

Analisi genomiche e proteomiche per il miglioramento della qualità e sicurezza delle produzioni agrarie

Domenico Lafiandra^{1*}, Stefania Masci¹, Giuseppe Reforgiato Recupero², Valeria Terzi³,
Domenico Carputo⁴, Miriam Odoardi⁵

¹*Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica, Università della Tuscia
indirizzo ??, 01100 Viterbo*

²*CRA – Istituto Sperimentale per l'Agricoltura, Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT)*

³*CRA – Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Via San Protaso 302, 29017 Fiorenzuola d'Arda (PC)*

⁴*Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente, Università di Napoli 'Federico II', Via Università 100, 80055 Portici (NA)*

⁵*CRA – Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere, Viale Piacenza 29, 26900 Lodi*

Società Italiana di Genetica Agraria

Riassunto

Qualità e sicurezza alimentare sono le parole chiave ricorrenti sia nell'ambito del VII programma quadro dell'Unione Europea, sia nel PNR e nei piani di sviluppo delineati da diverse regioni italiane. In sostanza, l'innalzamento e la definizione della qualità dei prodotti agroalimentari rappresentano strumenti indispensabili per dare nuovo impulso e rinnovamento al settore. I recenti sviluppi della normativa europea ed italiana in questo settore mostrano una netta tendenza verso la necessità di fornire al consumatore, oltre ad una sicurezza microbiologica, anche chiare indicazioni su diversi aspetti qualitativi dei prodotti agro-alimentari. La possibilità di incrementare la quantità di metaboliti secondari (vitamine e antiossidanti) nelle colture risulta di particolare interesse per lo sviluppo di prodotti ad elevata connotazione salutistica (alimenti funzionali). Programmi di miglioramento genetico hanno già permesso di ottenere linee migliorate per tali caratteristiche. A questo si aggiunge la necessità di sviluppare strategie di valutazione che diano indicazioni scientificamente attendibili sulla tracciabilità e salubrità degli alimenti derivati da piante geneticamente modificate. La valutazione del rischio delle colture geneticamente modificate si basa principalmente sul cosiddetto "principio dell'equivalenza sostanziale" o della "sicurezza comparativa", basato sull'assunto che un genotipo transgenico non debba presentare modificazioni sostanziali rispetto al corrispondente genotipo non transgenico, che, nel caso delle varietà commerciali già presenti sul mercato, sono ritenute ovviamente salubri.

Le nuove discipline "-omiche", quali genomica, trascrittomiche, proteomica e metabolomica, nate parallelamente e in seguito al sequenziamento completo di genomi modello, possono fornire una fotografia panoramica della composizione delle materie prime e degli alimenti, permettendo così di effettuare una valutazione complessiva della loro qualità e sicurezza. Tali innovativi e sofisticati strumenti d'indagine molecolari possono affiancare e rafforzare le metodiche comunemente usate, rispondendo in modo flessibile alle nuove esigenze di tracciabilità, rintracciabilità e certificazione di autenticità.

Parole chiave: DNA, genoma, marcatori molecolari, glutine.

Abstract

MANCA TITOLO IN INGLESE??

Food health and quality are the keywords recurring both into the VII Framework Programme of EU, both in the PNR and development plans arranged by several Italian regions. Essentially, the increase and definition of quality of agri-food products represent necessary tools to give new impulse and renovation to this sector. The late developments of European and Italian laws show a clear trend towards the need to give consumer clear indications on different qualitative aspects of agri-food products, besides their microbiological security. The capacity to increase the quantity of secondary metabolites (vitamins and antioxidants) in crops is particularly interesting for the development of products with high health value (functional food). Breeding programmes have already obtained lines improved about these characteristics.

* Autore corrispondente: tel.: +39 0761 357494; fax: +39 0761 357494. Indirizzo e-mail: lafiandr@unitus.it

The need to develop assessment strategies giving scientifically reliable information on traceability and health of food derived from genetically modified plants.

Assessment of the risk coming from genetically modified plants is mainly based on the so-called “principle of substantial equivalence” or “of comparative safety”, claiming that a transgenic genotype shouldn’t show any substantial change with respect of the corresponding non-transgenic genotype. These changes are obviously considered healthy in case of the current commercial varieties.

The new “-omics” disciplines such as genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics, born together with and subsequent to the complete sequencing of model genomes, can give an overview of first matters and food compositions, thus allowing the making of an overall assessment of their quality and safety. These new and sophisticated tools for molecular investigation can help and strengthen the commonly used methods, meeting the new requirements of traceability and authenticity certification.

Key-words: DNA, genome, molecular markers, gluten.

Tracciabilità molecolare, qualità e sicurezza dei prodotti agroalimentari

L’innalzamento e la definizione della qualità dei prodotti rappresentano strumenti indispensabili per dare nuovo impulso e rinnovamento al settore agroalimentare. La valutazione della qualità e sicurezza di materie prime ed alimenti può attualmente avvantaggiarsi di innovativi strumenti d’indagine molecolari che sono in grado di affiancare e rafforzare le metodiche ufficiali, ma soprattutto possono rispondere in modo flessibile alle nuove esigenze di tracciabilità, rintracciabilità e certificazione di autenticità, intesa come rispondenza di un prodotto a criteri stabiliti, in termini di contenuto, origine e processo produttivo. In particolare, con il termine tracciabilità molecolare vengono indicate metodiche genomiche, proteomiche e metabolomiche capaci di dare indicazioni su diverse caratteristiche di una produzione agraria o di un prodotto agroalimentare, quali sicurezza e qualità, origine geografica, valore nutrizionale, autenticità. Metodiche basate sull’analisi del DNA possono essere ad esempio applicate all’identificazione e quantificazione di specie vegetali, animali e microbiche, oltre che di varietà vegetali geneticamente modificate o caratterizzate da un particolare pregio.

La composizione in cereali di specifici alimenti è un fattore chiave per aspetti qualitativi fondamentali del prodotto finito e la normativa può difendere la qualità del prodotto indicando precisi limiti di composizione. Un esempio rilevante in questo senso è la composizione in sfarinati delle paste alimentari. Ad oggi la de-

terminazione della presenza di frumento tenero in semole viene ufficialmente svolta con metodi di individuazione di specifiche componenti proteiche mediante tecniche elettroforetiche. Tali metodiche potrebbero trovare i loro limiti nelle nuove tecnologie di preparazione delle paste, che prevedono alte temperature di essiccamento, potenzialmente capaci di portare ad una degradazione delle forme proteiche da rilevare. A complemento di queste metodiche sono attualmente disponibili approcci analitici basati sull’analisi del DNA, utilizzando la metodica PCR Real Time (Terzi et al., 2003). È perciò possibile estrarre DNA sia da miscele di farine che da paste essiccate a diverse temperature e, attraverso la ricerca di sequenze nucleotidiche specifiche e della specie *Triticum aestivum* (il frumento tenero), è possibile tracciarne la presenza in semole e paste e dare una stima quantitativa della contaminazione. Nel caso particolare di alimenti destinati al consumo da parte dei celiaci, la possibilità di implementare le metodiche analitiche tradizionali con nuove tecniche molecolari per la tracciabilità di frumenti e segale, ha un particolare rilievo per aumentare i livelli di sicurezza d’uso degli alimenti ad essi dedicati (Terzi et al., 2003, 2004a).

Molte caratteristiche qualitative delle materie prime e degli alimenti finiti possono essere correlate con caratteri controllati geneticamente in particolari genotipi. I metodi *fingerprinting* sono perciò necessari per caratterizzare e identificare genotipi di alto valore qualitativo (Terzi et al., 2005). L’uso di marcatori molecolari è stato proposto per la caratterizzazione varietale anche su cibi processati: set di marcato-

ri molecolari sono stati infatti applicati per la certificazione di autenticità in diversi prodotti trasformati, che vanno dall'olio extra vergine di oliva, al malto ed alla pasta monovarietale (Faccioli et al., 1999; Busconi et al., 2003; Terzi et al., 2004b).

A questi marcatori, diretti verso il *fingerprinting* di specie e di varietà, si sono recentemente affiancati marcatori funzionali. Diversi studi, prevalentemente basati sull'utilizzo di mappe genico-molecolari, sono stati infatti recentemente sviluppati per la caratterizzazione funzionale di varianti alleliche e per identificare motivi legati a specifici fenotipi (Andersen e Lubberstedt, 2003). Il termine marcatori funzionali indica perciò marcatori del DNA derivati da sequenze geniche funzionalmente caratterizzate, in stretta o completa associazione genetica con il *locus* responsabile di un carattere fenotipico (Gale, 2005). Le prospettive legate alla disponibilità di questi nuovi marcatori sono legate ad un'accelerazione dei programmi di *breeding*, ma si può ipotizzare anche un loro utilizzo per verifiche qualitative e certificazione di filiera.

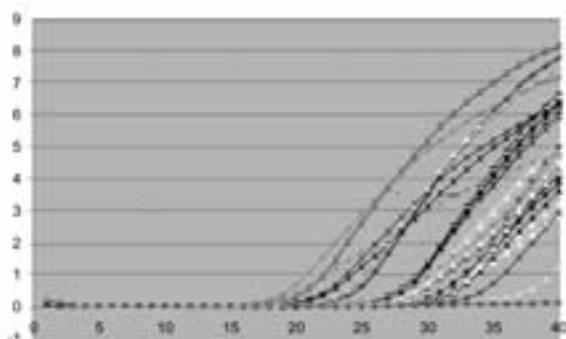


Figura 1. Esempio di analisi qPCR. I grafici di amplificazione di una sequenza nucleotidica specifica di *Fusarium* sono stati utilizzati per la quantificazione della presenza di DNA fungino in campioni di frumento a diverso grado di infezione. Sull'asse delle x sono riportati i cicli di amplificazione, sull'asse delle y l'emissione di fluorescenza. La quantità di DNA fungino è funzione del ciclo di amplificazione: campioni a maggiore contenuto in sequenza target emettono fluorescenza in corrispondenza dei cicli più precoci.

Figure 1. Example of qPCR analysis. The amplification graphs of a specific nucleotidic sequence of *Fusarium* were used to quantify the fungal DNA presence in wheat samples at different infection levels. On the x-axis the amplification cycles are reported while the fluorescence emission is reported on the y-axis. Fungal DAN amount is function of amplification cycle: samples with higher content of target sequence give out fluorescence in case of the shortest cycles.

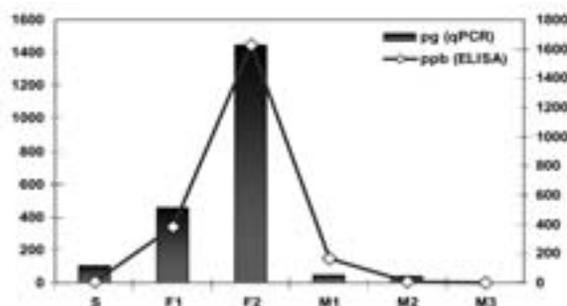


Figura 2. Quantificazione attraverso analisi qPCR della presenza di DNA di *Fusarium* in piante di frumento tenero infettate a diversi stadi fenologici (S = emergenza della spiga; F1 = inizio fioritura; F2 = completa fioritura; M1 = maturazione latte; M2 = maturazione cerosa; M3 = maturazione completa). In figura sono riportate, a confronto dei pg di DNA, le quantità (ppb) di deossivalenolo (DON) rilevate attraverso test ELISA sugli stessi campioni a maturazione.

Figure 2. Quantification by qPCR analysis of the presence of *Fusarium* DNA in wheat plants infected at different phenological phases (S = ear emergence; F1 = early flowering; F2 = complete flowering; M1 = milky ripening; M2 = waxy ripening; M3 = complete ripening). In the figure, compared to the DNA pgs, the amounts (ppb) of deoxynivalenole (DON) recorded by ELISA test on the same samples at ripening.

A questo si aggiunge il recente sviluppo della tracciabilità molecolare a scopo diagnostico, applicata a specifici problemi microbiologici delle produzioni agro-alimentari. Metodiche molecolari basate sulla tracciabilità e quantificazione di DNA fungino, quali la qPCR (fig. 1), possono ad esempio essere utilizzate per una diagnosi estremamente precoce (fig. 2), in campo, dei livelli di contaminazioni da funghi produttori di micotossine, in particolare del genere *Fusarium*, produttori di deossivalenolo e zearalenone (Rossi et al., 2006a). Studi di persistenza e tracciabilità del DNA fungino in seguito a diversi trattamenti tecnologici sono stati inoltre applicati alla filiera di produzione del pane e dei prodotti da forno (Terzi et al., 2007), ottenendo chiare indicazioni sulla possibilità di seguire l'abbattimento della presenza del fungo e delle relative micotossine (fig. 3).

Le caratteristiche qualitative degli sfarinati ottenuti da frumento duro e tenero sono largamente influenzate dalla quantità e qualità delle proteine del glutine, gliadine e glutenine. Le gliadine sono molecole monomeriche con legami disolfuro, laddove presenti, intramolecolari.

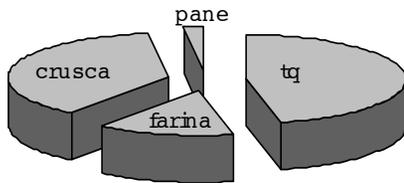


Figura 3. L'abbattimento della presenza di DNA di *Fusarium* lungo la filiera tecnologica di produzione del pane è stato quantificato attraverso analisi qPCR: a partire da campioni di granella contaminata (tq), il DNA fungino e, conseguentemente, le micotossine si ripartiscono in modo irregolare tra crusca e farina e solo una piccola frazione si ritrova nel prodotto finale.

Figure 3. The lowering of the presence of *Fusarium* DNA along the bread productive row was quantified by qPCR analysis: starting from contaminated grains (tq), the fungal DNA and, subsequently, the mycotoxins distribute irregularly between bran and flour and only a small fraction is recorded in the final product.

Le glutenine sono molecole polimeriche (polimeri gluteninici) costituite da subunità ad alto (HMW-GS) e basso (LMW-GS) peso molecolare tenute insieme da legami disolfuro intermolecolari. Le dimensioni molecolari dei polimeri gluteninici sembrano dare un contributo fondamentale alle caratteristiche viscoelastiche degli impasti e quindi alle caratteristiche tecnologiche degli stessi. Tali dimensioni dipendono dalla quantità delle subunità gluteniniche costituenti, e dalle caratteristiche strutturali delle stesse. L'elevato numero di varianti alleliche esistenti per le HMW-GS e LMW-GS ha permesso di evidenziare il loro diverso ruolo nell'influenzare le caratteristiche funzionali degli impasti modulando le dimensioni dei polimeri gluteninici (Lafiandra e MacRitchie, 1997; Shewry et al., 2003). Negli ultimi anni la trasformazione genetica di diverse specie di interesse agrario, incluso il frumento, è stata considerata un possibile strumento per migliorare rese, qualità e resistenza a condizioni ambientali sfavorevoli o malattie (Sahrawat et al., 2003; Jones, 2005; Shewry e Jones, 2005). Dato che le caratteristiche qualitative del frumento dipendono in larga misura dalla quantità di subunità gluteniniche presenti, uno degli obiettivi della trasformazione genetica è stato quello di introdurre copie aggiuntive di geni codificanti per subunità gluteniniche (sia HMW-GS che LMW-GS). Ad oggi sono disponibili diverse linee di questo tipo, che hanno permesso di comprendere alcuni aspetti delle basi molecolari che determinano la

qualità tecnologica degli impasti a base di frumento, sia duro che tenero. L'introduzione di queste tecnologie ha creato, come è noto, la necessità di sviluppare strategie di valutazione che diano indicazioni scientificamente attendibili sulla loro salubrità.

Una delle obiezioni maggiori da parte dell'opinione pubblica riguardanti le piante GM è la possibilità di sviluppo o di aumento di sostanze tossiche o allergeniche, in seguito all'evento di trasformazione.

Gli sfarinati di frumento contengono di per sé sostanze potenzialmente allergeniche o che danno origine a fenomeni di intolleranza in individui sensibili. La più comune e grave intolleranza è il morbo celiaco, causato dal glutine. Dato però che il glutine è essenziale per conferire le caratteristiche reologiche degli impasti a base di frumento, è impensabile, al momento, produrre genotipi di frumento che siano tollerati dai celiaci, in quanto anche minime quantità di glutine possono generare severe reazioni allergiche. È invece importante prestare attenzione alla cosiddetta "frazione solubile" delle proteine della cariosside, non comprendente il glutine. Infatti in tale frazione sono comprese la maggior parte delle proteine metaboliche, ritenute responsabili di buona parte delle allergie respiratorie, dermatologiche e alimentari al frumento (fig. 4).

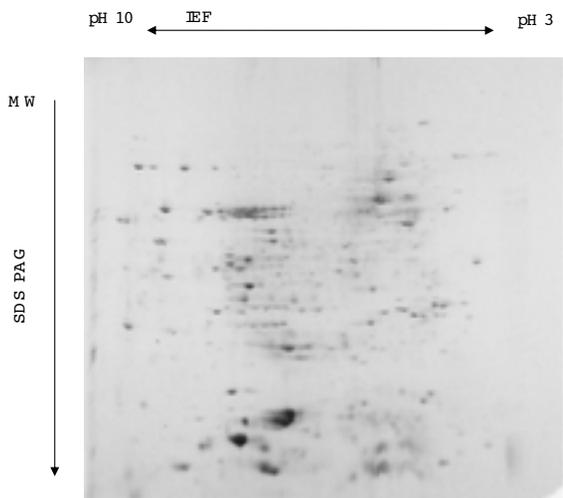


Figura 4. Separazione elettroforetica bidimensionale delle proteine metaboliche presenti nella varietà di frumento duro Svevo.

Figure 4. Bidimensional electroforetic separation of metabolic proteins in the Svevo wheat variety.

In quest'ottica è stata analizzata una linea di frumento tenero che era stata trasformata aggiungendo numerose copie di una subunità gluteninica a basso peso molecolare, al fine di studiarne l'influenza sulle proprietà tecnologiche degli impasti da essa derivati (Masci et al., 2003). Questa linea, che sovraesprime fino a sedici volte di più la LMW-GS transgenica, è stata messa a confronto sia con la varietà originale, non trasformata, che con una linea, denominata "nulla", corrispondente alla linea GM nella quale il transgene era stato perso per segregazione.

Il confronto è stato effettuato sia a livello trascrittomico che proteomico. L'analisi trascrittomico è stata condotta utilizzando un microarray a cDNA di endosperma di frumento dove erano rappresentati circa 8000 geni. I cloni di cDNA erano stati generati da 48 librerie di cDNA prodotte da un consorzio finanziato dalla US National Science Foundation ("The Structure and Function of the Expressed Portion of the Wheat Genome").

Sebbene la maggior parte dei geni differenzialmente espressi indicati dall'analisi trascrittomico fosse di tipo sconosciuto, la validazione di quelli conosciuti, effettuata a livello proteomico, ha mostrato che, in seguito alla sovraespressione della LMW-GS transgenica, alcune classi proteiche risultavano notevolmente sottoesprese. Tra queste l'intera classe delle gliadine, in particolare delle α -gliadine, la frazione maggiormente responsabile del morbo celiaco, così come l'intera frazione solubile, comprendente le proteine metaboliche e le proteine CM (solubili in cloroformio e metanolo), maggiormente responsabili delle altre allergie e intolleranze. Questi cambiamenti sono stati interpretati come la conseguenza della necessità, da parte della pianta GM, di adattare il sistema di trascrizione e traduzione alla necessità di sovraespressione di un singolo gene e quindi di una singola proteina, a spese delle altre componenti.

La linea GM analizzata presenta perciò una serie di "effetti prevedibili, ma non intenzionali", secondo una definizione di Cellini et al. (2004). Infatti, sebbene l'intenzione fosse quella di aumentare l'espressione di un singolo polipeptide coinvolto nei processi qualitativi degli impasti, ciò ha avuto effetti, comunque prevedibili, di tipo compensatorio, consistenti in una sottoregolazione delle altre classi proteiche del-

l'endosperma, il cui scopo è verosimilmente quello del mantenimento di un livello omeostatico di contenuto proteico compatibile con la germinazione e lo sviluppo del seme.

In conclusione, riguardo al problema dell'equivalenza sostanziale delle piante GM rispetto a quelle non GM, non è possibile dire, in rapporto a questa particolare linea, che essa sia sostanzialmente equivalente alla linea non GM, ma, paradossalmente, essa contiene una notevolmente minore concentrazione di sostanze potenzialmente allergeniche o intolleranti per l'uomo.

Qualità foraggera e molecole coinvolte

Migliorare la qualità e la sicurezza alimentare, nel caso delle produzioni foraggere, significa dare impulso da un lato alle caratteristiche nutrizionali del foraggio, pregevoli per l'animale in allevamento, e dall'altro alle caratteristiche qualitative delle produzioni animali derivate. I programmi di *breeding* delle specie foraggere considerano dunque le caratteristiche nutrizionali della pianta perché questa fornisca al bestiame, e distintamente ai monogastrici o ai ruminanti, tutti i principi nutritivi nelle forme più appropriate per la formulazione delle razioni, e perché dall'allevamento derivino produzioni sicure e di qualità.

Lo studio del genoma delle specie foraggere viene orientato al miglioramento dei singoli costituenti della pianta in funzione della sua utilizzazione (Humphreys, 2005). In particolare si punta a privilegiare ed ottenere un elevato contenuto proteico della biomassa delle foraggere, sia graminacee che leguminose, con particolare attenzione, tuttavia, al contenimento o, meglio, alla riduzione della quota di proteina solubile, prontamente degradabile nel ruminante e dunque di minor valore nutrizionale; a tale scopo ad esempio si agisce sulla presenza e sul tenore di costituenti quali i Tannini Condensati (TC) (Piluzza et al., 2000), o di enzimi quali la Polifenol ossidasi - (PPO) in grado di proteggere le proteine di origine vegetale dalla degradazione ruminale, o che in aggiunta possono svolgere una positiva azione antielmintica e nutraceutica (Niezen et al., 2002).

Altri costituenti di particolare valore nutrizionale, di cui si tende ad innalzare il contenuto, sono gli zuccheri solubili, cioè l'insieme dei

carboidrati non-strutturali: questo è soprattutto importante nelle graminacee, per favorirne l'insilabilità, ma anche nelle leguminose, in modo da aumentare la quota energetica del foraggio e ridurre le perdite di N attraverso le urine, grazie ad una migliore utilizzazione proteica da parte dei microrganismi ruminali.

Studi più recenti hanno infine messo in luce altri fattori ad azione favorevole sulla salute e il benessere animale, e quindi positivi anche per la salute umana quali, ad esempio, accresciuti livelli di vitamine, minerali e PUFA (Acidi Grassi Poliinsaturi), sostanze che dal foraggio passano al latte e alla carne, esercitando un benefico effetto sull'uomo per contrastare l'accumulo di colesterolo ematico. Altri esempi sono rappresentati da sostanze di origine vegetale ad azione epatoprotettiva e galattogena, ma anche attive come antiossidanti nei periodi critici del periparto e per contrastare gli effetti delle aflatoossine di origine alimentare (Tedesco et al., 2004a, 2004b).

Non minore importanza rivestono anche per le foraggere alcuni obiettivi generali del miglioramento genetico, oggi affrontati e perseguiti con successo grazie disponibilità di marcatori molecolari – MAS, quali l'aumento delle resistenze a malattie fungine ed attacchi di insetti, e l'acquisizione della tolleranza-resistenza agli stress abiotici, in particolare a freddo, siccità, anossia.

Studi in corso per ottenere resistenze a stress biotici e abiotici utilizzano spesso confronti di sintenia con specie modello quali *Medicago truncatula* per le leguminose, riso e *Arabidopsis* per le graminacee. Ad esempio Armstead e coll. (2004) hanno evidenziato sintenia tra un QTL per epoca di fioritura in *Lolium perenne* e un analogo locus in riso. Altri gruppi hanno esplorato l'ampia variabilità genetica disponibile nel germoplasma di numerose specie di origine diversa, quasi sempre allogame, e con diverso grado di adattamento ad ambienti climaticamente diversificati e contrastanti.

Con l'aiuto della Marker Assisted Selection – MAS si può prevedere nel prossimo futuro di esplorare e utilizzare strategie di *breeding* nell'ambito delle specie foraggere, tradizionalmente le più verdi ed amiche dell'ambiente, anche per ottenere nuovi genotipi più ecologici, in grado cioè di aumentare al massimo l'efficienza nell'uso delle risorse del suolo quali l'Acqua

(WUE), l'Azoto (NUE), il Fosforo (tramite Fitasi) e nell'ottica di un uso polifunzionale del terreno.

Altri obiettivi potenzialmente raggiungibili con l'impiego di foraggere migliorate, nell'ambito delle ricerche intorno ai sistemi agricoli sostenibili, sono:

- la possibilità di garantire la qualità del terreno e la sua protezione dai fenomeni di erosione;
- il miglioramento degli standard nutrizionali per il bestiame;
- di conseguenza, il miglioramento della qualità dei prodotti di origine animale;
- la riduzione dei rischi di inquinamento del suolo (con un approccio di *bioremediation*) e i correlati problemi per la salute dell'uomo;
- un significativo aumento degli impieghi alternativi delle piante foraggere, come specie da tappeto erboso per il tempo libero, come fonte di biomasse per usi energetici e industriali (plastiche biodegradabili, fibre per pannelli isolanti, ecc.), e soprattutto come sostanze ad azione farmacologica e nutraceutica.

Le foraggere, in particolare le leguminose, vengono ampiamente studiate anche come produttrici di metaboliti secondari responsabili di importanti caratteristiche qualitative del foraggio o della granella (saponine, inibitori di enzimi digestivi, lectine, sostanze fenoliche e polifenoliche), metaboliti spesso dotati di particolari "attività biologiche" (azione battericida, fungicida, citotossica, antitumorale) che li rendono particolarmente interessanti in ambito farmacologico (Avato et al., 2004; Balestrazzi et al., 2004; Lanza et al., 2004). Un esempio per tutti: le saponine di erba medica per le loro proprietà biocide sono state ampiamente studiate quali agenti antimicrobici e di biocontrollo su microrganismi patogeni umani e vegetali e su insetti dannosi, oltre che per le proprietà antitumorali su cellule leucemiche umane (Tava e Odoardi, 1996; Zaccardelli et al., 2005).

In questo ambito, accrescere le conoscenze sul controllo della produzione di metaboliti secondari biologicamente attivi, e costituire materiali a ridotto/elevato contenuto degli stessi composti rappresentano strategie di ricerca in grado di consentire un più ampio utilizzo delle piante foraggere, graminacee, leguminose e da

granella, nell'alimentazione animale e umana, e di valorizzare appieno il loro possibile uso multifunzionale in campo nutraceutico e farmacologico (ad esempio come fitoestrogeni, di protezione contro l'accumulo di colesterolo ematico, con effetto ipoglicemizzante, antitumorale, ecc.) e in definitiva con un sempre maggiore interesse applicativo.

Genomica e alimenti funzionali

L'elevato valore antiossidante degli alimenti diventa sempre più una caratteristica presa in considerazione dal consumatore. Negli USA attualmente numerosi supermercati danno il valore ORAC per molti alimenti, che ne esprime il potere antiossidante. Nell'ambito dei composti dotati di valore antiossidante particolare riguardo in questi ultimi anni è stato rivolto alle antocianine, pigmenti idrosolubili appartenenti alla classe dei flavonoidi. I pigmenti antocianici esercitano un ruolo ancora più importante per le loro proprietà farmacologiche e antiossidanti, alle quali sono state associate effetti potenzialmente benefici su varie patologie come la fragilità capillare, la retinopatia diabetica, malattie cardio-vascolari e in tutte quelle condizioni fisiopatologiche caratterizzate da un eccesso di produzione di radicali liberi (Saija, 1994). In letteratura è riportato che la cianidina è molto più efficace della vitamina C come *scavenger* di radicali liberi (Wang et al., 1997) e che in particolare la cianidina-3-glucoside, l'antocianina predominante nei succhi di arance rosse, esercita la più potente azione antiossidante nell'ambito delle antocianine più diffuse nei frutti (Rice-Evans, 1995).

Nei frutti maturi di agrume le antocianine sono presenti esclusivamente nell'arancia rossa e nei suoi ibridi, che contengono anche altre sostanze bioattive (vitamina C, acidi idrossicinnamici e flavanoni). Presso il CRA – Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura di Acireale, in un programma di miglioramento genetico rivolto alla costituzione di ibridi triploidi, è stata trasferita la caratteristica presenza di antocianine anche alla specie mandarino, utilizzando un genotipo tetraploide di Tarocco come genitore maschile. In figura 5 è possibile vedere il frutto apireno del mandarino triploide Mandared, caratterizzato da un elevato contenuto di antociani-

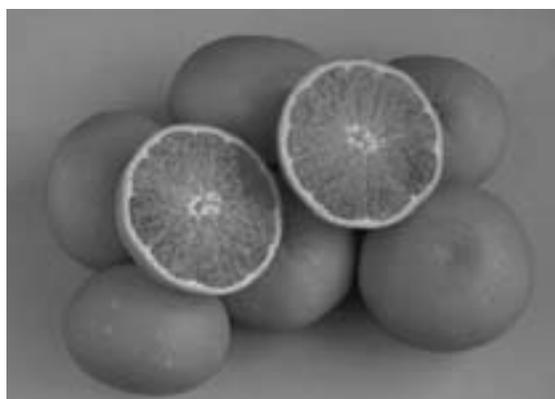


Figura 5. Frutti dell'ibrido Mandared.

Figure 5. Fruits of the Mandared hybrid.

ne nella polpa. Sfortunatamente in questi agrumi il contenuto di antocianine varia notevolmente in funzione della cultivar, del portinnesto, al procedere della maturazione, anche in funzione delle basse temperature (tab. 1), durante la conservazione post-raccolta. Inoltre i livelli di espressione variano considerevolmente anche tra polpa e buccia; l'impossibilità di assicurare una quantità costante di pigmento nei frutti rende difficoltosa la promozione del prodotto sulla base del suo contenuto antocianico (Cerletti et al., 2006).

Queste motivazioni hanno determinato l'interesse a migliorare le conoscenze sulle sequenze geniche e sui loro livelli di espressione nelle varie fasi di maturazione del frutto, nei diversi genotipi ed in funzione dei diversi ambienti pedoclimatici.

Dall'analisi dell'espressione di tre geni strutturali codificanti tre enzimi della via biosinteti-

Tabella 1. Contenuto in antocianine in vari campionamenti di Moro nuc. 58-8D-1.

Table 1. Anthocyanin content in different sampling of Moro nuc. 58-8D-1.

Campione	Data prelievo	Contenuto antocianine (mg/100 g)
I prelievo	9 ottobre 2002	-
II prelievo	30 ottobre 2002	-
III prelievo	19 novembre 2002	1,23
IV prelievo	4 dicembre 2002	5,29
V prelievo	19 dicembre 2002	46,75
VI prelievo	7 gennaio 2003	41,64
VII prelievo	23 gennaio 2003	165,94
VIII prelievo	6 febbraio 2003	209,78

ca in *Citrus*: calcone sintasi, antocianidina sintasi, UDP-glucosio, flavonoide 3-O-glucosiltransferasi attraverso Real-Time PCR, è stata messa in evidenza una buona correlazione tra contenuto di antocianine e livello di espressione dei geni biosintetici, sia al procedere della maturazione che nelle diverse selezioni di Tarocco ed ibridi pigmentati (Cotroneo et al., 2006).

Successivamente l'isolamento dei geni differenzialmente espressi in cultivar pigmentate e bionde è stato effettuato attraverso la realizzazione di una libreria cDNA differenziale (Subtractive Suppression Hybridization). Per tale scopo sono state scelte polpe di frutti maturi delle cultivar Moro nuc. 58-8D-1 pigmentato (usato come *tester*) e Biondo Cadenera (usato come *driver*). Su complessivi 1248 cloni isolati, 260 sono stati ritenuti differenzialmente espressi in modo significativo; di questi 230 risultano sovraespressi in Moro e 30 in Cadenera. Rispetto agli 82 geni equivalenti ai 260 cloni, 52 sono espressi in singola copia (52 cloni), 30 risultano essere ridondanti (208 cloni). Dall'analisi di similarità effettuata in BlastN-BlastX è stata dedotta la classificazione funzionale (fig. 6).

Il 44% dei cloni differenziali appartiene ai geni che codificano per gli enzimi strutturali della biosintesi delle antocianine e dei carotenoidi. Sono stati isolati anche geni implicati nella biosintesi degli aromi (7%), geni regolatori (1%), geni coinvolti nella protezione del frutto nei confronti di attacchi patogeni (3%) e facenti parte dell'attività degli organelli (3%). Rispettivamente l'8%, il 9% e l'11% di geni sono invece implicati nel metabolismo primario, nell'organizzazione cellulare e nei meccanismi di

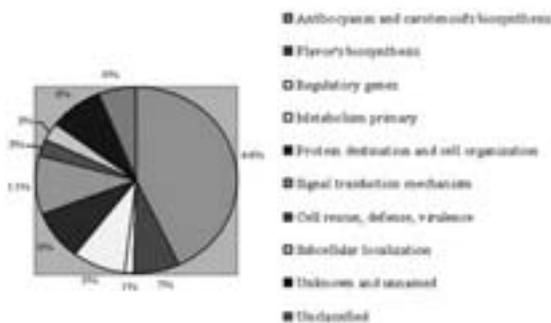


Figura 6. Classificazione funzionale dedotta in seguito a sequenziamento e analisi delle similarità in BlastN e BlastX.

Figure 6. Functional classification obtained by sequencing and similarity analysis in Blast N and BlastX.

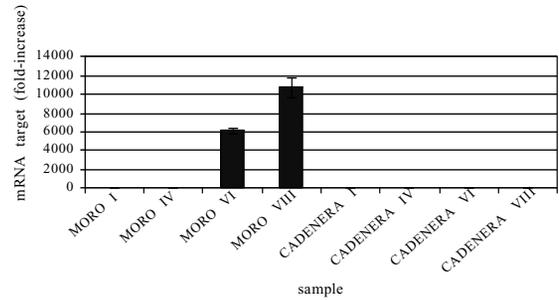


Figura 7. Analisi Real Time-PCR riguardante la pectinesterasi.

Figure 7. Real Time-PCR analysis of pectinesterase.

trasduzione del segnale. L'8% appartiene a geni dalla funzione sconosciuta, mentre per il 6% non è stato possibile attribuire una corretta categoria funzionale.

La validazione di alcune sequenze è stata effettuata attraverso la RT-PCR semiquantitativa, Real Time-PCR e la realizzazione di un array. Particolarmente interessante il livello di espressione della pectinesterasi (fig. 7): nullo nel Cadenera, ma abbondantemente presente nel Moro solo quando il frutto è altamente pigmentato e di conseguenza a maturità. Le pectinesterasi sono enzimi che demetilano le pectine, componenti della parete cellulare del frutto e che conferiscono compattezza e turgidità. Infatti le arance pigmentate sono notevolmente più morbide e meno compatte delle corrispondenti arance bionde. Questo fenomeno costituisce un vantaggio per la facilità con cui le arance pigmentate si sbucciano (a differenza delle bionde), ma un inconveniente perché riduce la conservabilità del prodotto.

È stato utilizzato un microarray in cui erano presenti 302 sequenze (di cui 104 derivanti dalla libreria SSH, 129 da una libreria cDNA AFLP, fornite da A. Marocco dell'Università Cattolica del S. Cuore di Piacenza e 68 reperite dalla banca dati *Harvest Citrus*). L'ibridazione, effettuata con cDNA di frutti di Moro e Cadenera prelevati a maturità (gli stessi con cui è stata costruita la libreria), ha evidenziato un'ibridazione positiva a carico dei geni biosintetici delle antocianine, più altri, quali AAT, il valencene sintasi, e il 10-idrossigeraniol ossidoreduttasi, con funzione nota. Questo array potrà essere successivamente completato con sequenze di interesse per altre vie biosintetiche (ad

esempio degli acidi tricarbossilici), per la comprensione della relazione genotipo-ambiente pedoclimatico, per un suo utilizzo nella selezione assistita e come *tool* innovativo per la tracciabilità di prodotti caratterizzati da caratteristiche qualitative elevate.

La patata riveste un ruolo fondamentale per l'alimentazione umana. I suoi tuberi contengono elevate quantità di vitamina C ed aminoacidi essenziali e sono una preziosa fonte di sali minerali. I parametri qualitativi utilizzati per caratterizzare questa coltura variano secondo gli indirizzi di mercato e sono spesso ascrivibili a due categorie: qualità esteriore (es. forma e dimensione dei tuberi, colore della buccia, profondità degli occhi) e qualità intrinseca (es. contenuto di vitamine, aminoacidi essenziali e sostanza secca, tipo di amido, valore culinario, tipo e contenuto di glicocalcoidi).

Numerosi sono i fattori che influenzano la qualità dei tuberi. Uno dei principali è legato al genotipo, e ciò apre interessanti prospettive al lavoro di miglioramento genetico. Il controllo poligenico di numerosi caratteri qualitativi, tuttavia, fa sì che anche la componente ambientale sia importante per la manifestazione di un particolare attributo qualitativo di tipo "biologico" (contenuto in proteine, vitamine, carboidrati), "sensoriale" (sapore, colore, tessitura) ed "industriale" (forma e dimensione del tubero, addolcimento da basse temperature, qualità dell'amido).

Il miglioramento genetico della patata è reso difficile non soltanto dalla natura poligenica di numerosi caratteri qualitativi, ma anche dalla natura poliploide ($2n = 4x = 48$) della patata coltivata. Essa è caratterizzata anche da un elevato grado di eterozigosi, da eredità di tipo tetrasomico, dalla presenza di numerose barriere sessuali che ostacolano l'ibridazione interspecifica, e da una base genetica ristretta. Nonostante ciò, la patata presenta numerose caratteristiche biologiche e genetiche che consentono ai miglioratori di utilizzare con successo strategie innovative di miglioramento genetico. La prima è legata all'elevato numero di specie selvatiche (oltre 200) con caratteri importanti per il miglioramento genetico. I genomi delle specie di *Solanum* che formano tuberi, inoltre, sono poco differenziati e quindi negli ibridi appaiamento meiotico e *crossing over* avvengono normalmente. Un altro importante aspetto da

rilevare è legato alla possibilità di manipolare i genomi grazie alla produzione di gameti $2n$ ed alla presenza di partenogenesi. L'ultimo aspetto da considerare è legato alla disponibilità di mappe molecolari molto sature. Diverse centinaia di marcatori molecolari che coprono oltre il 90% del genoma possono essere usati per localizzare geni che controllano caratteri qualitativi interessanti (Barone, 2004).

Negli ultimi anni il lavoro di miglioramento genetico si è notevolmente arricchito di nuove strategie di ampliamento della variabilità genetica e di nuovi strumenti di valutazione e validazione dei materiali genetici prodotti dai miglioratori. Particolarmente interessanti sono le tecniche molecolari per l'analisi degli acidi nucleici e la loro utilizzazione per l'acquisizione di nuove conoscenze sui genomi vegetali e per la razionalizzazione dei processi decisionali (Varshney et al., 2005). In questo ambito, i marcatori molecolari svolgono un'importante funzione di coordinamento tra le biotecnologie genetiche avanzate ed il miglioramento genetico tradizionale.

A Portici, presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, da anni sono in corso programmi di ricerca finalizzati al miglioramento della qualità della patata da industria e da consumo fresco attraverso l'uso di germoplasma selvatico. Tra le specie di maggiore interesse vi è *S. commersonii*, specie diploide resistente a numerose avversità biotiche ed abiotiche. A causa di barriere di incompatibilità post-zigotica, questa specie può essere utilizzata solo adottando schemi particolari di miglioramento genetico. La strategia intrapresa a Portici è schematizzata in Figura 8; essa è basata sulla produzione di ploidie ponte triploidi (che producono gameti $2n$), pentaploidi e sul loro uso in particolari combinazioni di incrocio. Il materiale genetico prodotto ha evidenziato, oltre che un differente livello di ploidia, anche un diverso dosaggio genomico tra specie coltivata e specie selvatica (Carputo et al., 1997; Carputo et al., 2007). Esso è stato allevato in campo e valutato per numerosi aspetti, quali precocità, peso specifico dei tuberi, contenuto di vitamina C dei tuberi, resistenza al freddo, resistenza al marciume molle dei tuberi da *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e all'avvizzimento batterico da *Ralstonia solanacearum*. Gli studi con-

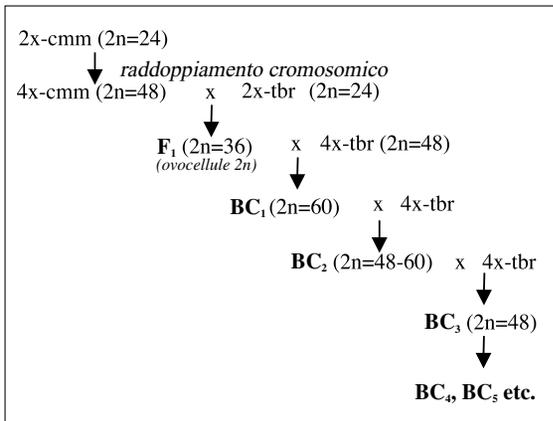


Figura 8. Strategia di miglioramento genetico utilizzata per superare le barriere di incompatibilità tra *Solanum tuberosum* (tbr) e *S. commersonii* (cmm).

Figure 8. Breeding strategy used to overtake the incompatibility barriers between *Solanum tuberosum* (tbr) and *S. commersonii* (cmm).

dotti hanno consentito l'identificazione di numerosi cloni con elevati standard qualitativi dei tuberi e resistenza a stress biotici e/o abiotici. Uno dei maggiori problemi legati all'uso di germoplasma selvatico è che esso porta, insieme a geni utili e diversità allelica, anche geni responsabili di caratteristiche indesiderate dei tuberi, quali presenza di occhi profondi e stoloni lunghi e produzione di tuberi con elevato contenuto in glicocaloidi. I materiali genetici derivanti da ibridazione interspecifica, pertanto, presentano spesso caratteri indesiderati. Questo fenomeno, noto come *linkage drag*, è essenzialmente dovuto all'associazione tra i loci che controllano i caratteri di interesse con quelli che controllano caratteri negativi. Per questo motivo nel programma di miglioramento genetico descritto è stato previsto di effettuare reincroci tra gli ibridi interspecifici selezionati e varietà di *S. tuberosum*.

I particolari livelli di ploidia e di dosaggio genomico degli ibridi *S. tuberosum* – *S. commersonii* hanno richiesto la messa a punto di efficaci schemi di selezione. Per accelerare il programma di reincrocio e selezione, e per renderlo più efficiente in termini di riduzione di genoma indesiderato proveniente dalla specie selvatica, gli ibridi prodotti sono stati analizzati con marcatori molecolari AFLP consentendo di identificare marcatori specifici di *S. commersonii* (Barone et al., 2001). La segregazione di que-

sti marcatori AFLP specifici è stata monitorata nelle progenie di reincrocio BC₁, BC₂ e BC₃ *S. tuberosum*-*S. commersonii*. In questo modo è stato possibile sia disporre di una stima indiretta del contenuto di genoma selvatico dei genotipi analizzati, che eliminare i genotipi con il maggiore contenuto in marcatori AFLP specifici di *S. commersonii* (selezione assistita negativa). Questi genotipi, infatti, hanno le più alte possibilità di presentare caratteri indesiderati e fenomeni di *linkage drag*.

L'analisi AFLP con 10 combinazioni di primer ha consentito l'identificazione di 47 marcatori AFLP *commersonii*-specifici su 251 marcatori (18.7%). I dati riportati in tabella 2 evidenziano come, passando dalla F₁ alla BC₁, la riduzione di genoma selvatico è stata minima: in BC₁, infatti, la percentuale media di marcatori *commersonii*-specifici ancora presente è del 92%. Nel passare dalla BC₁ alla BC₂ si è avuta una riduzione della percentuale di genoma selvatico, con valori medi del 76%, mentre nella BC₃ tale riduzione è stata notevole, con una percentuale media di marcatori *commersonii*-specifici ancora presenti del 20%.

L'analisi molecolare è stata affiancata dalla determinazione di un parametro (*evaluation index*, E.I.) risultante dalla sommatoria dei punteggi attribuiti ad ogni carattere fenotipico valutato, secondo quanto riportato da Iovene et al. (2004). L'E.I. e la percentuale di AFLP *commersonii*-specifici sono stati correlati; soltanto gli ibridi con una frequenza di marcatori AFLP più bassa del valore medio ed un E.I. più alto del valore medio sono stati selezionati per pro-

Tabella 2. Stima del contenuto di genoma selvatico negli ibridi BC₁, BC₂ e BC₃ tra *S. commersonii*-*S. tuberosum* mediante analisi con marcatori AFLP *S. commersonii*-specifici.

Table 2. Estimation of wild genoma content in *S. commersonii* x *S. tuberosum* crossbreeds BC₁, BC₂ and BC₃ by AFLP markers *S. commersonii* specific.

Progenie	Genotipi analizzati n°	% di AFLP <i>S. commersonii</i> specifici osservata ¹ attesa ²	
BC ₁	11	92	50
BC ₂	43	76	25
BC ₃	70	20	12,5

¹ (numero di marcatori *commersonii*-specifici osservati in ciascun genotipo/ n° di marcatori *commersonii* specifici analizzati) x 100.

² Percentuale (%) di marcatori specifici di un genitore donatore in generazioni di reincrocio tra parentali diploide.

fig. 9 non si legge

Figura 9. Relazione tra *evaluation index* (E.I.) e percentuale di marcatori AFLP specifici di *Solanum commersonii* (cmm) in un campione di ibridi BC₂. Gli ibridi con E.I. maggiore del valore medio e percentuale di AFLP *S. commersonii* specifici minore del valore medio (quadrante in alto a sinistra) sono stati selezionati per proseguire il programma di reincroci (Iovene et al., 2004).

Figure 9. Relation between *evaluation index* (E.I.) and AFLP marker percentage specific for *Solanum commersonii* (cmm) in a sample of BC₂ hybrids. Hybrids showing an E.I. higher of the mean value and a percentage of AFLP markers specific for *S. commersonii* smaller than the mean value (upper left quadrant) were selected to carry on the cross-breeding programme (Iovene et al., 2004).

seguire i reingroci. In figura 9 sono riportati l'E.I. ed il contenuto in genoma selvatico di una popolazione di ibridi BC₂ *S. tuberosum*-*S. commersonii*. Gli ibridi presenti nel quadrante in alto a sinistra sono stati quelli selezionati e maggiormente utilizzati nei successivi reingroci finalizzati a produrre la BC₃. Le prove agronomiche e le analisi qualitative effettuate sulle progenie BC₃ e BC₄ prodotte (dati non riportati) dimostrano che è possibile rendere più efficiente il lavoro di selezione non soltanto disponendo di marcatori molecolari associati ai geni di interesse (selezione assistita positiva), ma anche effettuando una selezione negativa "contro" il genoma indesiderato.

Conclusioni

Dagli esempi precedentemente riportati appare chiaro il ruolo centrale svolto dalle tecnologie omiche e dalla bioinformatica nell'avanzamento delle conoscenze necessarie per l'ottenimento di produzioni agroalimentari di elevato valo-

re qualitativo e per lo sviluppo di nuovi alimenti dotati di caratteristiche salutistiche. Le prospettive, come delineato nell'ambito dell'ultimo programma quadro dell'Unione Europea, sono da riferire a nuovi modelli di piante agrarie, ad alta sostenibilità ambientale, bioprodottrici di molecole di alto pregio, capaci di fornire alternative energetiche per il futuro.

Bibliografia

- Andersen J.R., Lubbersted T. 2003. Functional markers in plants. *Trends Plant Sci.*, 8:554-560.
- Avato P., Tava A., Bialy Z., Jurzysta M. 2004. Bioactive saponins from *Medicago* sp. Proc. International Conference on Saponins "Phytochemistry & Application of Plant Saponins". Pulawy, Poland, 53.
- Armstead I.P., Turner L.B., Farrell M., Skot L., Gomez P., Montoya T., Donnison I.S., King I.P., Humphreys M.O. 2004. Synteny between a major heading-date QTL in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and the Hd3 heading-date locus in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 108:822-828.
- Balestrazzi A., Gonfalonieri M., Odoardi M., Ressegotti V., Allegro G., Tava A., Carbonera D. 2004. A trypsin inhibitor cDNA from snail medic (*Medicago scutellata* L.): cloning and functional expression in response to wounding, herbivory, jasmonic and salicylic acid. *Plant Sci.*, 167:337-347.
- Barone A. 2004. Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *Amer. J. Potato Res.*, 81:111-117.
- Barone A., Sebastiano A., Carputo D., della Rocca F., Frusciante L. 2001. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated gene pool. *Theor. Appl. Genet.*, 102:900-907.
- Barry T.N., Mc Nabb W.C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Brit. J. Nutr.*, 81:263-272.
- Busconi M., Foroni C., Corradi M., Bongiorno C., Cattapan F., Fogher C. 2003. DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chem.*, 83:127-134.
- Carputo D., Barone A., Cardi T., Sebastiano A., Frusciante L., Peloquin S.J. 1997. Endosperm Balance Number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12013-12017.
- Carputo D., Castaldi L., Caruso I., Aversano R., Monti L., Frusciante L. 2007. Selection for resistance traits of (near) pentaploid *Solanum tuberosum* - *S. commersonii* hybrids for use as bridge ploidies. *Breeding Sci.*, in stampa.

- Cellini F., Chesson A., Colquhoun I., Constable A., Davies H.V., Engel K.H., Gatehouse A.M.R., Kaerenlaempi S., Kok E.J., Leguay J.J., Lehesranta S., Noteborn H.P.J.M., Pedersen A.J., Smith M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem. Toxicol.*, 42:1089-1125.
- Cerletti C., De Curtis A., Donati M.B., Iacoviello L., Licciardello C., Lo Bianco M., Pannuzzo P., Rapisarda P., Reforgiato Recupero G., Rotilio D., Russo M.P. 2006. *Le arance pigmentate: biosintesi delle antocianine e loro proprietà nutraceutiche*. Atti del 3° Convegno nazionale – Piante Mediterranee, 27 settembre - 1 ottobre 2006, Bari, in stampa.
- Cotroneo P.S., Russo M.P., Ciuni M., Reforgiato Recupero G., Lo Piero A.R. 2006. Quantitative Real-Time RT-PCR profiling of anthocyanin biosynthetic genes during orange fruit ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 13:537-543.
- Faccioli P., Pecchioni N., Stanca A.M., Terzi V. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for barley malt fingerprinting. *J. Cereal Sci.*, 29:257-260.
- Gale K.R. 2005. Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat. *J. Cereal Sci.*, 41:181-192.
- Gu Y.Q., Wildermuth M.C., Chakravarthy S., Loh Y.T., Yang C., He X., Han Y., Martin G.B. 2002. Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14:817-831.
- Humphreys M.O. 2005. Genetic improvement of forage crops – past, present and future. *J. Agr. Sci., Cambridge* 143:441-448.
- Jones H.D. 2005. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J. Cereal Sci.*, 41:137-147.
- Novene M., Barone A., Frusciante L., Monti L., Carputo D. 2004. Selection for aneuploid *Solanum comersonii* – *S. tuberosum* hybrids combining low wild genome content and resistance traits. *Theor. Appl. Genet.*, 119:1139-1146.
- Lanza A., Tava A., Catalano M., Ragona L., Gatti R., Singuaroli I., Robustelli della Cuna F.S., Robustelli Della Cuna G. 2004. Effects of the *Medicago scutellata* trypsin inhibitor (MstI) on cisplatin-induced cytotoxicity in human breast and cervical cancer cells. *Anticancer Res.*, 24:227-234.
- Licciardello C., Russo M.P., Valè G.P., Reforgiato Recupero G. Identification of differentially expressed genes in the flesh of blood and common oranges. *Tree Genetics and Genomes*, in stampa.
- Niezen J.H., Charleston W.A.G., Robertson H.A., Shelton D., Waghorn G.C., Green R. 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and immunity to gastrointestinal nematode. *Vet. Parasitol.*, 105:229-245.
- MacRitchie F., Lafiandra D. 1997. Structure-functionality relationships of wheat proteins. 1997. In: Damodaran S. (ed.): *Food Proteins and their Applications*, 293-324. Marcel Dekker, New York.
- Masci S., D' Ovidio R., Scossa F., Patacchini C., Lafiandra D., Anderson O.D., Blechl A.E. 2003. Production and characterization of a transgenic bread wheat line over expressing a low-molecular-weight glutenin subunit gene. *Mol. Breeding.*, 12:209-222.
- Piluzza G., Bullitta S., Deroma M., Odoardi M. 2000. The accumulation of condensed tannins in local population of sulla. *Cahiers-Options-Mediterraneennes*, 45:199-202.
- Rice-Evans C. 1995. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem. Soc. Symp.*, 61:103-116.
- Rossi V., Terzi V., Moggi F., Morcia C., Haidukowski M., Pascale M. 2006a. Assessment of Fusarium infection in wheat heads using a qPCR assay. Int. Conference "Advances in genomics, biodiversity and rapid systems for detection of toxigenic fungi and mycotoxins", 26-29 settembre 2006, Monopoli, Bari.
- Rossi V., Giosuè S., Cigolini M., Delogu G., Faccini N., Terzi V., Scudellari D. 2006b. Un aiuto alla gestione della fusariosi della spiga. *L'Informatore Agrario*, 14:62-68.
- Tava A., Odoardi M. 1996. Saponins from *Medicago* spp.: chemical characterization and biological activity against insects. In: Waller G.R., Yamasaki K. (eds.): *Advances in Experimental Medicine and Biology, Saponins Used in Food and Agriculture*, 405:97-109. Plenum Press, New York - London.
- Shewry P.R., Jones H.D. 2005. Transgenic wheat: where do we stand after the first 12 years? *Ann. Appl. Biol.*, 147:1-14.
- Sahrawat A.K., Becker D., Lütticke S., Lörz H. 2003. Genetic improvement of wheat via alien gene transfer: an assessment. *Plant Sci.*, 165:1147-1168.
- Saija A. 1994. Attività farmacologiche delle antocianine presenti nei succhi pigmentati. *Proc. Innovazioni nell'industria dei derivati agrumari*, 61-66.
- Shewry P.R., Halford N.G., Lafiandra D. 2003. The genetics of wheat gluten proteins. *Adv. Genetics*, 49:111-184.
- Tedesco D., Tava A., Galletti S., Tameni M., Varisco G., Costa A., Steidler S. 2004a. Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87:2239-2247.
- Tedesco D., Steidler S., Galletti S., Tameni M., Sonzogni O., Ravarotto L. 2004b. Efficacy of Silymarin-Phospholipid Complex to Reduce the Toxicity of Aflatoxin B₁ in Broiler Chicks. *Poultry Sci.*, 83:1839-1843.
- Terzi V., Malnati M., Barbanera M., Stanca A.M., Faccioli P. 2003. Development of analytical systems based on real time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta. *J. Cereal Sci.*, 38(1):87-94.
- Terzi V., Infascelli F., Tudisco R., Russo G., Stanca A.M., Faccioli P. 2004a. Quantitative detection of *Secale ce-*

- reale* by real time PCR amplification. Food Sci. Technol. (LWT), 37:239-246.
- Terzi V, Morcia C., Giovanardi D., D'Egidio M.G., Stanca A.M., Faccioli P. 2004b. DNA-based analysis for authenticity assessment of monovarietal pasta. Eur. Food Res. Technol., 219 (4):428-431.
- Terzi V., Gorrini A., Stanca A.M., Shewry P., Faccioli P. 2005. DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties. J. Cereal Sci., 41:213-220.
- Terzi V., Morcia C., Faccioli P., Faccini N., Rossi V., Cigolini M., Corbellini M., Scudellari D., Delogu G. 2007. *Fusarium* DNA traceability along the bread production chain. Int. J. Food Sci. Tech., **doi10.1111/j.1365-2621.2006.01344.x**.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. Food Chem., 45:304-309.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. Trends Plant Sci., 10:621-630.
- Zaccardelli M., Corsi P., Tava A., Odoardi M. 2005. Studi preliminari sul ruolo delle saponine nella resistenza "costitutiva" di varietà di erba medica (*Medicago sativa* L.) a *Fusarium* spp. e *Verticillium* spp. In: Piano E., Odoardi M. (eds.), Annali dell'Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere. Vol. IX, 159-164. Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere, Lodi.