 e 732 mg/kg a causa di continue applicazioni di pesticidi a base d'arsenico per il trattamento delle colture. Prove sperimentali sull'uso di pesticidi contenenti arsenico nella zootecnia australiana hanno inoltre evidenziato la capacità di quest'elemento di accumularsi nei tessuti animali e di mantenersi su livelli di concentrazione piuttosto elevati anche dopo la macellazione del bestiame, con conseguenze negative per la salute dell'uomo (Vaughan, 1993).

Un'altra causa di contaminazione è la presenza dell'arsenico come impurezza nei fertilizzanti commerciali. Ripetute fertilizzazioni comportano nel lungo periodo un accumulo di As nel suolo. In particolare, i concimi fosfatici possono contenere quantità talvolta elevate di arsenico sotto forma di impurezza. Charter et al. (1995) hanno osservato, studiando il contenuto di metalli pesanti presenti in concimi fosfatici di diversa natura, che l'arsenico è l'elemento maggiormente rappresentato, pur mostrando un contenuto estremamente variabile (fosfato monoammonico, 8.1-17.8 mg/kg; fosfato biammonico, 6.8 – 12.4 mg/kg).

Comportamento dell'arsenico nel suolo

La concentrazione di arsenico in suoli non contaminati può variare da 1 a 40 mg/kg, con più basse concentrazioni in suoli sabbiosi, o derivanti da granito, e più elevate in suoli alluvionali ed organici (Mandal e Suzuki, 2002); in ogni caso, generalmente, è inferiore a 10 mg/kg (Fitz e Wenzel, 2002).

Nel suolo l'arsenico è presente con una grande varietà di forme sia organiche sia inorganiche. Le principali forme inorganiche sono rappresentate dall'arseniato (V) e dall'arsenito (III) (Manning e Goldberg, 1997; Frenkenberg, 2002).

I composti organici dell'arsenico possono essere trasformati per biometilazione (aggiunta di CH_3 attraverso l'attività biologica) nel suolo, nell'acqua e all'interfaccia acqua-sedimenti, attraverso l'attività di alcuni batteri (*Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Methanobacterium sp.*) e funghi (*Aspergillus glaucus*, *Candida humicola*). Esistono infatti, alcune muffe in grado di metilare l'arsenico, ad esempio l'ascomicete *Scopulariopsis brevicaulis* rilascia grandi quantità di trimetilarsine volatili. La tossicità ed il comportamento chimico dei composti dell'arsenico sono largamente influenzati dalla specie presente. In generale, i composti inorganici sono più tossici dei composti organici e lo stato trivalente è più tossico dello stato pentavalente (Adriano, 2001).

Determinare la reattività e la mobilità dell'arsenico in suoli e sedimenti è complicato dalla presenza di reazioni di ossidoriduzione, precipitazione e dissoluzione, dall'attività biologica e dall'adsorbimento sulle superfici dei minerali e sulla sostanza organica (Manning e Goldberg, 1997). È noto che l'arsenico ha un'elevata affinità per le superfici degli ossidi, affinità influenzata da numerosi fattori biogeochimici quali, tessitura del suolo, sostanza organica, natura dei minerali, pH, potenziale redox e competizione tra ioni (Adriano, 2001). L'adsorbimento delle forme inorganiche dell'As sulle superfici dei minerali del suolo è un processo estremamente importante poiché influenza la mobilità dell'elemento stesso (Zhang e Sparks, 1989) e rappresenta quindi uno dei fenomeni fondamentali per la comprensione dei meccanismi di biodisponibilità del metalloide nel sistema suolo-acqua-pianta (Sun e Doner, 1996; Raven et al., 1998)

La mobilità dell'As adsorbito è sostanzialmente differente nei suoli in base alla durata del periodo in cui essi hanno ricevuto As in seguito ad attività antropiche (Wenzel et al., 2002). È stato dimostrato che l'As diventa rapidamente recalcitrante nel suolo (Lombi et al., 1999), riducendo la sua tossicità. Infatti, il metalloide adsorbito sui minerali del suolo forma, nel tempo, complessi di superficie sempre più stabili, può lentamente penetrare nei micropori o formare dei precipitati con Fe ed Al diventando sempre meno desorbibile, biodisponibile e tossico (Frenkenberg, 2002; Sparks, 2003; Pigna et al., 2006).

Il comportamento dell'arsenico nell'uomo

L'arsenico è un elemento che può accumularsi nei tessuti di tutti gli organismi viventi, compresi gli animali. La concentrazione nei tessuti varia in funzione della quantità ingerita. In alcuni organismi marini come celenterati, molluschi e crostacei (Bowen, 1966), l'arsenico si accumula a livelli variabili tra 0,005 e 0,3 mg/kg, soprattutto sotto forma di composti organici resistenti alla degradazione chimica

Il corpo umano contiene di base 3-4 mg di arsenico e la quantità tende ad aumentare con l'età. L'arsenico inorganico tende ad accumularsi specialmente nei capelli ed altri tessuti ricchi di cheratina. In generale i composti organici sono più rapidamente espulsi rispetto alle forme inorganiche e tra queste la forma pentavalente (As(V)) più velocemente della trivalente (As(III)).

L'uomo entra spesso a contatto con diverse specie di arsenico a causa della sua presenza in acque, suoli, animali e vegetali. Le varie specie dell'arsenico differiscono tra loro per proprietà fisico-chimiche e biodisponibilità, questo complica lo studio della cinetica e della dinamica del metabolismo dell'inquinante nell'uomo e negli animali. La distribuzione dell'elemento tossico nei tessuti dipende dalla diffusione operata dal sangue, dal volume dei tessuti stessi, dalle caratteristiche di membrana e dall'affinità per il tessuto. Il destino dell'arsenico ingerito dipende da reazioni di ossidoriduzione tra As(III) e As(V) nel plasma e reazioni consecutive di metilazione nel fegato. L'arseniato è rapidamente ridotto ad arseniato e successivamente in parte metilato. Il principale sito di metilazione sembra essere il fegato, dove l'enzima arsenico metiltransferasi catalizza il processo di metilazione con l'S-adenosilmetionina quale donatore di gruppi metile. La velocità di assorbimento dell'arsenico è proporzionale alla sua solubilità.

La forma chimica e lo stato di ossidazione sono molto importanti nel determinare la tossicità per l'uomo. Sebbene sia generalmente accettato che la metilazione rappresenti la principale via di detossificazione, recenti studi hanno dimostrato che metaboliti metilati possono essere in parte responsabili di effetti dannosi associati all'esposizione all'arsenico.

Il meccanismo tossico più comune di un elemento è l'inattivazione di sistemi enzimatici essenziali per catalizzare reazioni biologiche. L'As(V) non si lega direttamente ai siti attivi degli enzimi ma prima si riduce ad As(III). L'As(III) interferisce con molti enzimi formando legami con i loro gruppi -SH ed -OH, specialmente quando ci sono due gruppi -SH adiacenti. È stato ipotizzato che il legame dell'As(III) nelle cellule con gruppi sulfidrilici non

essenziali potrebbe rappresentare un'importante via di detossificazione. Il forte legame tra As(III) e solfuri può essere la causa per cui l'elemento si accumula nei tessuti di cheratina come capelli ed unghie.

Anche gli enzimi, che attraverso il ciclo dell'acido citrico, producono energia cellulare vengono inibiti dalla presenza dell'arsenico. L'azione inibitrice è basata sull'inattivazione della piruvato-deidrogenasi attraverso la complessazione con As(III), a causa della quale la formazione di ATP viene inibita. La quantità di piruvato nel sangue aumenta, la produzione di energia si riduce ed infine la cellula si danneggia lentamente.

Sebbene l'As(III) sia ritenuta la forma più tossica, l'As(V) può avere effetti molto dannosi essendo un forte competitore del fosfato. Per esempio l'arseniato disaccoppia la fosforilazione ossidativa, il processo attraverso cui l'ATP viene prodotta e contemporaneamente la nicotinamide adenina dinucleotide (NADPH) viene ossidata (Dixon, 1997). L'arseniato distrugge questo processo producendo un estere arseniato dell'ADP, il quale è instabile e subisce un'idrolisi non enzimatica: l'arsenolisi (Aphosian, 1989). Per questo motivo, l'energia metabolica si riduce e viene prodotto glucosio-6-arseniato anziché glucosio-6-fosfato. L'arseniato può anche rimpiazzare il fosforo nel DNA e questo sembra inibirne i meccanismi di replicazione. (Mandal e Suzuki, 2002)

Il comportamento dell'arsenico nelle piante

La presenza di arsenico in suoli e corsi d'acqua fa sì che l'elemento tossico si trovi nei tessuti di diverse specie vegetali. È ormai generalmente accettato che il trasferimento di arsenico dal suolo alla pianta rappresenta una delle principali vie di esposizione dell'uomo al metalloide.

L'assorbimento del metalloide è basso per molte specie, questo probabilmente perché vi è: i) limitato assorbimento delle radici; ii) limitata traslocazione di arsenico dalle radici ai germogli; iii) fitotossicità nei tessuti già a basse concentrazioni; iv) bassa biodisponibilità di arsenico nel suolo (Wang et al., 2002).

La concentrazione di arsenico in piante cresciute in suoli non contaminati varia tra 0,009 e 1,5 ppm, con un più alto range nelle foglie, e più basso range nei frutti. In generale i contenuti maggiori del metalloide si riscontrano nelle radici, seguite dai fusti e infine dalle foglie (Kabata-Pendias e Pendias, 2001).

Sono note numerose specie di piante che tollerano elevati livelli di arsenico nei loro tessuti.

Le piante che sopravvivono nei suoli inquinati da metalli pesanti sono generalmente tolleranti alla presenza dei contaminanti. Tali organismi possono essere divisi in tre gruppi: i) escludenti, cioè che mantengono la concentrazione dei metalli nei germogli ad un livello basso qualunque sia la concentrazione del metallo nel suolo (Baker, 1981); ii) iperaccumulatrici, dove i metalli sono concentrati nella biomassa epigea della pianta sia a basse che ad elevate concentrazioni del metallo nel suolo (Baker, 1981); iii) indicatrici, dove la concentrazione interna del metallo riflette quella esterna del suolo (McGrath et al., 2002).

Fino ad ora sono state identificate poche specie iperaccumulatrici di arsenico, tra queste si ritrova la felce *Pteris vittata alderw*, altre felci e delle monocotiledoni come *Sedum alfredii Hance*.

In generale, fenomeni di tossicità sono stati comunemente riscontrati in piante cresciute su scarti di miniera, su suoli trattati con pesticidi a base di arsenico e su suoli con aggiunta di arsenico attraverso lo spargimento di liquami o acqua irrigua contaminata. La presenza di arsenico nelle acque irrigue o nel suolo a livelli elevati potrebbe ostacolare la normale crescita delle piante determinando sintomi di fitotossicità, come: riduzione dello sviluppo radicale e dei germogli, appassimento e necrosi delle foglie, riduzione della superficie fogliare e della fotosintesi, riduzione della produzione di frutti o granella.

La sensibilità ai metalli e la tossicità per le piante è influenzata non solo dalla concentrazione e dal tipo di inquinante, ma anche dalla fase fenologica o dallo stadio fisiologico ed epigenetico in cui la pianta si trova (germinazione, emergenza della plantula, crescita vegetativa).

È stato accertato che l'altezza dei germogli e la lunghezza delle radici, di piante di grano, si riduce significativamente all'aumentare della concentrazione di arsenico. La riduzione dello sviluppo delle radici può essere imputato al fatto che, essendo la radice il primo punto di contatto con l'inquinante nel mezzo di crescita, la pianta cerca di ridurre la superficie a contatto con il metalloide. È stato anche osservato che l'arsenito è più tossico dell'arseniato in termini di sviluppo radicale ed epigeo (Coddington, 1986).

Wallace et al. (1980) hanno mostrato che piante di fagiolo cresciute in una soluzione di arseniato $10^{-4}M$ hanno accumulato approssimativamente 4, 19 e 42 ppm di As rispettivamente in foglie, fusti e radici, con danni considerevoli per la pianta. Inoltre, hanno osservato una diminuzione della concentrazione di Mn, P e Ca in ogni parte della pianta e di K nelle radici. Carbonell-Barrachina et al. (1997) hanno dimostrato che la presenza di arsenico nel mezzo di crescita influenza negativamente lo sviluppo delle piante di fagioli:

all'aumentare della concentrazione di As(III) diminuisce la produzione di sostanza secca della pianta. Viene inoltre influenzato in modo negativo la produzione di fiori e quindi frutti. Le piante di fagiolo mostrano inoltre sintomi visibili da intossicazione dopo 4 giorni di trattamento da arsenico: avvizzimento, arresto della crescita, clorosi e necrosi fogliare.

Gough et al. (1979) hanno osservato che il contenuto di arsenico in foglie di alberi da frutto, con danni evidenti, è compreso tra 2,1 a 8,2 ppm. In generale la tolleranza delle piante all'arsenico è fissata a 2 ppm. Macnicol e Beckett (1983) hanno stimato che il livello critico massimo di arsenico, che determina una riduzione del 10% della resa in varie piante, va da 1 a 10 ppm. Apparentemente l'As è meno tossico quando le piante hanno a disposizione abbondanti quantità di fosforo. Questo sembra inibire la tossicità dell'arsenico nei mitocondri delle cellule di riso (Macnicol e Beckett, 1983).

Il comportamento delle piante di pomodoro in presenza di arsenico

Molte piante possono accumulare Arsenico a concentrazioni superiori rispetto allo 0,1% del loro peso secco. Il pomodoro è una pianta che tollera mediamente la presenza di arsenico nel terreno di crescita.

Barrachina et al. (1995) hanno dimostrato un aumento del livello di crescita delle piante di pomodoro esposte ad una concentrazione di 2 mg/L di arsenico nel mezzo di crescita. La ragione di questa risposta positiva delle piante alla presenza di arsenico non è del tutto chiara, ma sembra essere legata alla presenza dei nutrienti a base di fosforo. Infatti, arsenico e fosforo vengono assunti dall'apparato radicale delle piante attraverso gli stessi canali, tali canali mostrano affinità maggiore per il fosforo rispetto all'arsenico, per questo i fosfati presenti in soluzione risultano ottimi competitori degli arseniati. Il trasporto dell'arsenico all'interno della pianta risulta essere soppresso se nel mezzo di crescita sono presenti fosfati in quantità non limitanti. È stato dimostrato inoltre che il livello di fosforo all'interno delle foglie aumenta con l'aumentare della concentrazione di arsenico nel mezzo di crescita.

Carbonell-Barrachina et al. (1997) hanno dimostrato anche come piante di pomodoro cresciute in terreni contenenti arsenico lo accumulino principalmente nelle radici e solo una bassa quantità dell'elemento venga traslocata alle parti aeree. Inoltre, hanno dimostrato come la concentrazione di arsenico presente nelle foglie e nei frutti sia altamente dipendente dalla concentrazione di arsenico presente nel mezzo di crescita. La bassa traslocazione dell'arsenico alla parte aerea sembra essere legata all'elevata tossicità dello stesso per le membrane radicali; quando la concentrazione intracellulare del metalloide supera un valore critico le

cellule delle radici subiscono danni che portano ad una distruzione della funzionalità radicale e morte cellulare.

Burlò F. et al (1999) hanno dimostrato come anche il livello di produzione dei frutti sia negativamente influenzato da tutte le specie di arsenico anche se presenti in basse concentrazioni nel mezzo di crescita, anche se i composti organici a base di Arsenico causano una riduzione statisticamente superiore della produzione di frutti rispetto ai composti inorganici.

È stato dimostrato inoltre che il contenuto di arsenico di piante cresciute in presenza di arsenico nel mezzo di crescita è dipendente dalla forma dell'arsenico fornita, dalla disponibilità del metalloide, dal tempo di contatto con lo stesso e dall'organo analizzato. Il trattamento delle piante di pomodoro con composti inorganici a base di arsenico favorisce la traslocazione dello stesso nelle foglie, mentre l'utilizzo di composti organici favorisce la traslocazione nei frutti (Tlustos P. et al, 2006).

L'importanza del silicio

È stato dimostrato che la presenza di silicio nel mezzo di coltura di piante di pomodoro ne fa aumentare la tolleranza ad elevate concentrazioni saline; il silicio, infatti, agisce come osmoticum perché aumenta il livello di accumulo di acqua nei tessuti e di conseguenza la concentrazione salina all'interno delle cellule della pianta diminuisce mitigando gli effetti tossici dell'elevata salinità (Romero-Aranda M. R. et al., 2005).

Composti a base di silicio vengono inoltre comunemente utilizzati nelle pratiche agricole, soprattutto al sud dove si riscontra carenza idrica, per aumentare la tolleranza alla siccità delle piante di pomodoro in pieno campo.

La presenza contemporanea di silicio e arsenico all'interno del mezzo di crescita di piante di pomodoro potrebbe rivestire un problema importante in quanto è stato dimostrato, per piante di riso, come la presenza di silicio nel terreno possa influire sull'uptake di As(V) (Guo W., et al 2006).

Guo W. Et al. (2006) hanno dimostrato che se le piante di riso venivano trattate preventivamente con una soluzione di silicio la concentrazione di arsenico a livello radicale diminuiva significativamente, mentre non subiva variazioni la concentrazione di metalloide presente nella parte aerea. La differenza nel livello di uptake di arsenico in presenza di silicio viene spiegata dagli autori come una possibile inibizione, da parte del silicio, dei canali di

trasporto del fosforo che sono gli stessi deputati all'internalizzazione dell'arsenico. Infatti, nello stesso lavoro, è stato osservato come in presenza di silicio e concentrazioni di fosforo molto basse nel mezzo di crescita ($<14 \mu\text{M}$) si osservi un forte effetto inibitorio del silicio sul fosforo che si manifesta in una drastica riduzione della concentrazione intracellulare di fosfati. Infine è stato dimostrato che sia l'aumento di concentrazione intracellulare sia l'aumento di concentrazione nel mezzo di crescita di silicio influenzano l'uptake di arsenico da parte della pianta di riso. Tale effetto inibitore, però, sembra non essere dovuto ad una diretta competizione del silicio con il metalloide per gli stessi canali di trasporto sulla membrana cellulare ma ad un probabile effetto differente sugli stessi.

Scopo del lavoro

Data l'elevata importanza sia a livello economico sia a livello nutrizionale della coltura di pomodoro nel nostro paese e nel mondo ci siamo focalizzati sullo studio dell'effetto dell'arsenico sulla crescita di queste piante.

L'arsenico può essere presente nel terreno a causa dell'utilizzo di pesticidi e fertilizzanti a base del metalloide, ma può anche essere distribuito alle colture attraverso l'irrigazione con acqua di falda inquinata. Tale composto diventa un problema per il pomodoro non tanto per la sua tossicità verso la pianta stessa, quanto perché la pianta tende ad accumulare il metalloide anche nelle parti edibili facendo entrare così arsenico nella catena alimentare.

Nel nostro studio ci siamo quindi occupati di verificare il comportamento delle piante di pomodoro in presenza di As(III) e As(V) (in forma inorganica) nel mezzo di crescita in diverse concentrazioni sia in presenza sia in assenza di silicio. Questo per poter individuare varietà commerciali che si comportino da escluditori di arsenico e che possano essere utilizzate per le coltivazioni in terreni contaminati e per il consumo umano. Ci siamo anche occupati di studiare l'influenza della presenza di silicio nel mezzo di crescita sul livello di internalizzazione di arsenico.

Materiali e Metodi

Varietà analizzate

Le varietà di pomodoro analizzate sono state fornite dalla ditta sementiera ESASEM S.p.A. (Verona, Italia) sotto forma di sementi confettate.

Le varietà utilizzate per l'analisi sono: Aragon, Axel, Gladis, Podium, Rapidus, Ruphus e Wally Red

Terreni di crescita

Terreni per le colture in vitro

Per le prove di crescita in vitro e di germinazione sono stati utilizzati terreni agarizzati con la seguente composizione:

Ingrediente	Concentrazione finale
MS	1X
Saccarosio	30 g/l
Agar	0,8%

Tabella 9- Composizione del terreno utilizzato per la crescita in vitro

Dopo aver unito tutti gli ingredienti e portato a volume con acqua deionizzata i terreni vengono sterilizzati in autoclave a 120°C per 20'.

Quando i terreni raggiungono la temperatura di 50°C vengono addizionati, dove necessario, con le concentrazioni opportune di sodio arsenito (NaAsO_2) (Sigma Aldrich), sodio arseniato (Na_2HAsO_3) (Sigma Aldrich) e silicato di calcio (CaSiO_3) (Sigma Aldrich).

Terreno per la crescita in vivo

Per la crescita delle piante di pomodoro in terreno sono stati utilizzati vasetti di plastica dal diametro di 15 cm che sono stati riempiti con circa 200 g di terriccio universale acquistato in un vivaio. Dopo il raggiungimento dell'età desiderata delle piante (Circa 3 mesi)

al terreno veniva aggiunto: sodio arsenito (NaAsO_2) (Sigma Aldrich) oppure sodio arseniato (Na_2HAsO_3) (Sigma Aldrich) con o senza silicato di calcio (CaSiO_3) (Sigma Aldrich). Inoltre sono stati effettuati anche trattamenti con il solo silicato di calcio come controllo.

Prove di germinazione in vitro

Le prove di germinazione sono state effettuate ponendo 5 semi sterilizzati di ogni varietà in una piastra petri contenente terreno di crescita agarizzato come descritto in precedenza. I semi, prima della semina, sono stati lavati per 30' in acqua deionizzata per eliminare la confettatura, quindi sono stati sterilizzati con una soluzione di candeggina allo 0,1% per 30' quindi asciugati e lavati una seconda volta con acqua deionizzata per eliminare le tracce di candeggina rimaste. Ogni varietà è stata seminata su un terreno di controllo, su un terreno contenente NaAsO_2 0,2 mM, su un terreno contenente NaAsO_2 0,5 mM, su un terreno contenente Na_2HAsO_3 0,2 mM, su un terreno contenente Na_2HAsO_3 0,5 mM, su un terreno contenente NaAsO_2 0,2 mM e CaSiO_3 25 μM , su un terreno contenente NaAsO_2 0,5 mM e CaSiO_3 25 μM , su un terreno contenente Na_2HAsO_3 0,2 mM e CaSiO_3 25 μM , su un terreno contenente Na_2HAsO_3 0,5 mM e CaSiO_3 25 μM e su un terreno contenente CaSiO_3 25 μM .

I semi sono stati posti a crescere in una camera di crescita al buio ad una temperatura di 23°C per 2 giorni quindi sono stati sottoposti, mantenendo costante la temperatura, a 16 ore di luce e 8 ore di buio.

La crescita è stata monitorata a giorni alternati, l'esperimento è stato fatto proseguire per 14 giorni, al termine dei quali sono stati annotati il numero di semi germinati per i quali è stata anche determinata la lunghezza del germoglio.

Prove di crescita in terreno

I semi sono stati seminati in platò di polistirolo contenente terriccio universale e posti a crescere in cabinet a 24°C con 50% di umidità, 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Dopo 2 settimane dalla semina le piantine vengono trasferite in vasetti di plastica contenenti circa 200 g di terriccio universale. Dopo 3 mesi dalla semina 3 piantine per ogni varietà vengono trattate con: 5 ppm di NaAsO_2 , 15 ppm di NaAsO_2 , 5 ppm di Na_2HAsO_3 , 15 ppm di Na_2HAsO_3 , 5 ppm di NaAsO_2 e 2,5 mM di CaSiO_3 , 15 ppm di NaAsO_2 e 2,5 mM di CaSiO_3 ,

5ppm di Na_2HAsO_3 e 2,5mM di CaSiO_3 , 15 ppm di Na_2HAsO_3 e 2,5mM di CaSiO_3 e 2,5mM di CaSiO_3 . Le piante trattate sono lasciate crescere per ulteriori 2 settimane quindi vengono campionate per effettuare le analisi al microscopio a scansione elettronica SEM e le analisi di assorbimento atomico.

Prove di crescita in vitro

Le varietà che hanno mostrato un comportamento più interessante (esclusori o accumulatori) sono state testate in terreno MS agar. In un primo momento i semi sono stati lavati per 30' in acqua deionizzata per eliminare la confettatura, quindi sono stati sterilizzati con una soluzione di candeggina allo 0,1% per 30' quindi asciugati e lavati una seconda volta con acqua deionizzata per eliminare le tracce di candeggina rimaste.

Dopo la sterilizzazione, i semi sono stati adagiati sulla superficie del terreno e sono stati posti in una camera di crescita al buio ad una temperatura di 23°C per 2 giorni quindi sono stati sottoposti, mantenendo costante la temperatura, a 16 ore di luce e 8 ore di buio. Dopo due settimane dalla semina le piantine vengono trasferite in terreno MS agarizzato di controllo e in terreni MS agarizzati contenenti: NaAsO_2 0,2 mM, NaAsO_2 0,5 mM, Na_2HAsO_3 0,2 mM, Na_2HAsO_3 0,5 mM, NaAsO_2 0,2 mM e CaSiO_3 25 μM , NaAsO_2 0,5 mM e CaSiO_3 25 μM , Na_2HAsO_3 0,2 mM e CaSiO_3 25 μM , Na_2HAsO_3 0,5 mM e CaSiO_3 25 μM e CaSiO_3 25 μM . Tre piantine per ogni varietà vengono sottoposte ad ogni trattamento.

Dopo il trattamento, le piantine, sono state monitorate giornalmente per verificare gli individui morti, tali individui sono stati raccolti e essiccati per le analisi all'assorbimento atomico. L'esperimento è stato portato avanti per 2 settimane dopo il trattamento, trascorso questo tempo, le piante che non avevano subito danni in precedenza e che quindi non erano già state raccolte, venivano campionate e poste in stufa ad essiccare per le analisi all'assorbimento atomico.

Campionamento

Prove di crescita in terriccio

Dopo aver trattato le piantine in modo opportuno e aver atteso il tempo di trattamento è stato effettuato il campionamento sia della parte vegetale che del terreno.

Il terreno di ogni vaso è stato posto in appositi contenitori quindi posizionato in stufa a 60°C, per favorire l'essiccamento, poi setacciato e collezionato in falcon in attesa di subire la digestione e l'analisi all'assorbimento atomico.

La porzione vegetale è stata separata in parte aerea e parte radicale, per ognuna delle due parti sono state effettuate delle sezioni trasversali che sono state essiccate a temperatura ambiente e posizionate su vetrini per l'analisi al microscopio elettronico, la porzione restante è stata posta ad essiccare in una stufa a 60°C, quindi resa polvere e collezionata in attesa di essere digerita in acido nitrico per effettuare le analisi all'assorbimento atomico.

Prove di crescita in vitro

Dopo aver trattato le piantine in modo opportuno e aver atteso il tempo di trattamento è stato effettuato il campionamento unicamente sulla porzione vegetale che è stata separata in parte aerea e parte radicale. Il tutto è stato posizionato in una stufa a 60°C ad essiccare, quindi reso polvere e collezionato in attesa di essere digerita in acido nitrico per effettuare le analisi all'assorbimento atomico.

Analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM/EDX)

Il microscopio elettronico a scansione, indicato con la sigla SEM (Scanning Electron Microscope), fornisce informazioni sull'aspetto, sulla natura e sulle proprietà di superfici e degli strati sottostanti di campioni solitamente solidi, con risoluzione media di 2,5 nanometri (riferita al segnale "generato" dagli elettroni secondari). Per ottenere un'immagine al microscopio elettronico, la superficie di un campione solido è percorsa lungo un tracciato a reticolo con un fascio elettronico finemente focalizzato. Un tracciato a reticolo è una forma di scansione simile a quella usata nei tubi a raggi catodici, in cui un raggio elettronico è fatto scorrere sulla superficie lungo una linea retta orizzontale, riportato alla posizione precedente e traslata verticalmente di un incremento fisso: questo processo è ripetuto finché non è stata indagata tutta l'area prescelta della superficie.

Quando una superficie è "investita" da elettroni ad elevata energia sono prodotti diversi tipi di segnali, alla base della microscopia elettronica a scansione sono principalmente due i segnali che interessano: gli elettroni secondari e quelli retrodiffusi (backscatterati). Gli elettroni secondari, o segnale SE (Secondary Electron), sono definiti convenzionalmente come gli elettroni uscenti dal campione con energia minore o uguale a 50 eV. Essi provengono da una

profondità di pochi nm (nanometri) e scaturiscono dal fascio primario e dall'interazione degli elettroni retrodiffusi con gli elettroni di valenza (del campione). Gli SE forniscono informazioni sulla topografia delle superfici, sulla presenza e sulla distribuzione di campi magnetici o elettrici; per rilevarli si fa uso di uno scintillatore/fototubo preceduto da uno stadio acceleratore. L'immagine fornita da tali elettroni appare in rilievo, come se l'osservatore fosse allo stesso livello del diaframma interno e guardasse l'oggetto illuminato da un'ipotetica sorgente "luminosa" situata in corrispondenza del rivelatore. Gli elettroni retrodiffusi, o segnale BSE (Back-Scattered Electron), sono elettroni di energia maggiore di 50 eV che derivano principalmente dalle interazioni (singole a grande angolo o multiple, elastiche e non) del fascio primario con i nuclei degli atomi del campione. I BSE forniscono informazioni riguardo al numero atomico medio della zona di provenienza (circa qualche μm), alla topografia e alla struttura cristallina del campione.

I prodotti dell'interazione vengono raccolti da opportuni rivelatori ed i segnali ottenuti, vengono inviati a modulare l'intensità del fascio del tubo a raggi catodici. Il movimento di scansione della sonda e del pennello elettronico del tubo è controllato unicamente da un generatore, che ad ogni posizione della sonda sul preparato ne fa corrispondere una definita del pennello sullo schermo del tubo, la cui luminosa dipende quindi dall'intensità del segnale raccolto. Gli elementi costituenti l'immagine finale prendono il nome di punti immagine o pixel (0.01 mm^2). L'ingrandimento ottenuto con un tale sistema ottico, è dato dal rapporto fra la larghezza dello schermo del tubo a raggi catodici e la lunghezza del corrispondente tratto percorso dalla sonda sulla superficie del campione. Il limite alla risoluzione (minima distanza alla quale due punti rimangono distinti) del SEM è dovuto alle dimensioni del diametro geometrico della sonda.

Il sistema ottico dello strumento è costituito da due lenti magnetiche: lente condensatrice e lente obiettivo. Le prime (costituite da una o più lenti) servono per il controllo del fascio elettronico che raggiunge l'obiettivo; le seconde determinano l'intensità del fascio di elettroni incidente sulla superficie del campione. La scansione è eseguita per mezzo di due coppie di bobine elettromagnetiche poste internamente alle lenti dell'obiettivo, queste muovono il pennello elettronico sulle coordinate cartesiane X e Y della superficie del campione tramite il segnale elettrico inviatogli. La superficie del campione viene rivestita da un sottile film metallico prodotto per "sputtering" o per evaporazione sotto vuoto. Per i

campioni vegetali risulta più semplice ed utile rivestire la superficie del campione di un sottile strato di grafite.

Quando gli elettroni colpiscono il campione gli elementi che lo compongono vengono eccitati ed emettono raggi X per tornare allo stato stabile. Ogni elemento della tavola periodica ha un suo spettro di emissione di raggi X unico. Con un apposito detector per raggi X (nel nostro caso Oxford Xray detector) è possibile raccogliere i raggi X e con un apposito software delineare lo spettro di emissione del campione. Il software da noi utilizzato è INCA 4.04 e consente di identificare tutti gli elementi presenti nello spettro di ogni singolo campione. Si possono fare due tipi di analisi sfruttando i raggi X: analisi semiquantitativa e localizzazione (“dot maps”). Nel primo caso è possibile determinare la percentuale di ogni elemento di interesse presente nel campione; nel secondo caso vengono disegnate delle mappe (di un’area del campione) in cui si evidenzia la distribuzione di ogni singolo elemento di interesse. Il software consente di determinare la percentuale di ogni elemento correlandola al numero di raggi X recepiti per secondo (cps) dal detector perché essi sono direttamente proporzionali alla quantità di ogni elemento. Esso inoltre consente di visualizzare le mappe con colorazioni fittizie, in generale abbiamo scelto l’opzione secondo la quale la concentrazione dell’elemento cresce con la luminosità dei pixel.

Per la nostra analisi è stato utilizzato un microscopio SEM/EDX Joel 6400 (Giappone) con sonda EDX Oxford (Inghilterra); il tutto governato dal software INCA 4.04.

Analisi statistica

Per determinare se la differenza tra controlli e trattati era statisticamente significativa è stato utilizzato il test statistico non parametrica della varianza per un criterio di classificazione. Tale test viene utilizzato quando si utilizzano misure rilevate con una scala continua, seppure ordinale, quindi tutti i dati possono essere disposti in ranghi con un numero nullo o comunque ridottissimo di valori uguali.

Per effettuare tale test è stato utilizzato il software statistico SPSS 15.

Risultati e discussioni

Prove di germinazione

Il livello di influenza della presenza di arsenico nel mezzo di crescita sulla germinazione dei semi di pomodoro è stato valutato sia in termini di semi germinati sul totale sia in termini di allungamento del germoglio rispetto al controllo.

Analizzando il numero di semi germinati per piastra è possibile concludere che la presenza di una bassa quantità di arsenico nel terreno di crescita, qualsiasi sia la forma in cui è presente, non influisce sul livello di germinazione dei semi di pomodoro delle varietà prese in considerazione.

Analizzando l'istogramma mostrato in figura 9 si osserva che unicamente l'As(V) ad una concentrazione 0,5mM influenza negativamente e in modo statisticamente significativo sulla germinazione dei semi di pomodoro. D'altro canto, la stessa condizione, in presenza di una concentrazione di 25µM di silicio sembra essere assimilabile al controllo. Questo indica come, in effetti, il silicio possa avere un effetto positivo sulla resistenza alla presenza di arsenico nel terreno di germinazione, evidenza che era già stata in precedenza dimostrata per il riso da Guo et al. (2006) e Li et al. (2009). L'effetto, visibile solo nel caso di trattamento con As(V), è spiegabile con l'evidenza che il silicio interferisce con l'uptake dell'acido fosforico e che tale forma di arsenico viene internalizzata dalle radici tramite gli stessi canali, quindi la riduzione dell'attività dei canali del fosforo da parte del silicio riduce anche la il livello di uptake di As(V) e quindi aumenta la percentuale di germinazione.

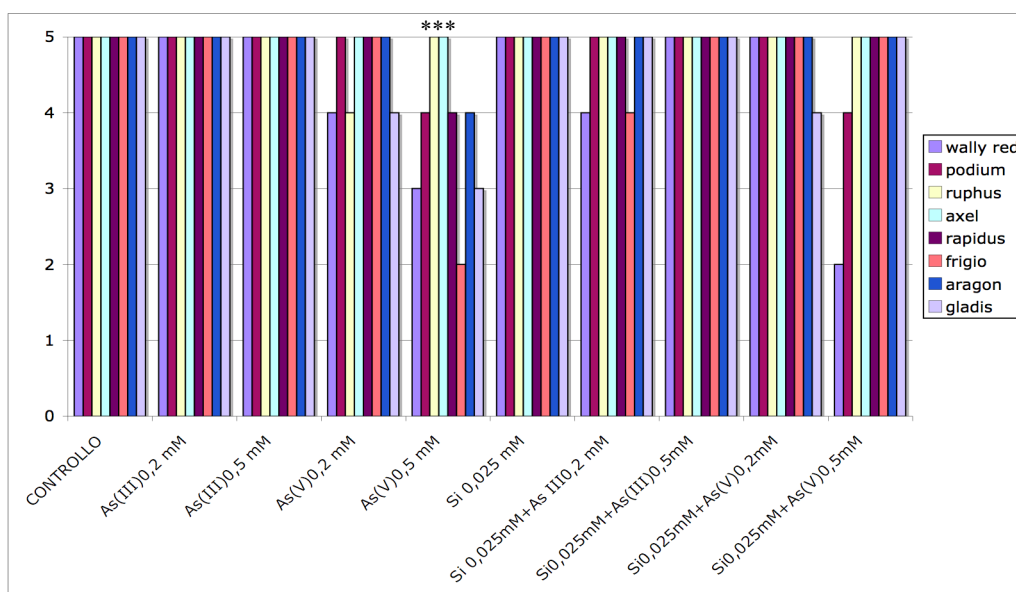


Figura 9- Livello di germinazione dei semi trattati con As(III), As(V) e silicio

L'effetto maggiore dell'As(V) sulla germinazione, stadio di sviluppo in cui le cellule sono in replicazione attiva, potrebbe essere legato al suo meccanismo tossico intracellulare, questa forma di metalloide, infatti, sembra sostituire il fosforo all'interno della doppia elica del DNA interferendo con i meccanismi di replicazione.

Dalla misura della lunghezza dei germogli è stato possibile identificare l'effetto dell'arsenico sullo sviluppo degli stessi. In figura 10A si osserva come l'As(III) in entrambe le concentrazioni condizioni negativamente la crescita rispetto al controllo e all'As(V), anche se non si osservano differenze statisticamente significative tra le due concentrazioni di arsenico all'interno della stessa specie. Questo effetto differenziale conferma le evidenze che indicano come, per le piante, la forma di arsenico più tossica sia quella con valenza +3.

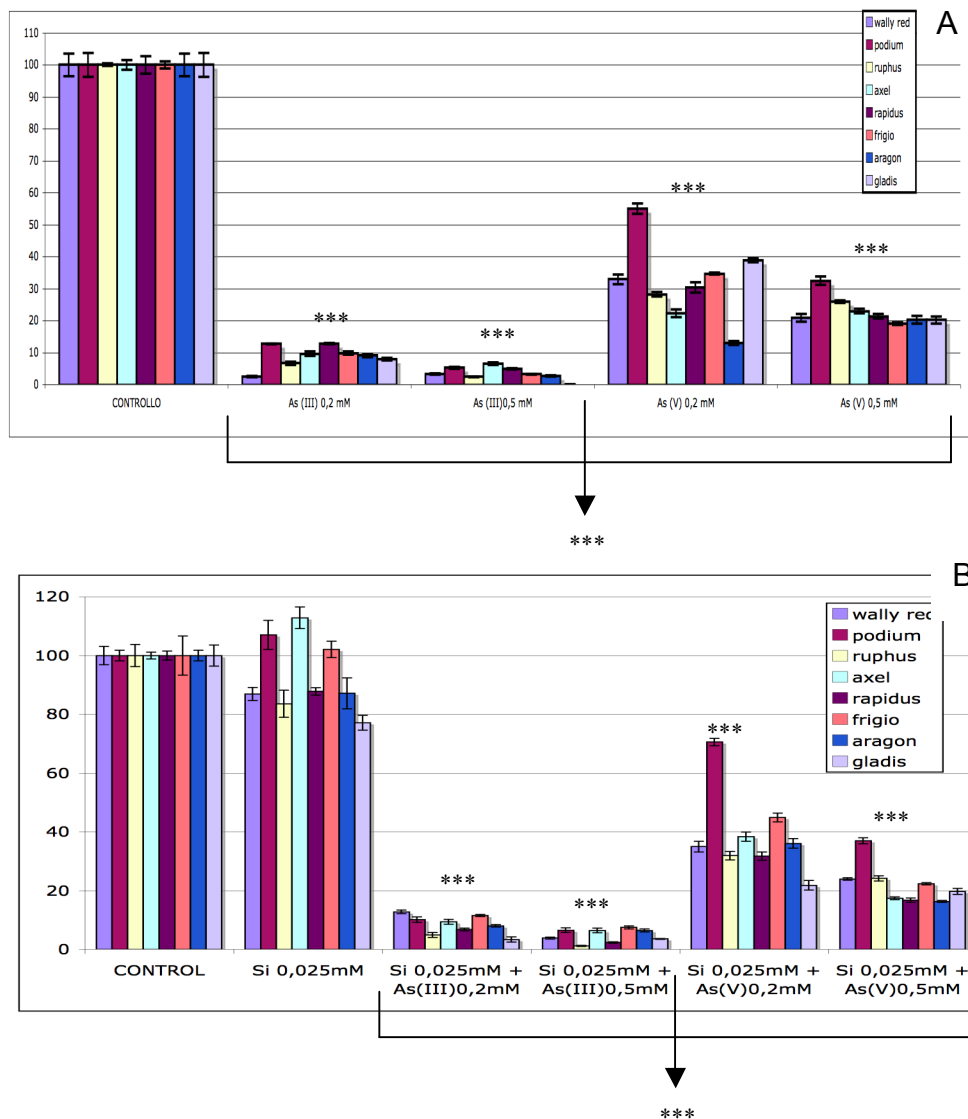


Figura 10- Istogramma normalizzato del livello di crescita dei germogli in un terreno di coltura contenete solo arsenico (A) e contenente arsenico e silicio o solo silicio (B).

Osservando gli istogrammi che riportano l'allungamento dei germogli in presenza di arsenico e silicio è possibile notare che la differenza tra presenza e assenza di silicio nel mezzo di crescita non è statisticamente significativa. Inoltre si osserva come la presenza di solo silicio nel mezzo di crescita non influenzi né in maniera positiva né in maniera negativa l'allungamento dei germogli delle piantine.

Da queste prime prove di crescita possiamo concludere che l'As(V) alla concentrazione di 0,5 mM influenza negativamente la germinazione di tutte le varietà di pomodoro testate tranne Ruphus e Axel. Per quel che riguarda l'allungamento dei germogli possiamo concludere che entrambe le forme di arsenico influenzano negativamente tale parametro e che As(III) influisce in modo maggiore rispetto ad As(V). All'interno di questi trattamenti la varietà che sembra essere più tollerante al metalloide è Podium. Analizzando la presenza contemporanea di arsenico e silicio sembra che il silicio non migliori la tolleranza delle piantine all'arsenico, anche se in questo caso, le varietà che sembrano tollerare meglio la tossicità sono Podium e Frigio.

Prove di crescita in terriccio

Le prove di crescita su terriccio universale addizionate con arsenico e silicio sono per il momento ancora preliminari e hanno preso in considerazione unicamente il trattamento con As(V), che è risultato il meno tossico, alla concentrazione minore, 5ppm. Le sezioni di fusto e radice analizzate con microanalisi EDX in modo semiquantitativo per la distribuzione dell'arsenico all'interno della ha comunque reso possibile evidenziare comportamenti interessanti di alcune varietà. L'istogramma in figura 11 rappresenta la media della percentuale di arsenico su tutti gli elementi presenti nella sezione di tutti i campioni di tutti i trattamenti. Da questa analisi semiquantitativa è possibile osservare come le varietà Argon e Axel sembrano accumulare una buona quantità di arsenico sia nelle radici sia nel fusto, sia in assenza sia in presenza di silicio. Per quel che riguarda la varietà Argon la quantità di arsenico accumulata sembra essere inferiore in presenza di silicio mentre per la varietà Axel sembrerebbe essere un effetto contrario; tale comportamento risulta in contrapposizione con quanto descritto da Li et al (2009) e da Guo et al. (2005) per il riso, infatti tali ricercatori indicavano che la presenza di silicio nel terreno diminuiva l'uptake di arsenico a livello radicale mentre non andava ad influire sul livello di traslocazione del tossico alla parte aerea; evidenza che sembra essere confermata anche per le altre varietà di pomodoro prese in

esame. È da tenere in considerazione che le condizioni di crescita del riso sono anaerobiche, inoltre nei lavori citati precedentemente viene utilizzato l'arsenito e non l'arseniato come è stato utilizzato in queste prove.

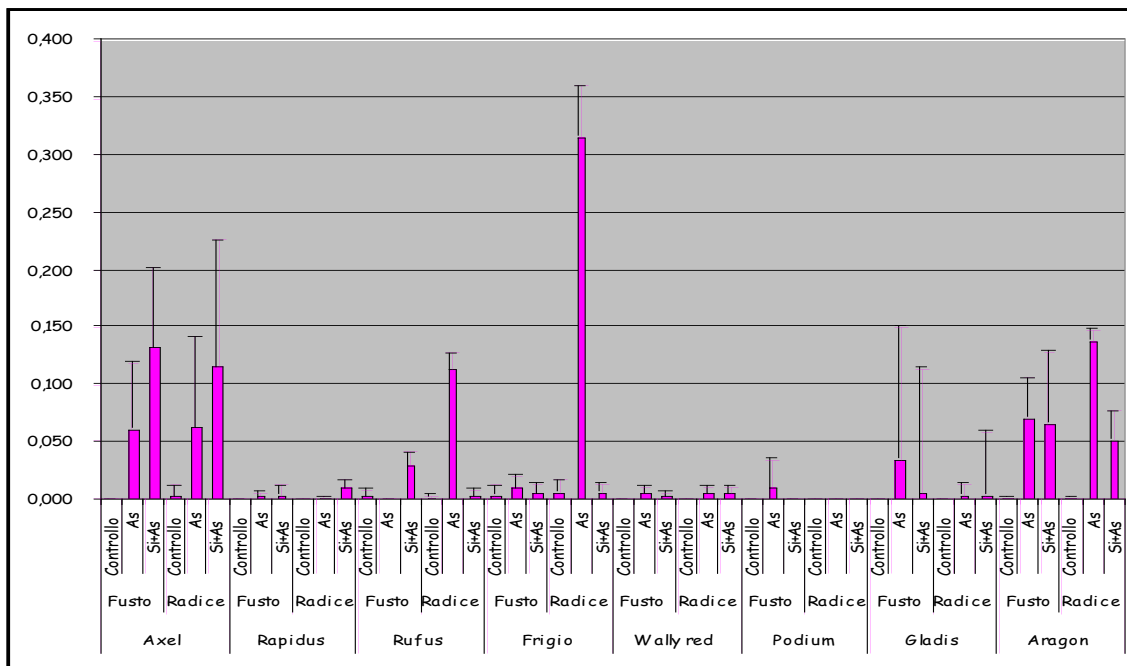


Figura 11- Istogramma raffigurante la percentuale media, su tutti gli elementi, del contenuto di arsenico in sezioni di fusto e radice trattati con solo arsenio e con arsenio e silicio

L'altra varietà con comportamento interessante è risultata essere Frigio che, dall'istogramma, sembra accumulare arsenico a livello radicale ma non sembra traslocarlo a livello del fusto, tale comportamento scompare in presenza di silicio, in questo caso la varietà assorbe una quantità di arsenico modesta e assimilabile a tutte le altre varietà con comportamento medio. La varietà Wally Red al contrario della varietà Frigio, non assorbe arsenico né nelle radici né nel fusto quando viene trattato solo con arsenico, se assieme all'arsenico viene fornito silicio, invece, tale varietà sembra assorbire arsenico a livello radicale che però non viene traslocato alla parte aerea. Per quel che riguarda la varietà Podium, sembra non accumulare arsenico né a livello radicale né a livello della parte aerea, sia se trattate con solo arsenico, sia se trattate con arsenico e silicio contemporaneamente. Le altre varietà prese in considerazione per l'analisi sembrano mostrare un comportamento comune con bassi livelli di uptake sia radicale sia aereo.

Tali dati sono stati avvalorati anche dalle mappe di distribuzione "Dot Map" di arsenico a livello dei diversi organi della pianta.

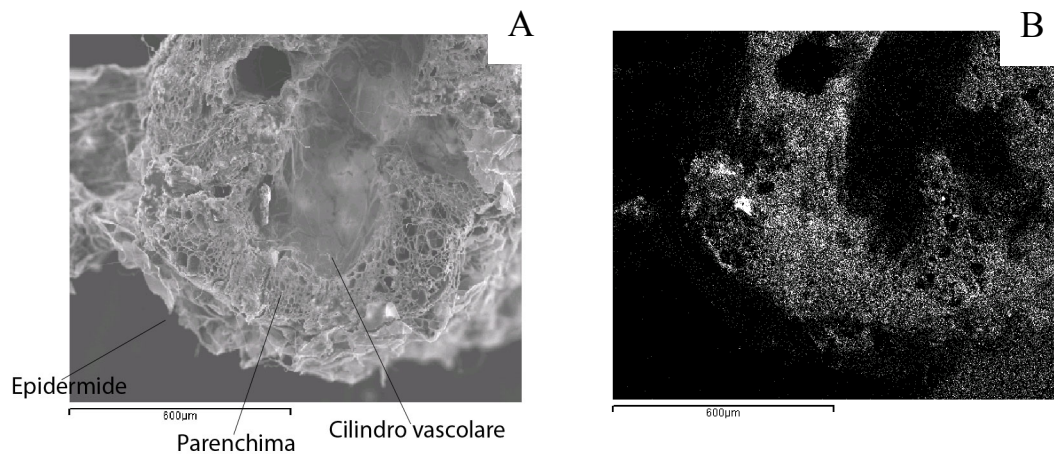


Figura 12- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Aragon trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

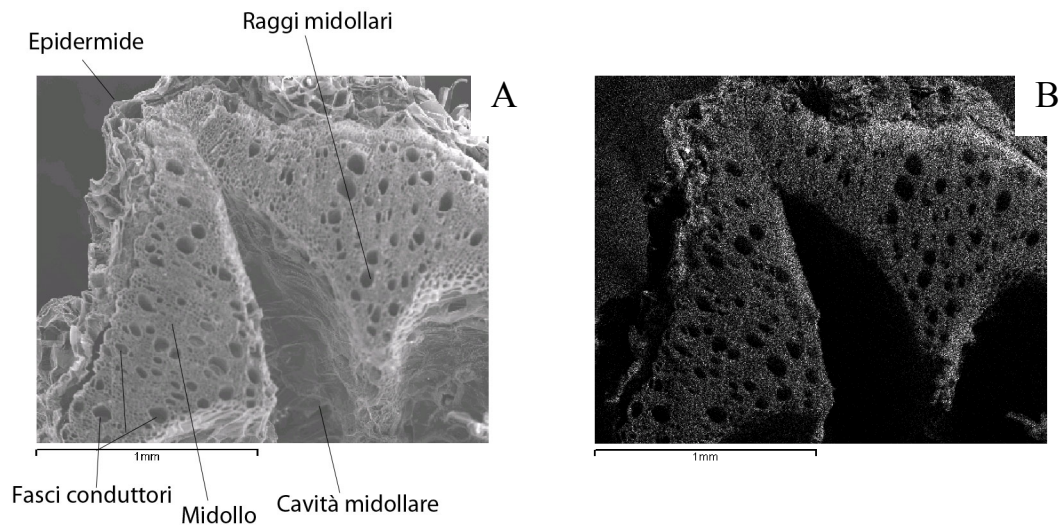


Figura 13- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Aragon trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

Nelle figure 12A e 13A sono riportate le sezioni di fusto e radice della varietà Argon trattati solo con arsenico, mentre nelle figure 12B e 13B sono riportate le distribuzioni di arsenico nei tessuti delle radici e dei fusti rispettivamente. In queste immagini si osserva come l'arsenico sia distribuito uniformemente in entrambi gli organi della pianta e data l'elevata presenza del metalloide sia distribuito in maggior misura nell'epidermide.

Nelle figure 14A e 15A sono riportate le sezioni di fusto e radice della varietà Argon trattati con arsenico e silicio contemporaneamente mentre nelle figure 14B e 15B sono riportate le distribuzioni di arsenico nei tessuti delle radici e dei fusti rispettivamente. Da tali immagini è possibile osservare come l'arsenico sia distribuito uniformemente in tutti i tessuti con maggiore concentrazione nell'epidermide.

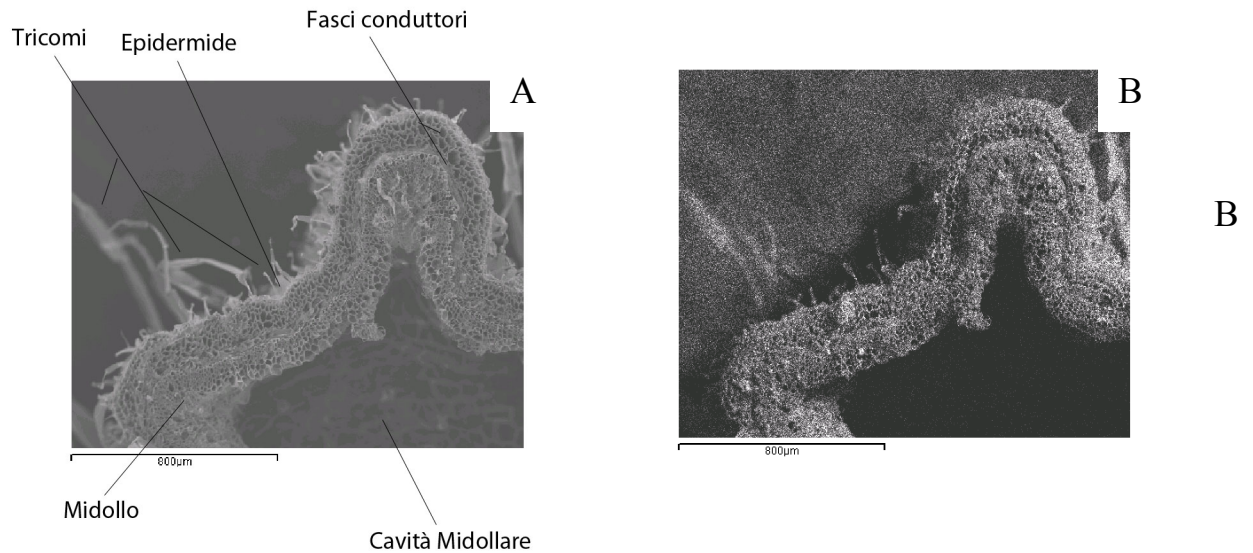


Figura 14- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Aragon trattato con arsenico e silicio (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

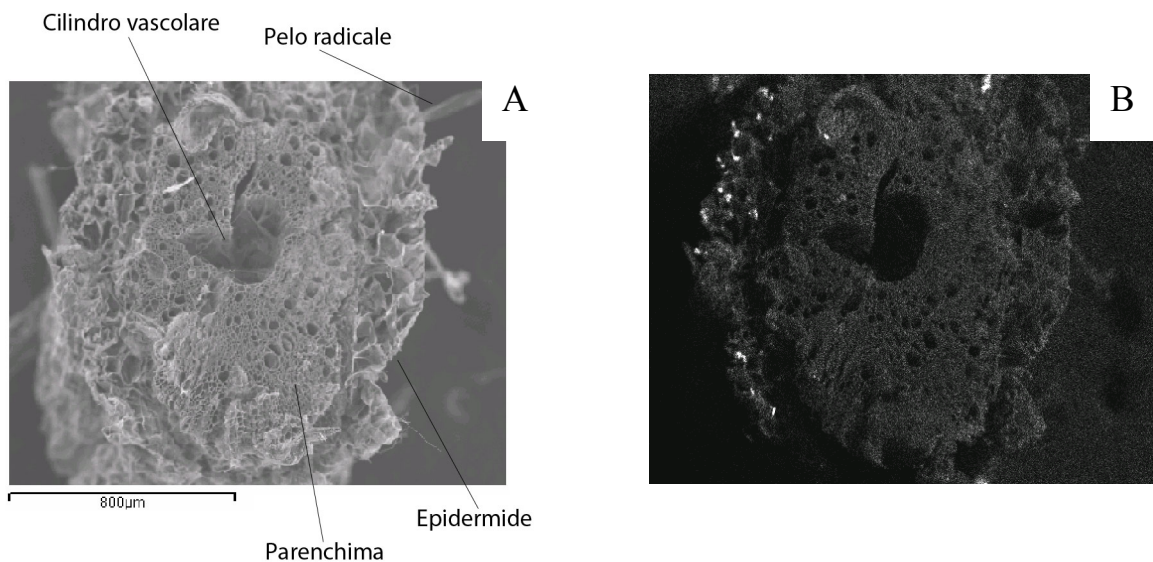


Figura 15- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Aragon trattato con arsenico e silicio (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

Come nel caso della varietà Aragon anche la varietà Axel sembra accumulare arsenico sia a livello radicale (Figura 16B) sia a livello di parte aerea (Figura 17B). La presenza di arsenico nei tessuti sembra omogenea e, a differenza di Aragon non sembra esserci una localizzazione elevata a livello dell'epidermide.

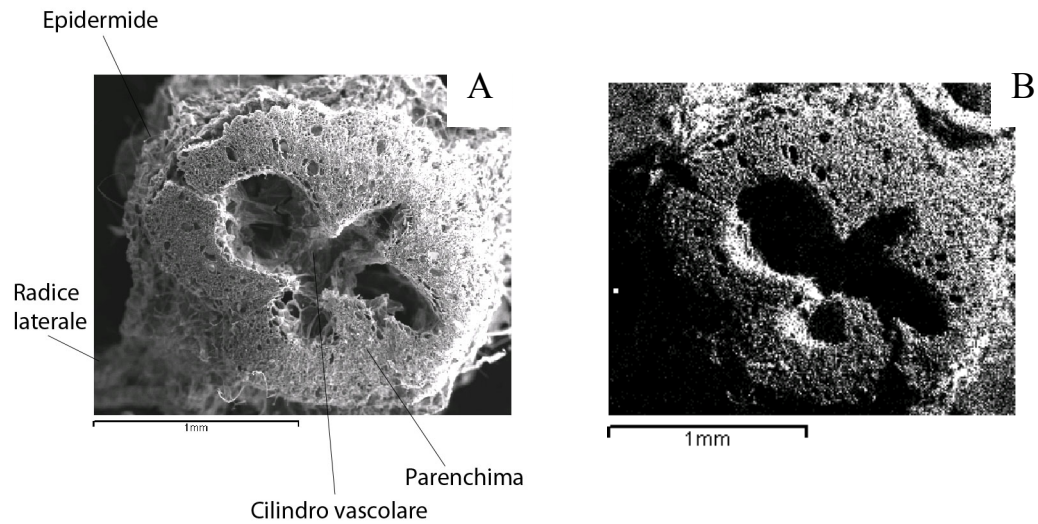


Figura 16- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Axel trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

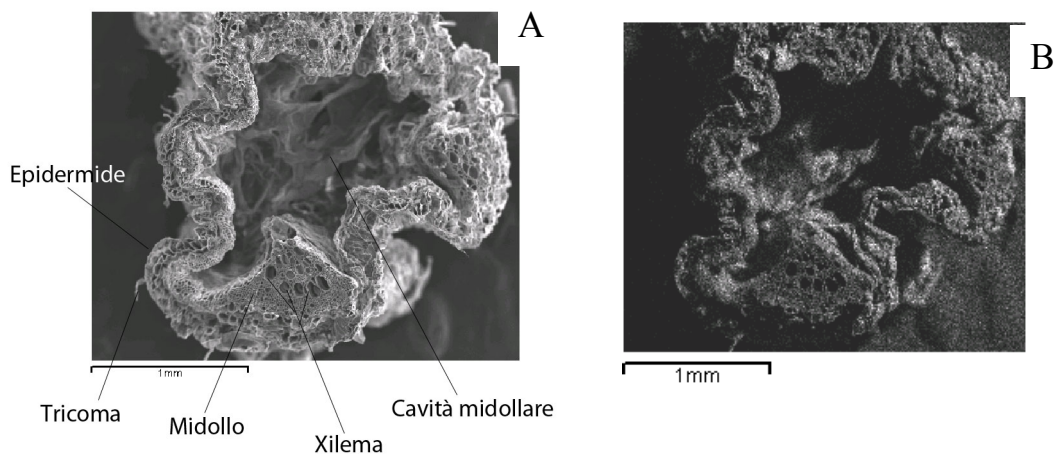


Figura 17- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Axel trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

Nelle figure 18A e 19A sono riportate le sezioni di fusto e radice di Argon trattati con arsenico e silicio contemporaneamente mentre nelle figure 18B e 19B sono riportate le distribuzioni di arsenico nei tessuti delle radici e dei fusti rispettivamente.

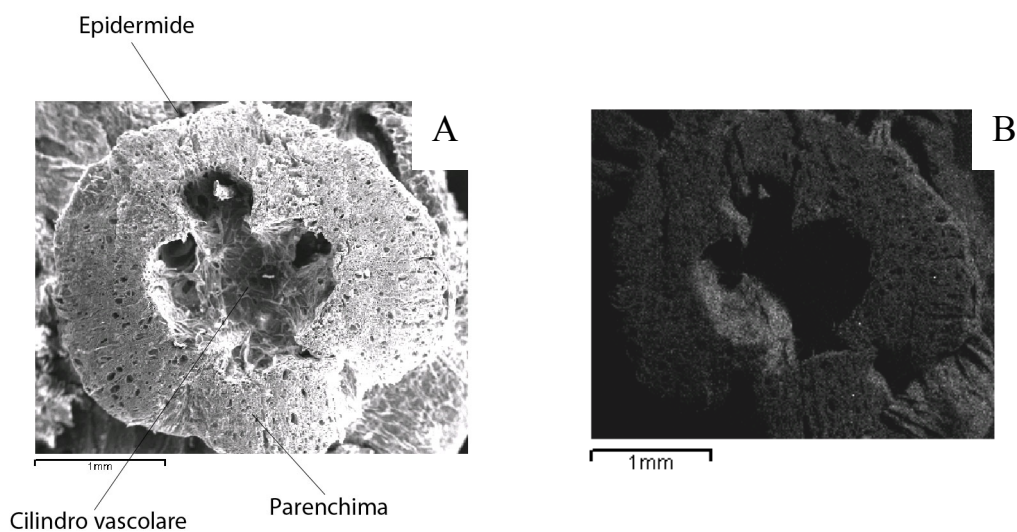


Figura 18- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Axel trattato con arsenico e silicio (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

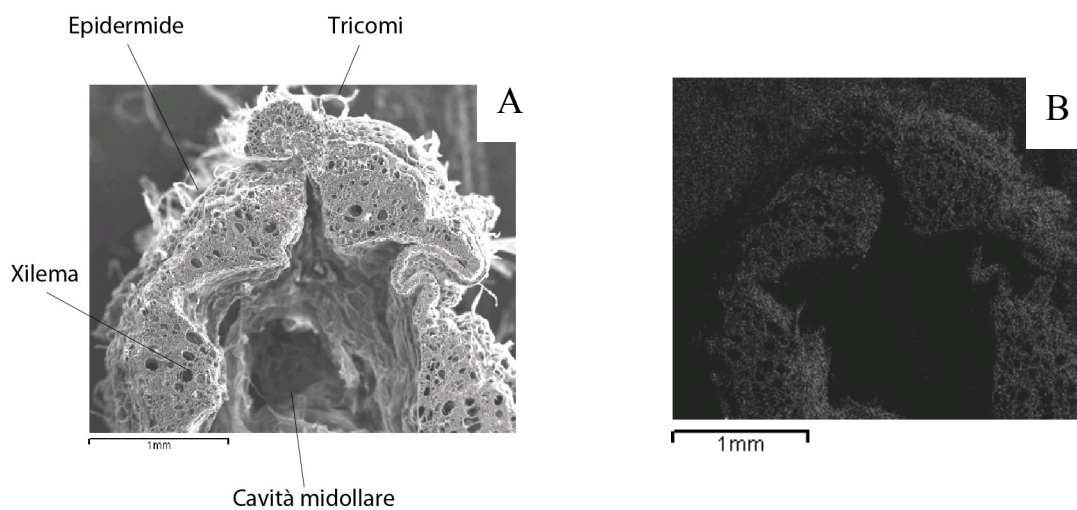


Figura 19- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Axel trattato con arsenico e silicio (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

Da tali immagini è possibile osservare come l'arsenico sia distribuito uniformemente in tutti i tessuti e come la presenza di silicio non abbia avuto alcun effetto sul suo accumulo nei.

Nella figura 20A è mostrata la sezione di radice della varietà Frigio trattata con As, analizzando l'immagine 20B si nota una distribuzione uniforme di arsenico all'interno di tutti

i tessuti radicali, con concentrazione maggiore nei tessuti dell'epidermide. Analizzando la sezione di fusto della varietà frigio trattata solo con arsenico (Figura 21A e 21B) e la mappa della distribuzione del metalloide all'interno dei tessuti del fusto si osserva una presenza minore dell'arsenico, indicazione del fatto che esso viene assorbito da parte delle radici della pianta ma viene traslocato poco efficacemente alla parte aerea. Questo basso livello di traslocazione può essere legato ad una bassa tolleranza delle cellule radicali di questa cultivar alla presenza di As, che vanno incontro a lisi.

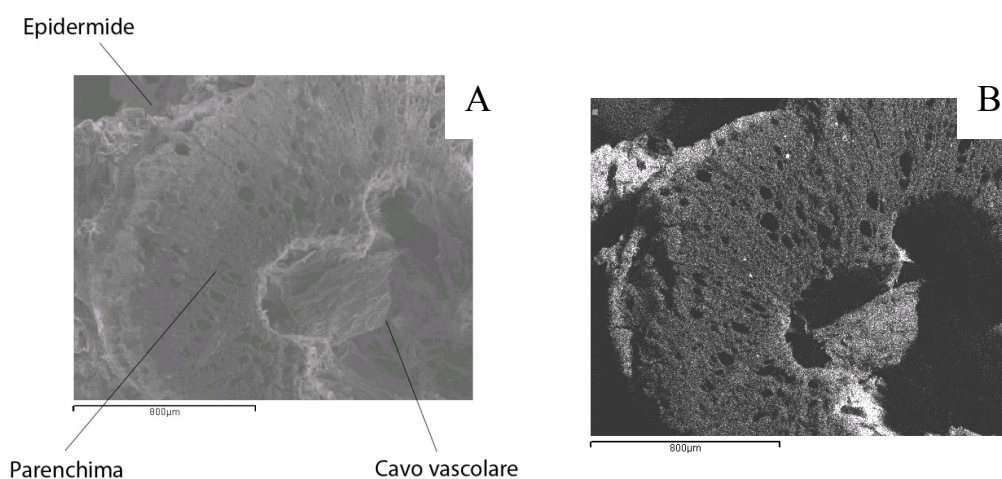


Figura 20- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Frigio trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

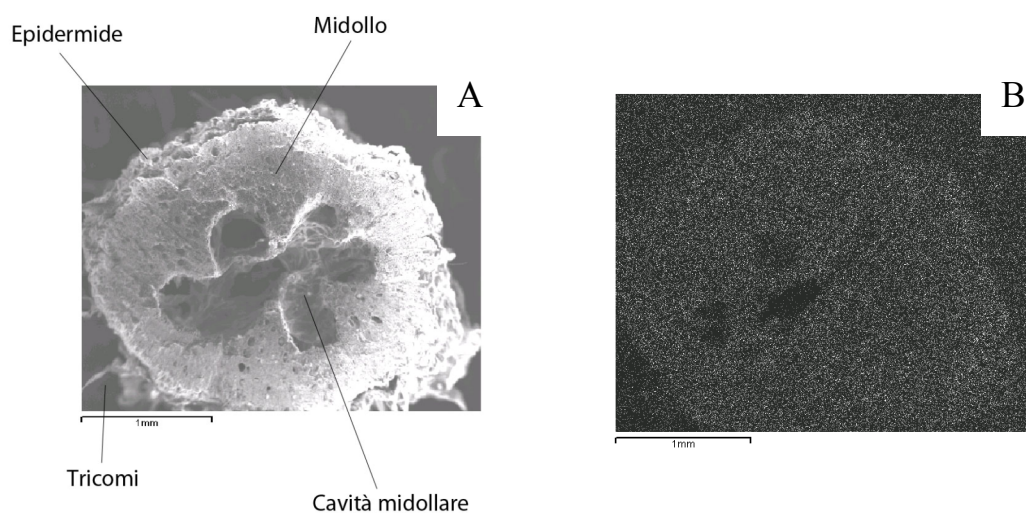


Figura 21- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Frigio trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

Nella figura 22A è riportata la sezione di una radice di una pianta di varietà Frigio trattata con arsenico e silicio, osservando la distribuzione dell'arsenico nei tessuti della stessa (Figura

22B). Da tale immagine si nota come il silicio abbia avuto l'effetto positivo, indicato da Guo et al. 2006, sulla riduzione dell'uptake dell'arsenico. Infatti, confrontando tali immagini con l'immagine 20A relativa alla distribuzione dell'arsenico all'interno dei tessuti radicali della pianta trattata con solo arsenico osserviamo una netta riduzione dell'accumulo dello stesso. Questo basso livello di uptake radicale si riflette, naturalmente, in una bassa traslocazione a livello aereo dell'arsenico (Figure 23A e 23B).

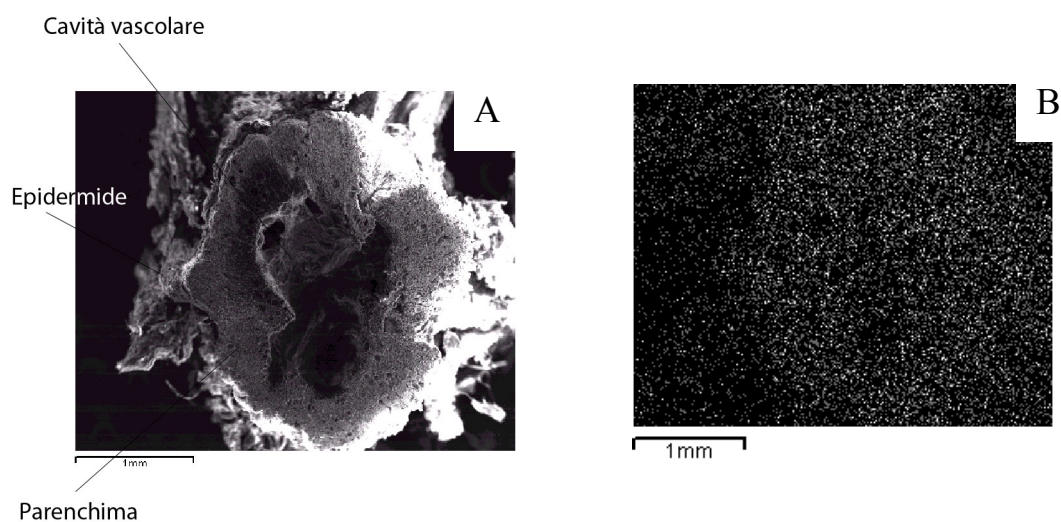


Figura 22- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Frigio trattato con arsenico e silicio (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B).

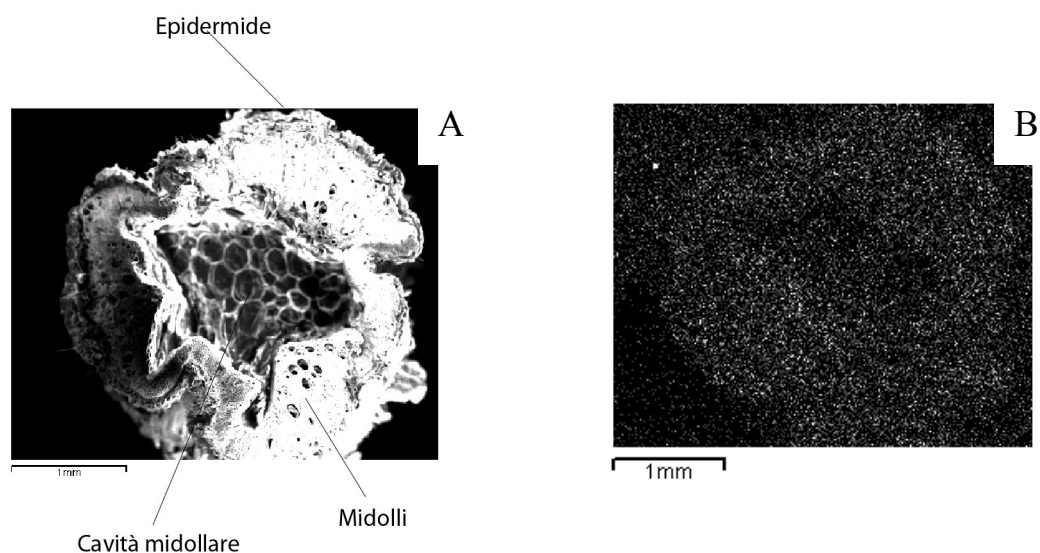


Figura 23- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Frigio trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

Analizzando le sezioni di radice e fusto della varietà Wally Red trattata con solo As non si osserva presenza di arsenico nei tessuti né delle radici (Figura 24A e 24B) né dei fusti (Figura 25A e 25B), questo dato potrebbe portare a pensare che tale varietà riesca in qualche modo ad escludere l'arsenico, analizzando invece il trattamento combinato con arsenico e silicio si osserva, nella sezione di radice (Figura 26A e 26B) una presenza di arsenico consistente e sicuramente maggiore rispetto al trattamento con solo arsenico. L'arsenico assorbito a livello radicale non sembra essere traslocato a livello aereo (immagine di sezione di fusto Figura 27A e 27B).

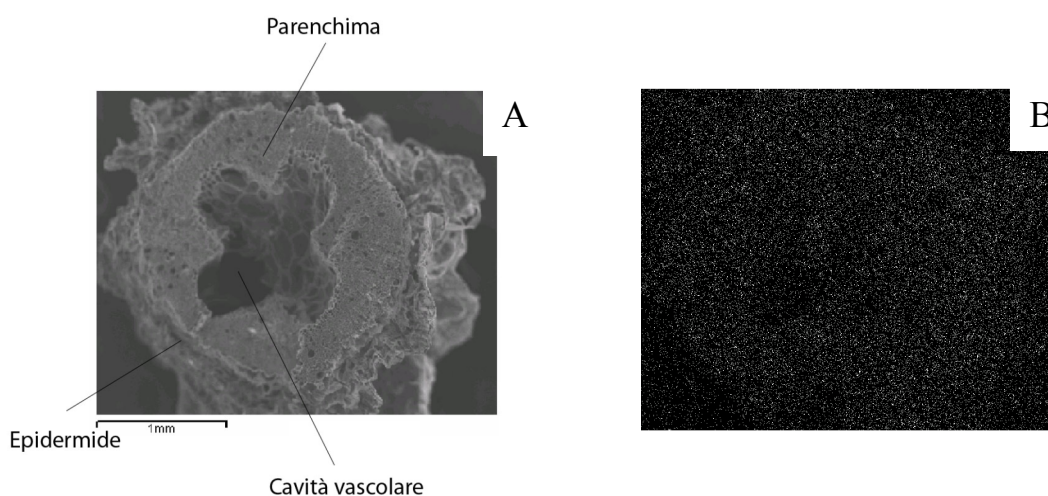


Figura 24- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Wally Red trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

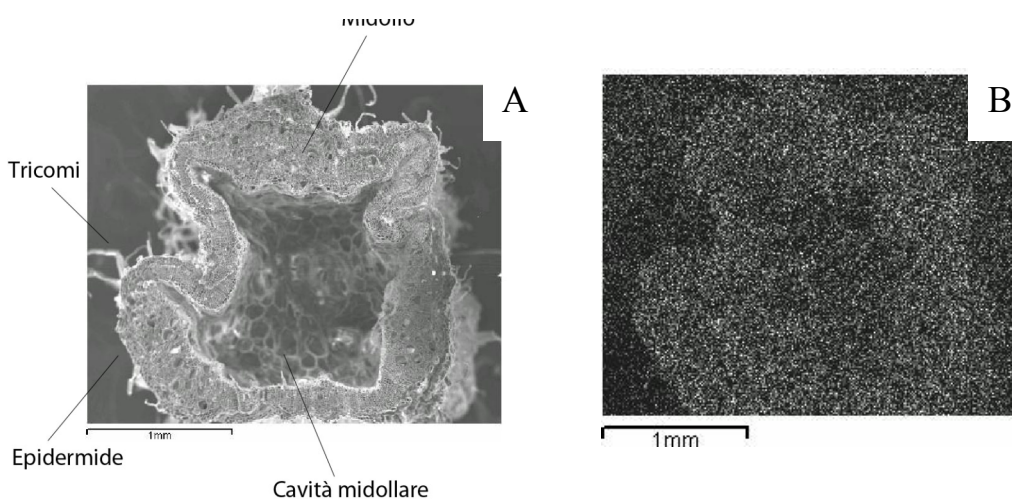


Figura 25- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Wally Red trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

Queste varietà potrebbe essere interessante dal punto di vista agronomico, in quanto potrebbero essere utilizzate nelle aree contaminate da arsenico dove però ci sia buona disponibilità d'acqua, dove non siano quindi necessari trattamenti con silicati per ridurre lo stress salino delle piante di pomodoro.

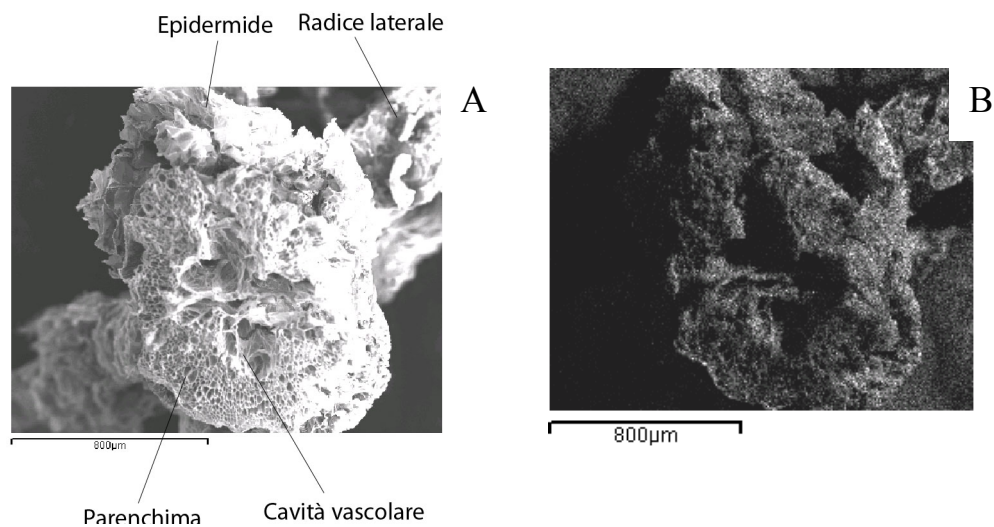


Figura 26- - Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Wally Red trattato con arsenico e silicio (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

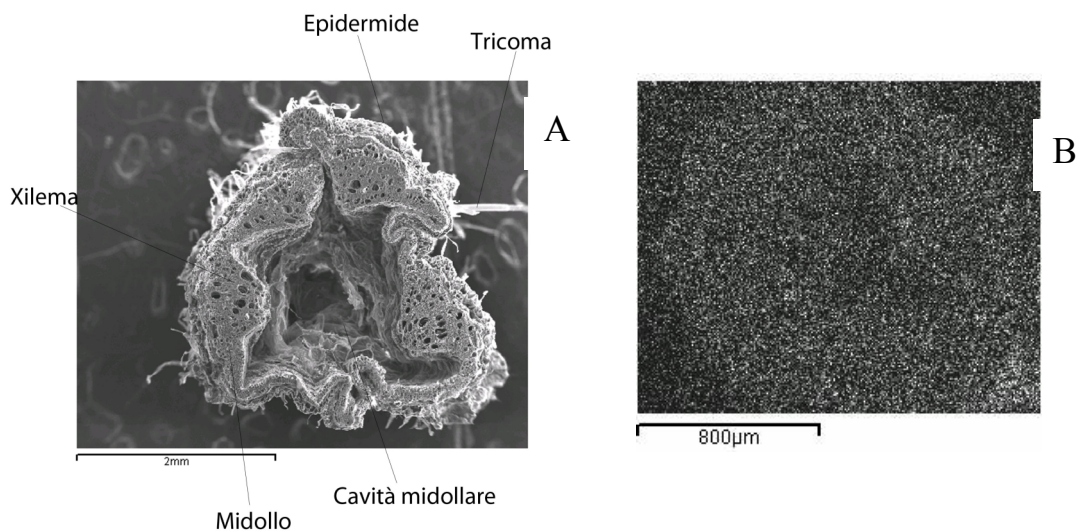


Figura 27- Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Wally Red trattato con arsenico e silicio (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

Analizzando le sezioni di radice e fusto della varietà escludente trattata con arsenico: per la varietà Podium non si osserva presenza di arsenico nei tessuti né delle radici (Figura 28A e

28B) né dei fusti (Figura 29A e 29B), questo indica che tale varietà riesce in qualche modo ad escludere l'arsenico. Per quel che riguarda i trattamenti con arsenico e silicio per la varietà Podium non siamo stati in grado di effettuare campionamenti in quanto, le piantine, sono morte per cause meccaniche prima del campionamento. La varietà Podium risulta essere interessante dal punto di vista agronomico, in quanto potrebbe non accumulare arsenico anche quando cresciute in pieno campo. A tale scopo ci si propone di studiare se la traslocazione dell'arsenico a livello dei frutti, soprattutto per le varietà Podium Frigio e Wally Red, assume un ruolo rilevante.

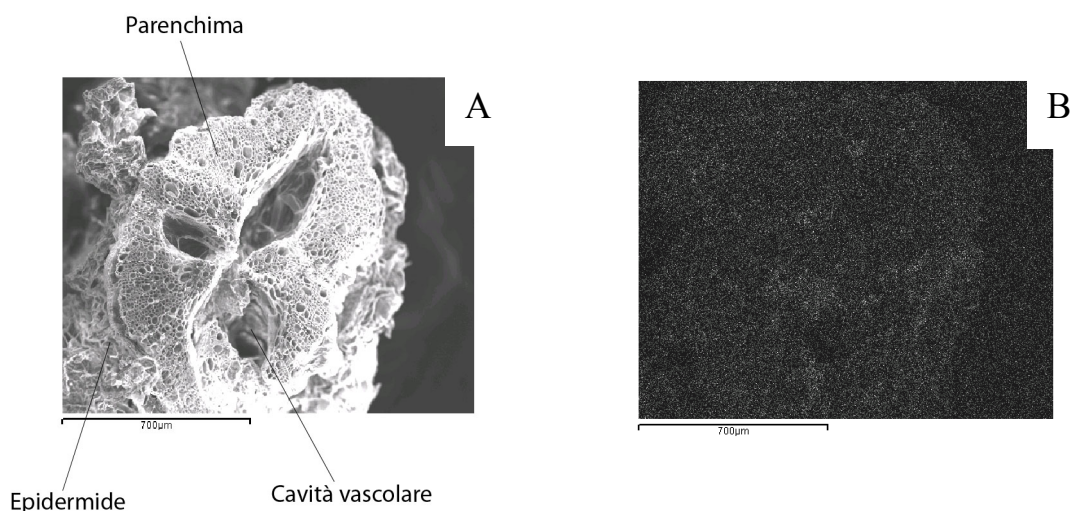


Figura 28- Immagine di una sezione di radice vista al microscopio elettronico di varietà Podium trattato con arsenico(A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti della radice (B)

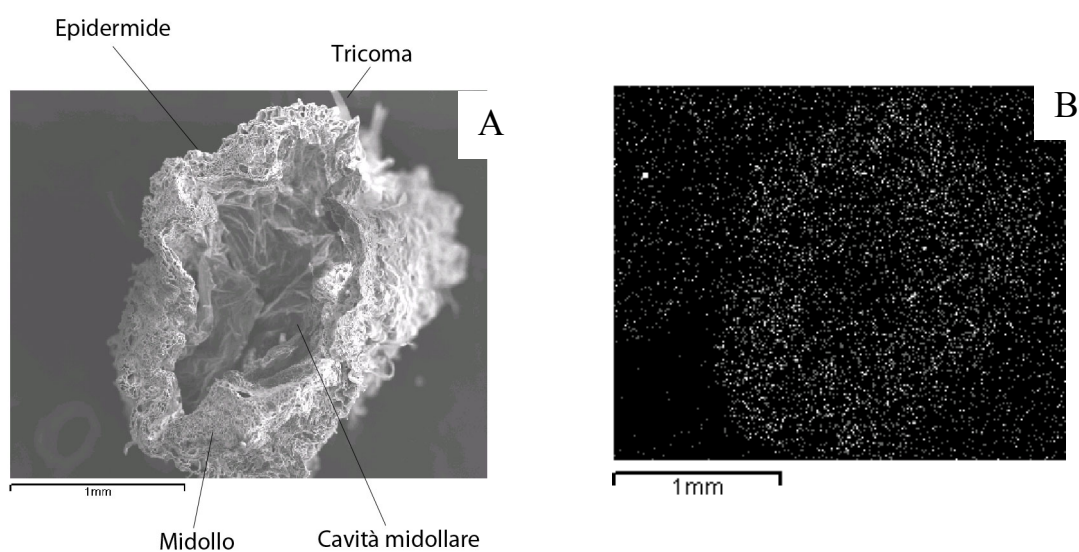


Figura 29- - Immagine di una sezione di fusto vista al microscopio elettronico di varietà Podium trattato con arsenico (A) e distribuzione, nella stessa sezione, dell'arsenico a livello dei tessuti del fusto (B)

Da questi esperimenti è stato possibile individuare alcune varietà con comportamenti interessanti, che tollerano in modo particolare la presenza di arsenico nel terreno, tali varietà risultano avere una fitness particolare adatta alla crescita su terreni contaminati o con arsenico che in alcuni casi viene migliorata se trattate con silicati che diminuiscono lo stress salino.

Prospettive future

Per quel che riguarda il futuro vi è ancora una consistente mole di risultati da ottenere:

- 1) analizzare il materiale vegetale raccolto e essiccato tramite assorbimento atomico;
- 2) confrontare questi dati con quelli semiquantitativi ottenuti al microscopio elettronico SEM/EDX;
- 3) effettuare prove di crescita in terriccio universale con la concentrazione più alta di As(V) e con le medesime concentrazioni di As(III) in modo da integrare i dati ottenuti in precedenza;
- 4) effettuare prove di crescita in vitro, dove l'arsenico non viene complessato dai componenti del terreno, sulle quattro varietà che hanno mostrato un comportamento interessante: Frigio, Podium, Wally Red, Argon e Axel, in modo da confermare le evidenze già ottenute con le prove di crescita in terriccio universale.

Con le varietà che sono risultate di maggiore interesse sia per la crescita in vitro sia in terriccio universale verranno condotti esperimenti in cui si intende analizzare il livello di accumulo di arsenico nei frutti, con e senza la presenza concomitante di silicio nel mezzo di crescita.

CONCLUSIONI FINALI

La sicurezza alimentare è un pre-requisito che interessa da sempre ogni categoria e tipo di alimento, senza nessuna deroga o eccezione. Secondo il regolamento CE n. 178/2002 dal 2005 le aziende devono essere dotate di sistemi atti a consentire la tracciabilità dei beni agroalimentari prodotti e immessi sul mercato. Tale regolamento si pone come obiettivo ultimo la possibilità di localizzare il prodotto in qualsiasi punto della catena di distribuzione e di individuare l'origine della materia prima utilizzata. La continua espansione del mercato dei prodotti agricoli di alto valore economico e nutrizionale, necessita di un insieme di nuove metodologie che possano essere utilizzate per garantirne la qualità e l'autenticità e per permetterne la tracciabilità dal materiale grezzo fino al prodotto finito, per proteggere il consumatore da possibili frodi.

Dalla legislazione e dal continuo aumento della consapevolezza da parte del consumatore si avverte la necessità di tutelare sia le esigenze del consumatore che quelle del produttore, nell'ottica di realizzare prodotti con standard di qualità sempre più elevati.

Il riconoscimento, da parte della Comunità Europea, di alcune varietà di pomodoro IGP e DOP ha reso necessaria l'introduzione di procedure di controllo da parte degli enti certificatori.

Per la tutela del consumatore vengono attualmente utilizzati metodi chimici e organolettici; tali parametri non sono però del tutto efficaci per la determinazione varietale dei prodotti commerciali. La determinazione varietale basata sulle caratteristiche morfologiche, organolettiche e chimiche può, infatti, essere soggetta ad errori dovuti all'influenza dell'ambiente su questi caratteri fenotipici.

Quindi, lo sviluppo di un metodo di estrazione di DNA che possa essere applicato a tutti i prodotti della filiera di produzione del pomodoro e l'utilizzo di marcatori molecolari neutri si rivela l'unica metodologia che consenta un'analisi attendibile. Il DNA infatti rimane neutrale rispetto ai cambiamenti dell'ambiente in cui un individuo è inserito e i marcatori molecolari presentano un'elevata potenziale di discriminazione tra i diversi genotipi.

In ambito di sicurezza alimentare gli esperti EFSA sui contaminanti alimentari (CONTAM) si sono espressi in materia di contaminazione di arsenico della catena alimentare dal momento che questo elemento è presente in natura sia naturalmente sia per fonti antropiche e anche perché gli alimenti sono la maggiore via di contatto tra questo contaminante e l'uomo.

La CONTAM ha determinato che il livello di arsenico all'interno degli alimenti non è solo dipendente dalla concentrazione di arsenico che può essere fornita mediante le acque di irrigazione ma anche dal livello di processamento dell'alimento stesso.

Diversi studi hanno dimostrato che alcune piante utilizzate a scopo alimentare assorbono arsenico presente nel terreno sia in forma organica che in forma inorganica. Tra queste piante anche il pomodoro risulta essere accumulatrice di arsenico, che viene traslocato ai frutti e quindi può entrare nella catena alimentare.

In quest'ottica diventa quindi interessante studiare la cinetica dell'accumulo di arsenico all'interno delle piante di pomodoro in modo da identificare le varietà escludenti o che non traslocano l'arsenico alla parte aerea e ai frutti, tali varietà sarebbero quindi quelle più indicate per la coltivazione in zone contaminate.

Considerando il lavoro svolto per questa tesi di dottorato si può concludere che è stato possibile identificare un metodo di estrazione di DNA applicabile a tutti i prodotti della filiera di produzione del pomodoro partendo dal pomodoro fresco fino ad arrivare ai prodotti più lavorati quali sughi pronti e concentrato. La performance del metodo è stata valutata applicando un approccio statistico matematico definito fuzzy logic, prendendo in considerazione sia parametri analitici quali resa di estrazione e amplificabilità del DNA estratto sia parametri oggettivi come il tempo impiegato ad effettuare l'estrazione e il costo di estrazione.

La determinazione qualitativa delle cultivar di origine dei prodotti a base di pomodoro è stata portata avanti utilizzando marcatori molecolari microsatelliti. In primo luogo è stato necessario effettuare una genotipizzazione di alcune cultivar di pomodoro certificate che permettesse di ottenere un fingerprinting riconoscibile nei prodotti processati.

Utilizzando un approccio matematico sui microsatelliti (PID) è stato possibile determinare quelli che più adatti al riconoscimento varietale all'interno dei prodotti commerciali. L'analisi SSR sui prodotti commerciali dimostra l'applicabilità della tecnica al riconoscimento varietale: è possibile evidenziare una corrispondenza allelica tra i prodotti commerciali e i pomodori freschi.

L'approccio molecolare per l'identificazione varietale di pomodori risulta uno strumento sensibile e pratico da applicare nella vigilanza contro possibili frodi, nel pieno rispetto delle normative nazionali ed europee. Le metodologie sviluppate in questo lavoro consentono inoltre in strumenti oggettivi in grado di affiancarsi o sostituirsi alle attuali procedure

utilizzate in ambito di qualità alimentare i cui risultati potrebbero integrarsi alle informazioni di tracciabilità richieste dalla legislazione europea e dal consumatore.

Per quel che riguarda il comportamento di alcune varietà di pomodoro in presenza di arsenico nel terreno ci siamo focalizzati su due approcci: valutazione dell'effetto sulla germinazione e valutazione dell'effetto sulla pianta adulta.

Le prove di germinazione che sono state effettuate in terreno agarizzato hanno dimostrato che la forma di arsenico inorganico alla concentrazione minore non influenza il livello di germinazione dei semi, aumentando la concentrazione invece si evidenzia che l'arseniato influenza negativamente in modo significativo la germinazione rispetto all'arsenito. Analizzando l'accrescimento dei germogli notiamo come l'arsenito influenzi negativamente e in modo significativo l'allungamento dei germogli rispetto all'arseniato. Da questi esperimenti non è stato possibile identificare varietà con comportamenti peculiari.

Per quel che riguarda la valutazione dell'effetto sulla pianta adulta gli esperimenti sono ancora preliminari, è stata effettuata solo la prova con arseniato alla concentrazione minore e le analisi sul materiale vegetale sono solo semiquantitative. Da tali analisi sono comunque emerse alcune varietà con comportamenti peculiari: esclusori o accumulatori. Indagando più approfonditamente l'uptake delle diverse forme di arsenico inorganico e il comportamento delle varietà prese in esame sarà possibile fornire indicazioni precise ai coltivatori delle zone contaminate da arsenico. Approfondendo lo studio a livello molecolare sarà interessante capire quali sono i meccanismi che regolano le differenze nella cinetica di assorbimento dell'arsenico nelle diverse varietà.

Sigle e abbreviazioni

AFLP: Amplified fragments length polymorphisms

BSA: Bovine serum albumin

CTAB: Esadeciltrimetilammonio bromuro

dNTP: Desossiribonucleotidi trifosfato

DOP: Denominazione di Origine Protetta

DOC: Dnominazione di Origine Controllata

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Acido etilendiamminotetraacetico

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IGP: Indicazione Geografica Protetta

PCR: Polymerase Chain Reaction

PVPP: Polivinilpirrolidone

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RFU: Relative Fluorescence Unit

SCAR: Simple Characterized Amplified Region

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSC: Sodium Chloride Sodium Citrate

SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis

SSLP: Simple Sequence Length Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeats

TAE: Tris Acetato EDTA

TE: Tris EDTA

BIBLIOGRAFIA

SITOGRAFIA

- ~ europa.eu/pol/food
- ~ it.wikipedia.org/wiki/Pomodoro
- ~ solgenomics.net/
- ~ ww2.unime.it/dipfisica/Tesine/MICROSCOPIA_ELETTRONICA.htm
- ~ www.ambientediritto.it
- ~ www.certanet.it/public/documenti/1205.pdf
- ~ www.certanet.it/public/documenti/1277.pdf
- ~ www.coldiretti.it/organismi/INIPA/area%20formazione/cd%20probio/files/07schede_tecniche/07_12_schede_techinche.htm
- ~ www.cpvo.europa.eu
- ~ www.dsa.unipr.it/foodhealth/oliv-track/overview.html
- ~ www.fda.gov/Food/FoodSafety/default.htm
- ~ www.federalimentare.it
- ~ www.fertirrigazione.it/ita_274/
- ~ www.portanapoli.com/Ita/Cucina/ga_pomodoro.html
- ~ www.venetoagricoltura.org
- ~ www.winboot.net

BIBLIOGRAFIA

- ~ “A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)” Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L., Yang H., *Nature* 2002, 296:79-92.
- ~ “A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)” Goff T.A., Ricke D., Lan TH, Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B. M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T.C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T. Tusneem N., Robinson R., Feldhaus G., Macalma T., Oliphant A., Briggs S., *Science* 2002, 296:92-100.
- ~ “A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows’ milk in goats’ milk cheese” Mafra I., Roxo A., Ferreira I.M.P.L.V.O., Beatriz M., Oliveira P.P., *International Dairy Journal* 2004, 17:1132-1138.
- ~ “A genetic linkage map of the human genome” Donis-Keller H., Greena P., Helmsa C., Cartinhora S., Weiffenbach B., Stephens K., Keitha T.P., Bowden D.W., Smitha D.R., Lander E.S., Botstein D., Akotsa G., Redikera K.S., Graviusa T., Browna V.A., Risinga M.B., Parkera C., Powersa J.A., Watta D.E., Kauffmana E.R., Brickera A., Phippsa P., Muller-Kahlea H., Fultona T.R., Nga S., Schumma J.W., Bramana

- J.C., Knowlton R.G., Barkera D.F., Crooksa S.M., Lincoln S.E., Dalyb M.J., Abrahamsonb J., *Cell* 1987, 87:158-159.
- ~ “*A metabolomic approach to the evaluation of the origin of extra virgin olive oil: a convenient statistical treatment of mass spectrometric analytical data*” Cavaliere, B., De Nino, A., Hayet, F., Lazez, A., Macchione, B., Moncef, C., Perri, E., Sindona, G., & Tagarelli, A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55:1454-1462.
- ~ “*A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop-out*” Björklund M., *Molecular Ecology Notes* 2005, 3:676-679.
- ~ “*A novel method for species identification in milk and milk-based products*” Reale S., Campanella A., Merigioli A., Pilla F., *Journal of Dairy Reserch* 2008, 75:107-112.
- ~ “*A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of hazelnuts in food*” L. Piknová, D. Pangallo, T. Kuchta, *European Food Reserch and Technology* 2007, 226:1438-2377.
- ~ “*A PNA-array platform for the detection of hidden allergens in foodstuffs*” Rossi S., Scaravelli E., Gremini A., Corradini R., Fogher C., Marchelli A., *European Food Reserch and Technology* 2006, 223:1-6.
- ~ “*A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extract is determined as human collagen type I*” Scholz M., *Analitical Biochemistry* 1998, 259:283-286.
- ~ “*A procedure for Olive Oil Traceability and Authenticity: DNA extraction, Multiplex PCR and LDR-Universal Array Analysis*” Consolandi C., Palmieri L., Severgnini M., Maestri E., Marmiroli N., Baldoni L., Donini P., De Bellis G., Castiglioni B., *European Food Research and Technology* DOI 10.1007/s00217-(2008) 008-0863-5.
- ~ “*A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat barley or rye in gluten-free food for coeliac patients*” Dahinden I., Büren M., Lüthy J., *European Food Reserch and Technology* 2001, 212:228-233.
- ~ “*A review of arsenicals in biology*” Coddington K., *Toxicological and Environmental Chemistery* 1986, 11:281-290.

- ~ “*A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters*” Smadley, P.L., Kinniburgh, D.G., *Applied Geochemistry* 2002, 17:517-568.
- ~ “*A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (Oryza sativa L.)*” Jin Q., Waters D., Cordeiro G.M., Henry R.J., Reinke R.F., *Plant Science* 2003, 165:395-364.
- ~ “*Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals*” Baker A.J.M., *Journal of Plant Nutrition* 1981, 3:643-654.
- ~ “*Advanced PCR techniques in identifying food components*” Marmiroli N., Peano C., Maestri E., In: Lees M (ed.) *Food authenticity and traceability*, Woodhead Publishing 2003, 3-33.
- ~ “*AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*” Vos P.R., Hogers M., Bleeker M., Reijans T., Van de Lee M., Hornes A., Frijters J., Pot J., Peleman M., Kuiper and Zabeau M., *Nucleic Acid Reserch* 1995, 23:4407-4414.
- ~ “*An Indicator of Solar Radiation Model Performance based on a Fuzzy Expert System*” Bellocchi G., Acutis M., Fila G., Donatelli M., *Agronomy Journal* 2002, 94:1222-1233.
- ~ “*An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine-caseins.*” Richter W., Krause I., Graf C., Sperrer I., Schwarzer C., Klostermeyer H., *Journal Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 1999, 204:21-26.
- ~ “*An introduction to peptide nucleic acid*” Nielsen P.E., Egholm M., *Current Issues in Molecular Biology* 1999, 1:89-104.
- ~ “*An investigation of arsenate end arsenito bonding structures on goethite by FTIR*” Sun X., Doner H.E., *Soil Science* 1996, 161:865-872.
- ~ “*Ancient DNA: Do it right or not at all*” Cooper A., Poinar H.N., *Science* 2000, 289:1139.

- ~ “*Applicability of SCAR markers to Food Genomics: olive oil traceability*” Pafundo S., Agrimonti C., Maestri E., Marmiroli N., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55:6052-6059.
- ~ “*Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow*” Bania J., Ugorski M., Polanowski A., Adamczyk E., *Journal of Dairy Reserch* 2001, 68:333-336.
- ~ “*Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk*” López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández PE., García T., Martín R., *Journal of Dairy Science* 2005, 9:3115-31120.
- ~ “*Application of Relative Quantification TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction Technology for the Identification and Quantification of Thunnus alalunga and Thunnus albacares*” Lopez I., Pardo M.A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53:4554-4560.
- ~ “*Application of SSR markers to the traceability of monovarietal oils*” Vietina M., Agrimonti C., Bonas U., Marmiroli N., Submitted.
- ~ “*Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics*” Rafalski A., *Current Opinion in Plant Biology* 2002, 5:94-100.
- ~ “*Arsenic (III) and Arsenic (V) Adsorption on Three California Soils*” Manning, B.A., Goldberg, S., *Soil Science* 1997, 162:123-128.
- ~ “*Arsenic adsorption by soil and iron-coated sand: kinetics and reversibility*” Lombi E., Wenzel W.W., Sletten R., *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 1999, 162:451-456.
- ~ “*Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soils standards*” Wenzel, W.W., Brandstetter, A., Wutte, H., Lombi, E., Prohaska, T., Stingeder, G., Adriano, D.C., *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 2002, 165:221-228.
- ~ “*Arsenic Phytotoxicity and Interactions in Bushbean Plants Grown in solution culture*” Fallace A., Mueller R.T. Wood R.A., *Journal of plant nutrition* 1980, 2:111-114.

- ~ “*Arsenic round the world: a review*” Mandal B.K., Suzuki K.T., *Talanta* 2002 58:201-235.
- ~ “*Arsenic Speciation in Environment*” Cullen W.R., Reimer K.J. *Chemical Reviews* 1989, 89:713-764.
- ~ “*Arsenic Species: effects on and Accumulation by tomato plants*” Burlò F., Guiarro A.A., Carbonell-Barrachina D., Valero D., Martinez-Sanchez F., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47:1247-1253.
- ~ “*Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation*” Fitz W.J., Wenzel W.W, *Biotechnology* 2002, 99:259-278.
- ~ “*Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants – effect of arsenite on plant growth and yield*” Barrachina A.C., Carbonell F.B., Beneyto J.M., *Journal of plant nutrition* 1995, 18:1237-1250.
- ~ “*Arsenic, antimony, and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England*” Li X., Thornton I., *Environmental Geochemistry and Health* 1993, 15:135-144.
- ~ “*Arsenic, molybdenum, selenium, and tungsten contents of fertilizers and phosphate rocks*” Charter R.A., Tabatabai M.A., Schafer J.W., *Communication in Soils Science and Plant Analysis* 1995, 26:3051-3062.
- ~ “*Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: Kinetics, equilibrium, and adsorption envelopes*” Raven K., Jain A., Loppert R.H., *Environmental and Science Technology* 1998, 32:344-349.
- ~ “*Characterization of picogreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation*” Singer V.L., Jones L.J., Yue S.T. , Haugland R.P., *Analytical Biochemistry*. 1997, 249:228-238.
- ~ “*Circolare Ministeriale n. 8 del Ministero della Sanità,*” 16.4.1996 *Gazzetta Ufficiale* n.102, 1996 pag. 53.

- ~ “Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples” Di Bernardo G., Del Gaudio S., Galderisi U., Cascino A., Cipollaro M., *Biotechnology Progress* 2007, 23:297-301.
- ~ “Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications” Breton C., Claux D., Metton I., Skorski G., Bervillé A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52:531-537.
- ~ “Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars” Ayed, R.D., Grati-Kamoun, N., Moreau, F., Rebaï, A., *European Food Research and Technology* 2009, 229:757-762.
- ~ “Comparison of different methods to produce single-strand DNA for identification of canned tuna by single-strand conformation polymorphism analysis” Rehbein H., Mackie IM., Pryde S., Gonzales-Sotelo C., Perez-Martin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M., *Journal of Electrophoresis* 1998, 19:1381-1384.
- ~ “Computational gene finding in plants” Pertea, M. and Salzberg, S.L. ,*Plants Molecular Biology*, 2002, 48:39-48.
- ~ “Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms” Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., *The American Journal of Human Genetics* 1980, 32:314-331.
- ~ “D.M. 23 settembre 2005. Definizione di passata di pomodoro” *Gazzetta Uffufficiale* del 5 ottobre 2005, 232 p.30-31.
- ~ “Decreto Legislativo 27 gennaio 1992 n. 109. Attuazione della direttiva 89/938/CEE concernente i prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare.” *Gazzetta Ufficiale* n. 39, 1992, p 61-66.
- ~ “Decreto Legislativo 27 gennaio 1992 n. 109. Attuazione delle direttive 89/395/CEE e 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari.” *Gazzetta Ufficiale* n. 39, 1992, p 43-56.

- ~ “Decreto Legislativo 29 maggio 1991 n. 178. Recepimento delle direttive comunitarie in materia di specialità medicinali”, Gazzetta Ufficiale n. 139, 1991.
- ~ “Detection and quantification of bovine ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins” Ferreira I.M., Caçote H., Journal of Chromatogr A, 2003, 1015:111-118.
- ~ “Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats” Haza Ana I., Morales P., Martín R., García T., Anguita G., Sanz B., Hernández P.E., Journal of the Science of Food and Agriculture 1999, 79:1043-1047
- ~ “Detection of adulteration of Basmati rice with non-premium long-grain rice” Bligh H.F.J., International Journal of Food Science & Technology 2000, 35:257-265.
- ~ “Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism” Maudet C., Taberlet P., Journal of Dairy Reserch 2001, 68:229-235.
- ~ “Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism” Maudet C., Taberlet P., Journal of Dairy Reserch 2001, 68:229-235.
- ~ “Detection of genetic variability in stygobitic isopods using RAPD markers” Baratti M., Bazzicalupo M., De Filippo C., Messina G., BRILL 1999.
- ~ “Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction” Hupfer C., Hotzel H., Sachse K., Engel K.-H., Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung, A 1998, 206:203-207.
- ~ “Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction” Hird H., Lloyd J., Goodier R., Brown J., Reece P., European Food Reserch and Technology 2003, 217:265-268.
- ~ “Detection of pig derivatives in food products for halal authentication by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism” Aida Azmi A., Man Yaakob B., Che R., Abdul R., Son R., Journal of the Science of Food and Agriculture 2007, 87:569-572.
- ~ “Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction” Meyer R, Candrian U, Lüthy J., The Journal of AOAC International 1994, 77:617-622.

- ~ “*Detection of potentially allergenic hazelnut (Corylus avellana) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA*” Holzhauser T., Stephan O., Vieths S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50:5808-5815.
- ~ “*Developing Basmati rices with high yield potential*” Kush G.S., de la Cruz N., *Abstracts of the 1997 International Symposium on Rice Quality*, Nottingham, UK.
- ~ “*Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among Lycopersicon esculentum cultivars*” He C., Poysa V., Yu K., *Theoretical and Applied Genetics* 2003, 6:363-373.
- ~ “*Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products*” Hold GL., Russell VJ., Pryde SE., Rehbein H., Quinteiro J., Vidal R., Rey-Mendez M., Sotelo C.G., Pérez-Martin R.I., Santos A.T., Rosa C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49:1175-1179.
- ~ “*Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products*” Hold G.L, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49:1175-1179.
- ~ “*Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products*” Hold G.L., Russell V.J., Pryde S.E., Rehbein H., Quinteiro J., Vidal R., Rey-Mendez M., Sotelo C.G., Pérez-Martin R.I., Santos A.T., Rosa C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49:1175-1179.
- ~ “*Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to Mytilus Perna Aulacomya and other genera*” Santaclara F.J., Espiñeira M., Cabado A.G., Aldasoro A., Gonzalez-Lavín N., Vieites J.M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54:8461-8470.
- ~ “*Development of a Real-Time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (Arachis hypogea) in processed foods*” Stephan O., Vieths S., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52:3754-3760.
- ~ “*Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice*” Naqvi N.I., Chatto B.B., *Genome* 1996, 39:26-30.

- ~ “*Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acids and triacylglycerol composition chemometrics*” Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J.P., & Guèrère, M., *Food Chemistry* 2006, 97:382-393.
- ~ “*Direttiva 2003/89/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 10 novembre 2003, che modifica la direttiva 2000/13/CE per quanto riguarda l'indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari*” *Gazzetta ufficiale* 25/11/2003, 308 p. 15-18.
- ~ “*Direttiva del Consiglio 89/398/CEE relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti i prodotti alimentari destinati ad una alimentazione particolare*” *Gazzetta Ufficiale Comunità Europea*, 1989.
- ~ “*Disciplinare di produzione integrata pomodoro da industria anno2008*” Revisione 8 del 26/02/08.
- ~ “*Disciplinare per la produzione di prodotti cmentieri “no OGM” per pomodoro*” R. Bravi – ENSE – Sezione Battipaglia.
- ~ “*Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers*” Görg R., Schachtschabel U., Ritter E., Salamini F., Gebhardt C., *Crop Science* 1992, 32:815-819.
- ~ “*Diversity in conserved genes in tomato*” Van Deynze A., Stoffel K., Buell C.R., Kozik A., Liu J., van der Knaap E., Francis D., *BMC Genomics* 2007, 8:465-478.
- ~ “*Diversity in conserved genes in tomato*”, Allen E Van Deynze, Kevin Stoffel, Robin C Buell, Alexander Kozik, Jia Liu, Esther van der Knaap, David Francio, *BMC Genomics* 2007, 8:465.
- ~ “*DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar*” Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorni C., Cattapan F., Fogher C., *Food Chemistry* 2003, 83:127-134.
- ~ “*DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar*” Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorni C., Cattapan F., Fogher C., *Food Chemistry*, 2003, 83:127-134.

- ~ “DNA markers for Portuguese olive oil fingerprinting” Martins-Lopes, P., Gomes, S., Santos, E., & Guedes-Pinto, H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56:11786-11791.
- ~ “DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Williams” J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V., *Nucleic Acid Reserch* 1990, 18:6531-6535.
- ~ “DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties” Terzi V., Morcia C., Gorrini A., Stanca M., Shewryb P.R. and Faccioli P., *Journal of Cereal Science* 2005, 41:213-220.
- ~ “Effect of Residence Time, and Surface Coverage on the Desorption of Arsenate by Phosphate from Metal Oxides” Pigna M., Krishnamurti G.S.R., Violante A., *Soil Science Society American Journal* 2006, 70:2017-2027
- ~ “Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of protected designation of origin extra virgin olive oil” Pasqualone A., Montemurro C., Summo C., Sabetta W., Caponio F., Blanco A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55:463-474.
- ~ “Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of protected designation of origin of extra virgin olive oil” Pasqualone, A., Montemurro, C., Summo, C., Sabetta, W., Caponio, F., & Blanco, A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55:3857-3862.
- ~ “Einfluss verfarhrehstechnischer parameter auf den analytischen nachweis gentechnischen veränderter zutaten in backwaren” Moser M., Kniel J., Schmitz-Winnenthal C., Hupfer K., Engel H., *Getreide Mehl und Brot* 1999, 53:334-341.
- ~ “Element concentrations toxic to plants, animals and man” Gough L.P., Shacklette H.T., Case A.A., *US Geological Survey Bull* 1979, 80.
- ~ “Environmental Chemistry of Arsenic” Frenkeberg W.T., Marcel Dekker, New York 2002, p. 391.

- ~ “*estimating the probability of identity among genotypes in natural population: cautions and guidelines*” Waits P.L., Luikart G., Taberlet P., *Molecular Ecology* 2001, 10:249-256.
- ~ “*Estrazione di DNA genomico da differenti fonti tissutali animali per la costituzione di una banca del genoma della razza chinita*” Lasagna E., Sarti F., Sorbolini S., De Martino F., Panella F., 4th World Italian Beef Cattle Congress, Italy, 2005.
- ~ “*European Journal of Lipid Science & Technology*” Wahrburg, U., Kratz, M., Cullen, P. Mediterranean diet olive oil and health, 2002, 104:698-705.
- ~ “*Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples*” López-Andreo M., Garrido-Pertierra A., Puyet A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54:7973-7978.
- ~ “*Expanding horizons in the validation of GMO analytical methods: fuzzy-based expert systems*”, Bellocchi G., Acutis M., Paoletti C., Confalonieri R., Trevisiol P., Graziali E., Delobel C., Savini C., Mazzara M., Van den Eede G., *Food Analytical Methods* 2008, 1:126-135.
- ~ “*Expectancy, Attention, and Time*” Barnes R., Jones M.R., *Cognitive Psychology* 2000, 41:254-311.
- ~ “*Explosives with Lined Cavities*” Birkhoff G., MacDougall D.P., Pugh E.M., and Taylor G., *Journal of Applied Physics* 1948, 19:563-570.
- ~ “*Extraction and amplification of DNA from 55 foodstuffs*” Pauli U., Liniger M., Zimmermann A., Schrott M., *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 2000, 91:491-501.
- ~ “*Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*” Welsh J., McClelland M., *Nucleic Acid Research* 1990, 18:7213-7218.
- ~ “*Fish Species Identification Using PCR–RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis: Application to Detect White Fish Species in Food Products and an Interlaboratory Study*” Dooley J.J., Helen D., Sage Marie-Anne L., Clarke Helen M., Stephen D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53:3348–3357.

- ~ “*Food and forensic molecular identification: update and challenger*” Teletchea F., Maudet C., Hänni C. Trends in Biotechnology 2005, 23:359-66.
- ~ “*Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*” Woolfe M. and Primrose S., TRENDS in biotechnology 2004, 22:222-226.
- ~ “*Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*” Woolfe M., Primrose S., Trends in Biotechnology 2004, 22:222-226.
- ~ “*Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*” Woolfe M., Promise W., Trends in biotechnology 2004, 22:123-127.
- ~ “*Foods derived from genetically modified organisms and detection methods*” Hemmer, W., BATS report 2/97, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss Science Foundation, Basel, Switzerland 2002.
- ~ “*Foods derived from genetically modified organisms and detection methods*” Hemmer W., BATS report 2/97, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland 2008.
- ~ “*Fuzzy composite programming to combine remote sensing and crop models for decision support in precision crop management*” Jones D., Barnes E.M., Agricultural Systems 2000, 65:137-158.
- ~ “*Fuzzy sets*” Zadeh L.A., information and Control 1965, 8:338-353.
- ~ “*Generating and using DNA markers in plants in: Biren B. Lai E. (Eds.) Nonmammalian genomic analysis.*” Rafalski J.A., Vogel J.M., Morgante M., Powell W., Andre C., Tingey S.V., A practical guide Academic Press San Diego 1996, pp.75-134.
- ~ “*Genetic analyses from ancient DNA*” Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Deprés V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M., Annual Review of Genetics 2004, 38:645-679.

- ~ “Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis” Demeke T., Lynch D. R. , Kawchuk L. M. , Kozub G. C., Armstrong J. D., Plant Cell Reports 1996, 15:662-667.
- ~ “Genomics, gene expression and DNA arrays” Lockhart, D.J. and Winzeler, E.A., Nature, 2000, 405:827-836.
- ~ “Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR” Chiapparono E., Lee D., Donini P., Genome 2004, 47:414-420.
- ~ “Geographical origin and composition of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra” Galtier, O., Dupuy, N., Le Dréau, Y., Ollivier, D., Pinatel, C., Kister, J., & Artaud, J., Analytica Chimica Acta 2007, 595:136-144.
- ~ “High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp” Bergervoet J.H.W., Verhoeven H.A., Gilissen L.J.W., Bino R.J., Plant Science 1996, 116:141-145.
- ~ “Human Health effects of domestic combustion of coal in rural China: a causal factor for arsenic and fluorine poisoning” Belkin H. E., Zheng B., Finkelman R.B., In: 2nd World Chinese Conference of Geological Sciences, Extended Abstract, August 2000, Stanford University, p.522-524.
- ~ “Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction” López-Andreo M., Lugo L., Garrido-Pertierra A., Prieto M.I., Puyet A., Analytical Biochemistry 2005, 339:73-82.
- ~ “Identification of Nile perch (*Lates niloticus*) grouper (*Epinephelus guaza*) and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene” Asensio L., González I., Fernández A., Céspedes A., Rodríguez M.A., Hernández P.E., García T., Martín R., The Journal of AOAC International 2001, 84:777-781.
- ~ “Identification of plant food raw material by RAPD-PCR: legumes” Weder JK., Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002, 50:4456-4463.

- ~ “*Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification*” Che Man Y.B., Aida A.A., Raha A.R., Son R., *Food Control* 2007, 18:885-889.
- ~ “*Identification of potato varieties by DNA profiling*” Corbett G., Lee D., Donini P., Cooke R.J., *Acta Horticulturae* 2001, 546:387-390.
- ~ “*Identification of shrimp species in raw and processed food products by means of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method targeted to cytochrome b mitochondrial sequences*” Pascoal A., Barros-Velázquez J., Cepeda A., Gallardo J.M., Calo-Mata P., *Journal of Electrophoresis* 2008, 15:3220-3228.
- ~ “*Identification of sole (Solea solea) and Greenland halibut (Reinhardtius hippoglossoides) by PCR amplification of the 5S rDNA gene*” Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Fernández A., Hernández P.E., Martín R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47:1046-1050.
- ~ “*Identification of the clam species Ruditapes decussatus (Grooved carpet shell) Venerupis pullastra (Pullet carpet shell) and Ruditapes philippinarum (Japanese carpet shell) by PCR-RFLP*” Fernández A., García T., Asensio L., Rodríguez M.A., González I., Céspedes A., Hernández P.E., Martín R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48:3336-3341.
- ~ “*Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes*” Hunt D.J., Parkers H.C., Lumley I.D., *Food Chemistry* 1997, 60:437-442.
- ~ “*Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes*” Hunt D.J., Parkes H.C., Lumley I.D., *Food Chemistry* 1997, 60:437-442.
- ~ “*Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites*” Pasqualone A., Montemurro C., Caponio F., Blanco A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52:1068-1071.
- ~ “*Implementation of physicochemical and sensory analysis in conjunction with multivariate analysis towards assessing olive oil authentication/adulteration*” Arvanitoyannis, I.S., & Vlachos, A., *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 2007, 47:441-498.

- ~ “*Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (Arachis Hypogaea L.) protein in complex food matrices*” Holzhauser T, Vieths S *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47:603-611.
- ~ “*Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations*” Clark A.G., *Molecular Biology and Evolution* 1990, 7:111-122.
- ~ “*Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*” Wilson I.G., *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63:3741-375.
- ~ “*Introduction of quantitative genetics*” Falconer D.S. and MacKay T. F. C., 1996.
- ~ “*Investigation Report CET/LHIR148: The environmental chemistry and fate of arsenical pesticides in cattle tick dip sites and banana plantations*” Vaughan G.T., CSIRO, Division of Coal and Energy Technology, Centre for Advances Analytical Chemistry, Sydney, Australia 1993.
- ~ “*Is the effect of silicon on rice uptake of arsenate (AsV) related to internal silicon concentration, iron plaque and phosphate nutrition?*” Guo W., Zhu Y.G., Liang Y.C., Geng C.N., Wang S.G., *Environmental Pollution* 2007, 251-257.
- ~ “*Kinetics and mechanisms of chemical reactions at the soil mineral/water interface*” Sparks D.L., *Soil Physical Chemistry* 1999, p.135-191.
- ~ “*Kinetics and mechanisms of molybdate adsorption/desorption at the goethite/water interface using pressure-jump relaxation*” Zhang P.C., Sparks D.L., *Soil Society of American Journal* 1989, 53:1028-1034.
- ~ “*Manuale di statistica per la ricerca e la professione*”, Lamberto Sogliani con la partecipazione di Franco Sartore e Enzo Siri, Edizione Aprile 2005.
- ~ “*Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in Pteris vittata. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation*” Wang J.R., Zhao W., Meharg A.A., Raab A., Feldmann J., McGrath S.P., *Plant Physiology* 2002, 130:1552-1561.

- ~ “*Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction*” Laube I.A., Spiegelberg A., Butschke J., Zagon M., Schauzu L., Kroh H., Broll I., International Journal of Food Science and Technology 2003, 38:111-118.
- ~ “*Methods to improve the yield and quality of DNA from dried and processed figs*” Di Bernardo G., Galderisi U., Cipollaro M., Cascino A., Biotechnology Progress 2005, 21:546-549.
- ~ “*Microsatellite genotyping errors: detection approaches common sources and consequences for paternal exclusion*” Hoffman J.I., Amos W., Molecular Ecology 2005, 14: 599-612.
- ~ “*Microsatellite marker to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils*” Alba, V., Sabetta, W., Blanco, A., Pasqualone, A., & Montemurro, C., European Food Research and Technology 2009, 229:375-382.
- ~ “*Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic chromatographic and PCR techniques*” Mayer H.K., International Dairy Journal 2005, 15:595-604.
- ~ “*Mitigation of Arsenic Accumulation in rice with water management and silicon fertilization*” Li R.Y., Stroud J.L., Ma J.F., McGrath S.P., Zhao F.J., Environmental Science and Technology 2009, 43:3778-3783.
- ~ “*Mitochondrial DNA variation in Pacific capelin (*Mallotus villosus catervarius*) from the Sea of Okhotsk inferred from PCR-RFLP analysis*” Skurikhina L.A., Oleĭnik A.G., Kovpak N.E., Russian Journal of Genetics 2008, 44:929-937.
- ~ “*Molecular traceability of olive loil: from plant genomics to food genomics*” Marmiroli N., Maestri E., Pafundo S., Vietina M., Transworld Research Network 2009, ISBN: 978-81-7895-388-5
- ~ “*Monitor alimentare DOXA*” - IV EDIZIONE, 2002.
- ~ “*Multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows’ goats’ and sheep's milk in dairy products*” Bottero M.T., Civera T.D., Nucera S., Rosati P., Sacchi R.M., Turia A., International Dairy Journal 2003, 13:277-282.

- ~ “Nucleic acid and protein elimination during the sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets” Klein, J., Altenbuchner, J., Mattes, R. *Journal of Biotechnology* 1998, 60:145-153.
- ~ “Optimal use of the fluorescent picoGreen dye for quantitative analysis of amplified polymerase chain reaction products on microplate” Romppanen E.L., Savolainen K., Mononen, I., *Analytical Biochemistry* 2000, 279:111-114.
- ~ “Ordre des isopodes (*Épicarides exclus*)” Roman M.L., Dalens H., (Isopoda Latreille, 1817) (1999). In: Forest J. (Ed.) *Crustacés Péracarides* [Grassé P.-P. (Series Ed), *Traité de Zoologie*, Tome VII. Fascicule IIIA, Mémoires de l'Institut Océanographique, Monaco, 19], Chapt. 7, p. 177-278.
- ~ “PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*) pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region” Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martínez M., Rojasa T., García P., Hernández P. E. and Martínez R., *Meat Science* 2007, 76:644-652.
- ~ “PCR technique for identification of mussel species” Rego I., Martínez A., González-Tizón A., Vieites J., Leira F., Méndez J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50:1780-1784.
- ~ “PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification” Wolf C., Rentsch J., Hübner P., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47:1350-1355.
- ~ “Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides” McGrath S.W., Zhao F.J., Lombi E., *Advanced Agronomy* 2002, 75:1-56.
- ~ “Polymerase chain reaction coupled with peptide nucleic acid high-performance liquid chromatography for the sensitive detection of traces of potentially allergenic hazelnut in foodstuffs” Germini A., Scaravelli E., Lesignoli F., Sforza S., Corradini R., Marchelli R., *European Food Research and Technology* 2005, 220:619-624.
- ~ “Polymerase Chain Reaction Techniques for Food Allergen Detection” Poms R.E., Anklam E., Kuhn M., *The Journal of AOAC International* 2004, 87:1391-1397.

- ~ “*Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food*” Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U., *The Journal of AOAC International* 1995, 78:1542-1551.
- ~ “*Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a short fragment of the cytochrome b gene for identification of flatfish species*” Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Sanz B., Hernández P.E., Martín R., *Journal of Food Protection* 12:1684-1685.
- ~ “*Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment for authentication of four clam species*” Fernández A., García T., Gonzalez I., Asensio L., Rodriguez M.A., Hernández P.E., Martin R., *Journal of Food Protection* 2002, 65:692-695.
- ~ “*Posizioni dell’industria Alimentare Italiana*” Federazione Italiana dell’Industria Alimentare Federalimentare, 2004.
- ~ “*Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuff with four different extraction methods*” Peano C., Samson M.C., Palmieri L., Gulli M., Marmiroli N., *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2004, 52:6962-6968.
- ~ “*Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: Anopheles)*” Wilkerson R.C., Parsons T.J., Albright D.G., Klein T.A., Braun M.J., *Insect Molecular Biology* 1993;1:205-211.
- ~ “*Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods*” Sandberg M., Lundberg L., Fermi M. and Malmheden Yman I., *European Food Reserch and Technology* 2003, 217: 344-349.
- ~ “*Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples*” Lopparelli RM., Cardazzo B., Balzan S., Giaccone V., Novelli E., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55:3429-3434.

- ~ “*Recovery 444 and characterization of DNA from olive oil*” Muzzalupo, I., & Perri, E., European Food Research and Technology 2002, 214-528- 531.
- ~ “*Regolamento (CE) N. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano*” Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea 30/04/2004, 139 p.206-320.
- ~ “*Regolamento (CE) N. 178/2002 del parlamento europeo e del consiglio del 28 gennaio2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*” Gazzetta Ufficiale 01/02/2002 L.31/1.
- ~ “*Regolamento (CE) N. 2065/2001 della commissione del 21 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura*” Gazzetta Uffuciale 23/01/2001, 278 p. 6-12.
- ~ “*Regolamento (CE) N. 2100/94 del Consiglio del 27 luglio 1994 concernente la privativa comunitaria per ritrovati vegetali*” Gazzetta Ufficiale 01 settembre 1994, 277 p. 1-30.
- ~ “*Regolamento (CE) n. 2200/96 del Consiglio del 28 ottobre 1996 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore degli ortofrutticoli*” Gazzetta Ufficiale del 21 novembre 1996, 297 p. 1-32.
- ~ “*Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari*” Ufficiale della Comunità Europea 25/06/2004, 226 p.3-21.
- ~ “*Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale*” Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea 25/06/2004, 226 p.22-82.
- ~ “*Regolamento (CE) N.104/2000 del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e del'acquacoltura*” Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea 21/01/2000, 17 p.22-52.

- ~ “Regolamento (CEE) N. 1764/86 della Commissione del 27 maggio 1986 che stabilisce i requisiti qualitativi minimi per i prodotti trasformati a base di pomodori nel quadro del regime di aiuti alla produzione” Gazzetta Ufficiale del 7 giugno 1986, 173 p. 1-24.
- ~ “Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR” Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J., *Nucleic Acids Reserch* 1996, 24:3189-3194.
- ~ “Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Lupine Residues in Foods.” Kaw C.H., Hefle S.L., Taylor S.L., *Journal of Food Science* 2008, 73:135-140.
- ~ “Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations” Veloso A.C., Teixeira N., Ferreira I.M., *Journal of Chromatogr A*, 2002, 967:209-218.
- ~ “Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status”, Mercedes R. Romero-Arand, Oliva Juradoa and Jesús Cuartero; *Journal of Plant Physiology* 2006, 163:847-855.
- ~ “Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques” Plath A., Krause I., Einspanier R., *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 1997, 205:437-441.
- ~ “Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese” Branciari R., Nijman I.J., Plas M.E., Di Antonio E., Lenstra J.A., *Journal of Food Protection* 2000, 63:408-411.
- ~ “Species-specific PCR for the identification of ovine porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM)” Lahiff S., Glennon M. O., Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M., Shilton N., *Molecular and Cellular Probes* 2001, 15:27-35.
- ~ “Storage-time effects on olive oil DNA assessed by Amplified Length Polymorphisms” Pafundo S., Busconi M., Agrimonti C., Fogher C., Marmiroli N., Submitted.
- ~ “Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping and cloning” Magnuson V.L., Ally D.S., Nylund

- S,J., Karanjawala Z.E., Rayman J.B., Knapp J.I., Lowe A.L., Ghosh S., Collins F.S., BioTechniques 1996, 21:700-709.
- ~ “*Systematic Spatial Analysis of Gene Expression during Wheat Caryopsis Development*” Sinéad Drea, David J. Leader, Ben C. Arnold, Peter Shaw, Liam Dolan and John H. Doonan, The plant cell 2005, 17:2172-2185.
- ~ “*Technical note: detection of chicken turkey duck and giise tissue in feedstuff using species-specific polymerase chian reaction*” Martín I., García T., Fajardo V., López-Calleja I., Rojas M., Pavón M.A., Hernández P.E., González I., Martín R., Journal of Animal Science 2007, 85:452-458.
- ~ “*Tecnologie agrarie*”, Giuseppe Sicheri , HOEPLI 2003.
- ~ “*The biochemical action of arsenic acids especially as phosphate analogues*” Dixon H.B.F., Advances in Inorganic Chemistry 1997, 44:191-227.
- ~ “*The Chemical Analisys Of Argonne Premium Coal Samples*” Palmer C.A., Klizas S.A., US Geological Survey Bull 2144, US Geological Survey, Reston, USA 1997.
- ~ “*The current state of utilization of fly ash in Australia*” Beretka J., Nelson P., In Ash-A Valuable Resource 1, South African Coal Ash Association, 1994, p.51-63.
- ~ “*The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR*” Murray V., Monchawin C., England P.R., Nucleic Acids Reserch 1993, 21:2395-2398.
- ~ “*The effect of processing parameters on DNA degradation in food*” Bauer T., Weller P., Hammes W.P., Hertel C., European Food Research Technology 2003, 217:338–343.
- ~ “*The effect of processing parameters on DNA degradation in food*” Bauer T., Weller P., Hammes W.P., Hertel C., European Food Research Technology 2003, 217:338-343.
- ~ “*The Elemental constituents of soil*” Ure A., Berrow M., Chapter 3. In: Bowen, H.J.M. (Ed), Environmental Chemistry. Royal Society of Chemistry, London 1982, p.94-203.
- ~ “*The essence of SNPs*” Brookes A.J., Gene 234:177-186.

- ~ *“The influence of arsenic concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants”*
Carbonell-Barrachina A.A, Burlo F., Burgos-Hernandez A., Lopez E., Mataix J.,
*Scientia Horticulturae*1997, 71:167-176.
- ~ *“The response of tomato “Lycopersicon Esculentum” to different concentration of inorganic and organic compounds of arsenic”* Tulstos P., Szakova J., Pavlikova D., Balik J., *VERSITA biologia*, Bratislava 2006, 61:91-96.
- ~ *“Tissue Concentrations of Potentially Toxic Elemento”* Macnicol R.D., Beckett P.H.T.,
Plant Soil 1983, 4:85-107.
- ~ *“Trace Elements in Biochemistry”* Bowen H.J.M. Academic Press, London 1966.
- ~ *“Trace elements in soils and plants”* Kabata-Pendias A., Pendias H., CRC Press, Boca Raton, FL 2001.
- ~ *“Trace Elements in the Terrestrial Environment”* Adriano, D.C. Berlin Heidelberg New York: Springer 2001, p. 680.
- ~ *“Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms”*
Pafundo S., Agrimonti C., Marmiroli N., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
2005, 53:6995-7002.
- ~ *“Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms”*
Pafundo S., Agrimonti C., Marmiroli N., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
2005, 53:6995-7002.
- ~ *“Tre risposte alle sfide della sicurezza alimentare: principio di precauzione qualità rintracciabilità”* Signorini G., Biagi G., Nannipieri S. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università di Parma* 2001, 21:407-412.
- ~ *“Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties”* Bligh H.F.J., Larkin P.D., Roach P.S., Jones C.A., Fu H., Park W.D., *Plant Molecular Biology* 1998, 38:407–415.
- ~ *“Use of Restriction Fragment Length Polymorphism To Distinguish between Salmon Species”*
Russell V.J., Georgina L., Hold Susan E., Pryde., Hartmut R.J., Quinteiro M., Rey-

- Mendez C.G., Sotelo R.I., Pérez-Martin A.T., Rosa S., Rosa C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48:2184–2188.
- ~ “*Using Polymerase Chain Reaction-based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivars*” Sosinski, B., Douches, D.S., *Scientia Horticulturae* 1996, 31:130-133.
- ~ “*Utilization and disposal of fly ash and other residues in terrestrial ecosystems: A review*” Adriano D.C., Page A. L., Elsewi A.A., Chang A.C., Straughan I., *Journal of Environmental Quality* 1980, 9:333-334.
- ~ “*Validation of a Tomato-Specific Gene, LAT52, Used as an Endogenous Reference Gene in Qualitative and Real-Time Quantitative PCR Detection of Transgenic Tomatoes*” Yang L., Pan A., Jia J., Ding J., Chen J., Cheng H., Zhang C., Zhang D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53:183–190.
- ~ “*Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications*” Micka K.A., Sprecher C.J., Lins A.M., Theisen Comey C., Koons B.W., Crouse C., Endean D., Pirelli K., Lee S.B., Duda N., Ma M., Schumm J.W., *Journal of Forensic Sciences* 1996, 41:582-590.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato svolto grazie al contributo del progetto Europeo di ricerca “Integrated system for a reliable traceability of food supply chains” TRACEBACK FP6-2005-FOOD-036300, coordinato dal Dottor Ethel De Paoli, Tecnoalimenti S.C.p.A. (Italy).

Vorrei ringraziare inoltre il Professor Nelson Marmiroli, coordinatore del mio Dottorato di Ricerca e mio docente guida, per l'opportunità che mia offerto e per avermi indirizzato e sostenuto durante questi anni. Vorrei inoltre ringraziare la Dottoressa Marta Marmiroli e la Professoressa Elena Maestri per l'aiuto e la disponibilità che mi hanno offerto in questi anni.

Desidero inoltre ringraziare tutte le persone che lavorano e che hanno lavorato nei laboratori in cui ho svolto il mio dottorato: Mariolina Gulli, Caterina Agrimonti, Aliosha Malcevschi, Giovanna Visioli, Maria Cristina Samson, Daniel Campioli, Francesca Merangolo, Maria Luisa Savo Sardaro, Davide Imperiale, Sara Graziano, Andrea Pirondini, Simona Pafundo, Urbana Bonas, Laura Paesano, Laura Bortolazzi, Michelangelo Vietina.

Un doveroso grazie va anche alle laureande Sara Lari e Veronica Pighi per l'aiuto nella cura delle piantine di pomodoro.

Un ringraziamento va anche al personale tecnico del dipartimento per il prezioso aiuto che mi hanno dato: la Dott.ssa Elisabetta Davolio Marani, la Dott.ssa Claudia Caselli, Mimmo Cavalca e Francesco Azzone.

Un pensiero va a mia madre e a mio padre senza i quali non sarei potuta arrivare e diventare la persona che sono ora, grazie! Grazie anche a mio fratello Francesco che mi ha “sostenuto” e sopportato durante gli anni di università, dottorato e durante tutta la sua vita (Mi avrai intorno ancora per un bel po'!).

Grazie a Riccardo per aver subito la mia collera in questi anni, per avermi sostenuto con i suoi “forza dai non te la prendere” e “non ti preoccupare” e perchè in fondo è merito suo se ho iniziato questo percorso.

Grazie a Gian Paolo per le discussioni sullo stato dell'università, sulla ricerca, sull'acceleratore di particelle e per il suo modo di sdrammatizzare le cose. Grazie alla Nonna Valle perché alla fine due cappelletti e una bomba di riso per tirarmi su di morale quando era necessario per me c'erano sempre.

E infine grazie ai miei due angeli, il primo che mi segue da più di vent'anni e mi ha guidato durante tutta la vita e avrebbe voluto essere sempre presente, il secondo che è sempre stato con me e so che ci sarà sempre anche se è diventata angelo tre anni fa perchè mi ha dato la forza di superare tutte le prove a cui sono stata sottoposta.

E anche questa volta è finita...