

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

Dipartimento di Scienze Ambientali

Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali

## **DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE**

**XXI CICLO**

**2006-2008**

### **IL CONTRIBUTO DELLE BIOTECNOLOGIE ALLA “CARTA DI IDENTITÀ” DELL’OLIO DI OLIVA**

**Docenti Guida:**

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Dott.ssa Caterina Agrimonti

**Coordinatore del Dottorato:**

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

**Dottorando:**

Dott. Michelangelo Vietina

## Indice

<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Riassunto</b> .....	<b>7</b>
<b>Introduzione</b> .....	<b>10</b>
Sicurezza dei prodotti alimentari e politica dell'Unione Europea .....	10
Biotecnologie e sicurezza alimentare .....	11
Libro Bianco sulla sicurezza alimentare.....	12
Tracciabilità e regolamentazione comunitaria.....	13
<b>“Food Genomics” e tracciabilità molecolare</b> .....	<b>15</b>
L'estrazione del DNA da matrici complesse.....	17
Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti .....	17
Qualità del DNA e contaminanti .....	17
Artefatti della PCR.....	18
<b>L'utilizzo della tecnica PCR per l'identificazione delle frodi</b> .....	<b>19</b>
Identificazione delle componenti in prodotti a base di carne .....	19
Identificazione delle componenti in prodotti a base di pesce .....	20
Identificazione di molluschi .....	22
Identificazione dei prodotti lattiero-caseari .....	23
Identificazione di allergeni.....	25
<b>La Real-Time PCR</b> .....	<b>27</b>
Chimiche impiegate per la rivelazione dell'amplificato.....	28
SYBR® Green I .....	28
Sonde FRET .....	29
Sonde TaqMan™ .....	30
Molecular beacons.....	30
Sonde Scorpion™ .....	31
UniPrimer™ .....	31
Sonde LNA™ .....	31
La discriminazione allelica in Real-Time PCR .....	32
<b>La PCR abbinata alla elettroforesi capillare (CGE-SC)</b> .....	<b>33</b>
<b>Tracciabilità molecolare dell'olio di oliva: dalla genomica della pianta alla “Food Genomics”</b> .....	<b>33</b>
Estrazione del DNA dall'olio di oliva .....	34
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	36
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms).....	36
SCAR (Simple Characterized Amplified Region).....	37
SNP (Single Nucleotide Polymorphism).....	38
SSR (Simple Sequence Repeat).....	39
Errori nella genotipizzazione con marcatori molecolari microsatelliti.....	40
L'approccio mini-SSR nell'analisi del DNA degradato .....	41
<b>L'olio di oliva</b> .....	<b>43</b>
Il settore dell'olio di oliva nell'Unione Europea .....	45
La lavorazione dell'olio.....	46
Denominazione e definizione degli oli di oliva .....	48
Etichettatura degli oli .....	49
La certificazione DOP e IGP .....	50
<b>Le frodi nel settore oleario</b> .....	<b>51</b>
<b>L'olio di semi</b> .....	<b>54</b>

Processi estrattivi per l'olio dei semi.....	56
<b>Scopo della Ricerca .....</b>	<b>58</b>
<b>Materiali.....</b>	<b>60</b>
<b>Foglie e olio di oliva.....</b>	<b>60</b>
<b>Metodi .....</b>	<b>62</b>
<b>Estrazione di DNA da foglie .....</b>	<b>62</b>
<b>Estrazione di DNA da olio di oliva e di semi.....</b>	<b>62</b>
Nucleospin® Plant (Macherey-Nagel) .....	62
Metodo Consolandi-Palmieri .....	63
Protocollo Sperimentale CTAB.....	63
<b>PCR qualitativa per lo studio di degradazione del DNA .....</b>	<b>63</b>
PCR qualitativa del DNA estratto da olio di oliva e di semi .....	64
<b>Real-Time PCR con tecnologia SYBR® GreenER™ .....</b>	<b>64</b>
<b>PCR con primer marcati ed elettroforesi capillare (CGE-SC) .....</b>	<b>66</b>
<b>Real-Time PCR con tecnologia TaqMan® MGB.....</b>	<b>66</b>
Studio dell'effetto matrice nella estrazione del DNA dall'olio di oliva .....	66
Analisi quantitativa mediante marcatori molecolari SNP .....	67
Varietà di olivo utilizzate .....	67
Disegno dei primer e delle sonde .....	67
Verifica della specificità delle sonde fluorescenti .....	68
Ottimizzazione della concentrazioni dei primer e delle sonde .....	68
Preparazione della retta standard.....	69
<b>Analisi con marcatori molecolari microsatelliti .....</b>	<b>69</b>
Tecnologia mini SSR .....	70
<b>Purificazione delle reazioni di PCR e sequenziamento .....</b>	<b>71</b>
<b>Quantificazione fluorimetrica del DNA .....</b>	<b>71</b>
<b>Risultati.....</b>	<b>72</b>
<b>Analisi dell'effetto matrice sulle metodiche di estrazione del DNA dall'olio di oliva.....</b>	<b>72</b>
<b>Analisi delle metodiche di estrazione del DNA estratto dall'olio di semi .....</b>	<b>75</b>
<b>PCR su DNA estratto da olio di oliva e di semi .....</b>	<b>77</b>
Analisi di specificità e ottimizzazione delle concentrazioni dei primer in PCR singola .....	77
Analisi di amplificabilità .....	78
PCR duplex .....	79
<b>Real-Time PCR con SYBR® GreenER™ su DNA estratto da olio di oliva e di semi.....</b>	<b>80</b>
Real-Time PCR singola.....	80
Verifica della specificità dei primer in Real-Time PCR singola .....	83
Verifica della efficienza e della sensibilità delle reazioni di amplificazione in Real-Time PCR singola.....	84
Sviluppo e ottimizzazione della reazione di duplex Real-Time PCR.....	85
Real-Time PCR duplex .....	87

---

<b>PCR con primer marcati ed elettroforesi capillare (PCR-CGE) .....</b>	<b>93</b>
<b>Analisi di riconoscimento varietale con marcatori molecolari microsatelliti.....</b>	<b>94</b>
Microsatelliti nucleari.....	94
Analisi del contributo dell'impollinatore .....	99
Microsatelliti cloroplastici.....	101
Approccio mini-SSR sul DNA degradato .....	103
Confronto tra l'analisi di riconoscimento varietale con marcatori mini-SSR e SSR.....	106
<b>Analisi quantitativa mediante marcatori molecolari SNP .....</b>	<b>108</b>
Analisi di specificità.....	108
Ottimizzazione della concentrazione dei primer e delle sonde.....	110
Valutazione dell'efficienza della reazione di amplificazione e costruzione di una retta di taratura.....	111
Analisi quantitativa sul DNA estratto dalle foglie.....	112
Analisi quantitativa sul DNA estratto dal olio di oliva.....	113
<b>Discussione.....</b>	<b>115</b>
<b>Valutazione delle metodiche estrattive dalla matrice olio .....</b>	<b>115</b>
Olio di oliva.....	115
Olio di semi .....	116
<b>Metodologie molecolari per l'identificazione di adulterazioni .....</b>	<b>117</b>
<b>Determinazione varietale mediante marcatori microsatelliti.....</b>	<b>118</b>
Analisi del contributo dell'impollinatore .....	119
Risultati dell'analisi con marcatori mini-microsatelliti .....	120
<b>Analisi varietale in Real-Time PCR con marcatori molecolari SNP .....</b>	<b>121</b>
<b>Conclusioni e prospettive future .....</b>	<b>122</b>
<b>Sigle e abbreviazioni .....</b>	<b>124</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>125</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>127</b>

---

## Abstract

The development of molecular systems for traceability to investigate the history of a food production has been a very important step to guarantee the origin and safety of food. Traceability through molecular analysis is an advantage compared to the current system based mainly on the use of paper information and it is be a tool supporting the traditional analytical techniques.

The aim of this work has been the development and implementation of genetic and molecular methodologies for tracing foodstuffs, taking as a case study the olive oil. The olive (*Olea europaea* L.) is one of the most important plants for the oil production in the Mediterranean basin. Its cultivation is booming and the demand for olive oil is significantly increasing, due to its use in diets because of thanks to the positive effects on human health.

Therefore the protection of the authenticity of origin of this food is now a practical need, supported also by the European Union which has established brands as PDO (Protected Designation of Origin) and PGI (Protected Geographical Indication) to guarantee the olive oil productions. As all the products of great value, olive oil may be subject to frauds and adulterations, such as the addition of oils obtained from other species or from olive cultivars of little value. The analysis of DNA residues in olive oil can be a new tool to identify the origin of olive cultivars and for the detection of oils from other species.

The first step to perform molecular analysis of DNA in olive oil is the development and optimization of the extraction method. One method based on an commercial kit and one protocol developed in laboratory were compared to assess their efficiency in terms of yield, DNA purity, volume of oil required for a DNA optimal yield, costs and quickness of each extraction. DNA extraction methods were also applied to seed oils commonly used for adulteration. The analysis led to the identification of an extraction method for an efficient recovery of DNA both from olive oil and seeds oil. Amplifications carried out with primers designed to produce different size amplicons have shown that amplicons smaller than 100 bp allow a successful DNA amplification in olive oil and seeds oils extractions.

After development and evaluation of DNA extraction method, the work was divided into two research lines : *i)* development of methods to identify adulterations with different origin non olive oils; *ii)* development of molecular markers methods for the identification of olive oils cultivars present in an oil.

The analysis of dissociation profiles of amplicons by Real-Time PCR, has allowed the identification of DNA traces of hazelnut, maize and sunflower in mixtures made with different percentages of these oils. The detection of amplicons, for the three species mentioned above, was carried out successfully both in end point and Real-Time PCR, singolplex and duplex. The

PCR efficiency has been between 89.91% and 97.04%, with a limit of detection of 6.25 ng of DNA target.

The second step of the research work was the development of methods to determine the varietal composition of oil using Simple Sequence Repeat markers (SSRs or microsatellites). DNA extracted from twenty-one monovarietal olive oils produced from sixteen olive cultivars were analyzed by nine nuclear and two chloroplastic microsatellite markers. For each marker, the amplificability of DNA, the allelic correspondence of SSR profiles with reference leaves and the reproducibility in different DNA extractions were estimated. The reliability of olive oil SSR profiles can be assessed conducting several independent DNA extractions from the same sample, this is needed because a great number of PCR inhibitors were present in olive oil, which can potentially lead to artifact and unreliable profiles. The results showed that the correspondence between profiles of oils and reference leaf cultivar was close to the 32% of the number of experiments conducted and the olive oil DNA extraction was the limiting step for reliability of SSR profiles. The reproducibility of a SSR profile with three different extractions ranged between 70% and 30% and it depends on microsatellite markers. The same parameters heavily depend on the type of olive oil: the amplificability ranges from 76% to 12% while the matches with the origin leaf cultivars varies from 72% to 2%. This means that the different chemical composition of the oil can affect the quality of DNA extracted and the PCR amplificability.

Chloroplastic microsatellites showed an efficiency, both in terms of amplificability and of correspondence with the reference cultivar leaves, that is much higher than that of nuclear markers. The percentages both of amplificability and total correspondence were respectively 64% and 69% for the two markers tested. The reproducibility was over 60%.

As DNA in olive oil is highly degraded, to improve the efficiency of molecular markers we tried to reduce the size of amplicons for the microsatellites. To reduce the amplicon size, new primers have been redesigned closer to the microsatellite region.

The last part of this work was devoted to assess the possibility to quantify through Real-Time PCR analysis the olive cultivars present in a multivarietal olive oil. For this purpose, the sequence of the gene oleosine, in which a SNP (Single Nucleotide Polymorphism) was detected, was used as target. Two TaqMan-MGB probes specific for SNP variants were designed and tested on an olive oil blend produced with cultivars carrying the two allelic variants.

The reactions carried out in duplex, showed that the probes were specific for the genotypes but that the amplification of DNA does not match the amount of the cultivars in the oil blending.

## Riassunto

Lo sviluppo di sistemi di tracciabilità molecolare per ricostruire attraverso la filiera la storia produttiva di un alimento hanno ormai assunto una funzione importante nel garantire l'origine e la sicurezza dei prodotti alimentari. La tracciabilità attraverso analisi molecolari costituisce un vantaggio rispetto al sistema attuale basato prevalentemente sull'uso di documentazione cartacea ed è un valido strumento in appoggio alle tecniche analitiche classiche.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di sviluppare e implementare metodologie genetiche e molecolari per la tracciabilità dei prodotti alimentari, prendendo come caso di studio l'olio di oliva.

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle piante più importanti per la produzione di olio nell'area del Mediterraneo. La sua coltivazione è in forte espansione e la richiesta dei prodotti da esso derivati è in significativo aumento, dato il loro utilizzo nelle diete alimentari grazie agli effetti benefici da esso dimostrati per la salute umana. La tutela della autenticità di origine di questo prodotto è quindi ormai una concreta esigenza, recepita anche dalla Unione Europea che ha istituito i marchi DOP (Denominazione di Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta) per proteggere gli oli di maggior pregio. Come tutti i prodotti di un certo valore anche l'olio di oliva può essere soggetto a frodi ed adulterazioni, ad esempio l'aggiunta di oli ottenuti da specie diverse dall'olivo o da cultivar di scarso pregio. L'analisi dei residui di DNA contenuti nell'olio di oliva può quindi consentire di individuare le cultivar di olivo di origine presenti o l'aggiunta di eventuali oli provenienti da altre specie.

La prima fase per svolgere un'analisi molecolare del DNA contenuto nell'olio è lo sviluppo e l'ottimizzazione di un metodo estrattivo. Un metodo commerciale, basato sull'uso di un kit e uno sperimentale sviluppato in laboratorio sono stati comparati per valutare l'effetto matrice dell'olio sulla resa estrattiva, il livello di purificazione del DNA, la quantità di campione iniziale per avere una resa adeguata di DNA, l'eventuale presenza di inibitori nell'estratto, i costi e i tempi di estrazione. Metodi di estrazione del DNA sono stati applicati anche a oli di semi comunemente utilizzati per le sofisticazioni al fine di verificarne la presenza nell'olio di oliva.

L'analisi ha portato alla individuazione di un metodo di estrazione efficiente per il recupero del DNA sia dall'olio di oliva che dall'olio di semi. Amplificazioni con primer disegnati per produrre ampliconi di diversa grandezza hanno evidenziato che dimensioni inferiori alle 100 bp consentono di amplificare con successo il DNA bersaglio in estrazioni da olio di oliva e di semi.

Una volta sviluppato e validato il metodo di estrazione, il lavoro è stato articolato in due filoni di ricerca: i) sviluppo di metodi per identificare le adulterazioni con oli di specie diverse dall'olio di

oliva; *ii*) sviluppo di metodiche basate sull'uso marcatori molecolari per stabilire la composizione varietale di oli di oliva pregiati.

Attraverso la tecnica della Real-Time PCR, l'analisi dei profili di dissociazione degli ampliconi ha consentito l'identificazione di tracce di DNA di nocciola, mais e girasole in miscele di olio di oliva. L'analisi ha portato alla individuazione di temperature di dissociazione caratteristiche per gli ampliconi derivanti dai tre oli di interesse, sia in PCR singola che duplex. L'efficienza di amplificazione delle reazioni sviluppate è risultata compresa tra 89.91% e 97.04% con un limite di rivelazione di 6.25 ng di DNA bersaglio.

La seconda parte del lavoro di ricerca svolto è stata mirata allo sviluppo di metodologie per determinare la composizione varietale di un olio utilizzando marcatori molecolari microsatelliti.

Undici microsatelliti, nove nucleari e due cloroplastici, sono stati utilizzati per analizzare 21 oli di oliva monovarietali. Sono stati valutati diversi parametri: l'amplificabilità in PCR, la corrispondenza allelica con la foglia di olivo della cultivar di origine dell'olio e la riproducibilità dei profili microsatelliti in diverse estrazioni di olio. L'affidabilità dei profili SSR (Simple Sequence Repeat) dell'olio d'oliva può essere stabilita solo nell'analisi di più estrazioni di DNA indipendenti dallo stesso campione. L'olio di oliva contiene, infatti, un ampio numero di inibitori di PCR, che potenzialmente possono portare a profili artefatti e non affidabili.

I risultati hanno mostrato che la corrispondenza tra profili degli oli e quelli delle piante di origine sul totale delle repliche di PCR eseguite era vicina al 32% e che l'estrazione di DNA dall'olio d'oliva era il passaggio limitante per l'affidabilità dei profili SSR dovuta alla complessità della matrice analizzata. La riproducibilità di un profilo SSR con tre diverse estrazioni oscilla tra il 70% e il 30% e dipende dal tipo di microsatellite usato. Gli stessi parametri dipendono fortemente anche dal tipo di olio di oliva analizzato: l'amplificabilità varia dal 76% al 12%, mentre la corrispondenza con la foglia della cultivar di origine varia dal 72% al 2%. Questo significa che la diversa composizione chimica degli oli può influire sulla qualità del DNA estratto e quindi sulla successiva amplificazione in PCR.

I microsatelliti cloroplastici presentano un'efficienza sia in termini di amplificabilità che di corrispondenza con la cultivar di origine dell'olio nettamente più alta rispetto a quella dei marcatori nucleari. I valori percentuali sia di amplificabilità che di corrispondenza totale sono rispettivamente del 64% e del 69% per i due marcatori testati. La riproducibilità si attesta oltre il 60%. Poiché il DNA nell'olio di oliva è degradato, per migliorare l'efficienza dell'analisi molecolare si è cercato di ridurre le dimensioni degli ampliconi relativi ai microsatelliti. Sono state perciò ridisegnate nuove coppie di primer più vicine alla ripetizione microsatellitare riducendo le dimensioni dell'amplicone. Questi nuovi primer hanno portato ad un certo



miglioramento dell'amplificabilità e della corrispondenza totale con la cultivar di origine dell'olio.

Nell'ultima parte del lavoro è stata valutata la possibilità di utilizzare la Real-Time PCR per quantificare le cultivar di olivo presenti in miscele di olio. A questo scopo è stato preso in considerazione un marcatore SNP (Single Nucleotide Polymorphism) identificato all'interno della sequenza del gene per l'oleosina su cui sono state disegnate due sonde TaqMan-MGB specifiche per le due varianti alleliche. Dopo l'ottimizzazione della reazione e le prove su miscele di DNA estratto da foglia di olivo, le analisi sono state condotte su miscele di oli prodotti dalle cultivar con le due varianti alleliche del polimorfismo SNP. Le reazioni condotte in duplex, hanno mostrato come le amplificazioni fossero specifiche per i singoli genotipi ma che l'amplificazione del DNA non corrispondeva alle quantità relative delle cultivar nelle miscele di olio.

## Introduzione

### Sicurezza dei prodotti alimentari e politica dell'Unione Europea

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 conto della 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 "dalla fattoria 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.*

Essa si basa su una combinazione di requisiti elevati per i prodotti alimentari e per la salute e il benessere degli animali e delle piante, requisiti che si applicano sia ai beni prodotti all'interno dell'Unione Europea che a quelli importati. Questa strategia poggia su tre pilastri:

- la legislazione sulla sicurezza dei prodotti alimentari e dei mangimi per animali;
- una consulenza scientifica valida a fondamento delle decisioni;
- attuazione e controllo della normativa.

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 vari anni prima. Sono seguite norme igieniche aggiornate, entrate in vigore il 1° Gennaio 2006. Oltre alla legislazione generale valida per tutti i prodotti alimentari e i mangimi, l'Unione Europea ha adottato leggi specifiche riguardanti aspetti particolari della sicurezza degli alimenti e determinati prodotti alimentari; siano citati a titolo d'esempio l'uso dei pesticidi, degli integratori alimentari, dei coloranti, degli antibiotici e degli ormoni nella produzione degli alimenti, l'aggiunta di vitamine, minerali e sostanze analoghe negli alimenti, i prodotti che sono a contatto con gli alimenti, come gli imballaggi, le carni, la gelatina e i prodotti lattiero-caseari. Norme rigorose disciplinano la commercializzazione, la vendita, l'etichettatura e la tracciabilità dei raccolti e dei prodotti alimentari che contengono organismi geneticamente modificati (OGM). Quando nuovi Stati

membri aderiscono all'UE, ed entrano quindi a far parte del mercato unico europeo, vengono spesso adottate misure transitorie per consentire loro di adeguarsi alle rigorose norme europee per la sicurezza degli alimenti. Durante il periodo di adattamento i loro prodotti alimentari che non rispondono a queste norme non possono però essere esportati verso altri paesi dell'Unione Europea (<http://europa.eu/pol/food>).

## **Biotecnologie e sicurezza alimentare**

Oggigiorno nell'ambito della moderna società, la ricerca di un rapporto ottimale tra sapere e salute alimentare, diviene una necessaria norma di prevenzione per il benessere dei cittadini. La sicurezza alimentare è considerata perciò una delle priorità principali sia dalla opinione pubblica che dalle istituzioni.

Diviene quindi un'esigenza crescente fare in modo che tutta la produzione agro-alimentare ed industriale del cibo venga garantita da una certificazione che ne attesti l'origine e le modificazioni che la materia prima ha subito lungo la filiera, essendo ormai le tecniche di produzione e lavorazione sempre più complesse. 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 in questo settore per quanto riguarda l'identificazione varietale, 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). Esse risultano essere applicabili alla selezione assistita con marcatori molecolari (MAS), agli studi tassonomici, nonché a tutte le attività correlate con la pura ricerca scientifica, possono essere affrontati con approcci di tipo biotecnologico (Gentile, 2003).

La sicurezza alimentare risulta quindi essere un settore di notevole interesse per ciò che riguarda il campo biotecnologico.

La produzione agro-industriale degli alimenti incorre spesso in inevitabili alterazioni della produzione "biologico-naturale". Pertanto, pur perseguendo obiettivi di costante miglioramento delle procedure di trasformazione, nella produzione industriale di massa è praticamente inevitabile l'utilizzazione di fertilizzanti, antiparassitari, anticrittogamici, diserbanti, l'attuazione di manipolazioni chimico-industriali, con additivi, conservanti, coloranti, aromi artificiali e bio-

chimici, ormoni e antibiotici (Manzelli, 2004). Tutto ciò accresce l'incertezza ed il rischio per la salute fisica dell'uomo. Il concetto di qualità diviene quindi di notevole importanza in considerazione del fatto, che non può essere relegato alle sole qualità organolettiche del prodotto, di conseguenza i fattori di valutazione dovranno adeguarsi a nuovi parametri.

E' pertanto in questa prospettiva che la sicurezza alimentare diviene un fatto culturale-sociale determinante, che implica anche una ampia crescita culturale ottenibile mediante un sistema di educazione permanente dei cittadini in questo campo. Obiettivo finale è quindi 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. Concetti che sono tra loro strettamente connessi 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. Nella fattispecie si rende quanto mai necessario difendere e valorizzare le materie prime, il territorio e la biodiversità (Federalimentare, Federazione Italiana dell'Industria Alimentare, 2004).

## **Libro Bianco sulla sicurezza alimentare**

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 avviene attraverso un insieme di azioni atte a completare e modernizzare la legislazione dell'Unione Europea in materia di alimentazione, per renderla più coerente, più comprensibile e più elastica. Ciò dovrebbe consentire una sua migliore applicazione e fornire maggiore trasparenza ai consumatori garantendo un alto grado di sicurezza nel settore alimentare. Problematiche riguardanti l'alimentazione umana e animale (encefalopatia bovina spongiforme, diossina) hanno messo in evidenza le carenze nella concezione e nell'applicazione della regolamentazione alimentare in seno all'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). L'attuazione delle normative contenute in questo testo ha portato alla istituzione di una Autorità Alimentare Europea (Food Authority) indipendente, che in collaborazione con le Agenzie Nazionali, fornisce pareri scientifici competenti sugli aspetti legati alla sicurezza degli alimenti. Essa, inoltre, serve da riferimento per la gestione di sistemi di

allarme rapido e per la comunicazione con i consumatori in materia di sicurezza alimentare e di questioni sanitarie. Infine, nuove norme europee in materia di etichettatura, regolamentano l'intera filiera alimentare, compresa quella mangimistica, per attribuire in modo chiaro le responsabilità primarie alle industrie, ai produttori ed ai fornitori. Un ruolo di notevole importanza all'interno del Libro Bianco viene dato alla figura dei consumatori e al loro diritto di ottenere informazioni sulla qualità degli alimenti e sui loro ingredienti in modo chiaro, per consentire scelte consapevoli. Quindi, l'etichettatura in base alle direttive del Libro Bianco, deve diventare un utile strumento per permettere al consumatore di avere tutte le informazioni possibili su un prodotto (<http://www.ambientediritto.it>).

### **Tracciabilità e regolamentazione comunitaria**

Nell'accezione più recente si parla di tracciabilità di filiera come l'identificazione di tutte le aziende che hanno contribuito alla formazione del prodotto "dai primi anelli della catena fino al consumatore". Oggi la qualità non può essere più legata al singolo prodotto-azienda ma va intesa come qualità a livello di sistema. Ogni organizzazione è al tempo stesso fornitrice ed erogatrice di qualità nei confronti degli anelli contigui della filiera. La tracciabilità di filiera quindi rappresenta un potente strumento di controllo dei processi. La gestione dei flussi dei materiali consente: di conoscere in ogni momento cosa si sta facendo, di individuare con maggiore rapidità e sicurezza le cause di non conformità, di gestire nel tempo operazioni e materiali in vista del miglioramento e della standardizzazione della qualità e della riduzione dei costi (<http://www.agroqualita.it/tracciabilita>). Esistono tre tipi di tracciabilità:

1. "Upstream traceability" (tracciabilità a monte), che riguarda le fasi antecedenti la produzione, coltivazione agricola, trasporti, prima trasformazione;
2. "Production traceability" (tracciabilità durante la produzione), che concerne la fase di produzione del prodotto alimentare;
3. "Downstream traceability" (tracciabilità a valle), che riguarda la distribuzione sino al consumatore.

Le aziende secondo il Regolamento CE n. 178/2002, dovranno essere dotate di sistemi atti a consentire la tracciabilità dei beni agroalimentari, prodotti e immessi sul mercato, con il fine di localizzare il prodotto in qualsiasi punto della catena di distribuzione e di individuare l'esatto allevamento o campo da cui la materia prima proviene. Al punto 1 dell'articolo 18 del Regolamento CE n. 178/2002 è riportata infatti tale indicazione: *"E' disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, dei*

*mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime*". Al punto 2 dello stesso articolo "gli operatori del settore alimentare...devono essere in grado di individuare chi abbia loro fornito" e il punto 3 "gli operatori del settore alimentare... devono disporre sistemi... per individuare le imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti..." che permettono di comprendere la natura e le basi di tale definizione di tracciabilità.

Tali definizioni dovrebbero permettere di porre in atto una precisa identificazione degli ingredienti, degli intermediari e del prodotto finito. Tra gli attuali sistemi di identificazione possono essere annoverati i più conosciuti che sono rappresentati : dall'etichettatura, dal codice a barre e dai microchip.

L'Unione Europea ha emanato un "Testo Unico" sull'etichettatura dei prodotti alimentari e bevande, si tratta della Direttiva n. 2000/13/CE, concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità.

In Italia, la materia è disciplinata, in generale, dal DLgs. n.109/1992, (attuazione delle direttive 89/395/CEE e 89/396 CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari), dal DLgs. n.68/2000 (Attuazione della direttiva 97/4/CE, che modifica la direttiva 79/112/CEE, in materia di etichettatura, presentazione e pubblicità dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale) e dal DLgs. n.181/2003 (attuazione della direttiva 2000/13/CE concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità emanato in attuazione della Direttiva 2000/13/CE.).

Questi decreti disciplinano in maniera rigorosa le caratteristiche delle indicazioni da riportare all'esterno delle confezioni. Il campo di applicazione comprende l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari.

E' possibile riassumerne in questo modo i punti fondamentali:

1. etichettatura: l'insieme delle menzioni, indicazioni, marchi di fabbrica o di commercio; immagini o simboli che si riferiscono al prodotto e figurano direttamente sull'imballaggio, su un'etichetta appostavi, su dispositivi di chiusura, su cartelli, anelli e fascette legati al prodotto medesimo, infine, immagini o simboli sui documenti di accompagnamento;
2. presentazione: la forma o l'aspetto conferito ai prodotti alimentari o alla loro confezione, il materiale utilizzato per il loro confezionamento, il modo in cui sono disposti sui banchi di vendita, l'ambiente nel quale sono esposti;
3. pubblicità: le regole di correttezza nel pubblicizzare le caratteristiche dei prodotti alimentari, in particolare con riferimento alla natura, all'identità, alla qualità, alla

composizione, alla quantità, alla durabilità, al luogo di origine o di provenienza, al modo di ottenimento o di fabbricazione.

## **“Food Genomics” e tracciabilità molecolare**

L'aumentata sensibilità dei consumatori sulle tematiche riguardanti la composizione in materie prime degli alimenti ha portato alla necessità di riverificare le normative per l'etichettatura dei prodotti alimentari. Un'etichettatura non corretta rappresenta una frode commerciale.

Le frodi alimentari 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 diverso o più basso costo economico. L'aggiunta di orzo torrefatto nel caffè macinato, l'aggiunta di acqua al vino o al latte, rappresentano esempi di adulterazioni: L'adulterazione può anche consistere nell'asportazione di una parte pregiata del prodotto, ad esempio togliendo dei grassi al latte.

Le sofisticazioni sono invece 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. Il miglioramento di un prodotto è consentito, ma occorre rispettare le norme di legge 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, in quanto consistono nella sostituzione di un prodotto con un altro, per esempio l'utilizzo della margarina al posto del burro.

Le contraffazioni 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).

Una etichettatura “fraudolenta” può inoltre avere serie conseguenze per la salute umana, specialmente nei confronti di consumatori allergici. Le allergie alimentari sono considerate un reale problema pubblico per la tutela della salute umana, 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 inoltre necessaria per una scelta consapevole da parte del consumatore, in coerenza con stili di vita, come il vegetarianismo o credi religiosi. 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. 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; Ferriera *et al.*, 2003).

Le metodiche molecolari basate sulla PCR (Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.*, 1987) 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 "highthroughput" quali microarray e micro-chips abbinati ad una continua crescita dei sistemi di miniaturizzazione potranno permettere lo sviluppo di sistemi sempre più rapidi e di facile applicazione.

Il DNA è inoltre più stabile rispetto alle proteine, presente in tutti i tessuti, più resistente alle alte temperature, tipiche dei processi industriali di preparazione degli alimenti.

La PCR permette di amplificare sequenze specifiche partendo sia da DNA che da RNA analizzando estratti di varia natura, anche con composizione estremamente complesse come ad esempio: sangue, capelli, tessuti di diversa origine, alimenti o anche su resti archeologici datati milioni di anni. Negli ultimi anni gli sviluppi nel campo della genomica, della bioinformatica, 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 di un nuovo approccio di grande importanza per la tracciabilità: la "Food Genomics".

Con questo termine si intende l'applicazione degli studi sul genoma degli organismi da cui si ricavano le materie prime per stabilire l'autenticità degli alimenti. Gli sviluppi delle metodologie molecolari hanno consentito di individuare differenze nel DNA di individui appartenenti a popolazioni, specie o generi diversi che consentono la loro identificazione o classificazione. Tali sequenze identificative sono dette "marcatori molecolari". Analizzando i residui di DNA presenti nell'alimento finito è possibile risalire all'organismo che ha fornito la materia prima e stabilire la conformità con quanto dichiarato dal produttore (Marmioli *et al.*, 2003).



## L'estrazione del DNA da matrici complesse

La difficoltà maggiore nelle analisi nell'analisi del DNA proveniente da matrici complesse, come possono essere i prodotti alimentari, è rappresentata certamente dalla estrazione. Risulta quindi di fondamentale importanza l'ottimizzazione delle metodiche estrattive attraverso il bilanciamento di diversi parametri. Un buon metodo di estrazione dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: elevata resa finale, buona qualità del DNA estratto, rapidità di esecuzione, economicità e capacità di processare contemporaneamente 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), il metodo estrattivo deve essere ottimizzato per eliminare questi possibili inquinanti.

### Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti.

La lavorazione industriale delle materie necessita spesso di processi caratterizzati da trattamenti termici (cottura, sterilizzazione, pastorizzazione), alte pressioni, modificazioni del pH, irradiazione, disidratazione e reidratazione. Per esempio la preparazione di molti prodotti alimentari prevede temperature superiori ai 100°C per tempi dai 30 ai 60 minuti a pH 4. Il processamento termico è la causa principale della frammentazione del DNA. Bauer *et al.*, (2003) hanno evidenziato come durante il trattamento a caldo nella preparazione del tofu dalla soia, la massima lunghezza dei frammenti di DNA individuabili erano inferiore alle 1000 bp. Altri fattori che possono determinare variazioni alla struttura del DNA sono rappresentati da eventuali enzimi degradativi presenti negli ingredienti, o condizioni chimiche che possono accelerare la degradazione del DNA stesso. Le variazioni di pH sono una delle principali cause della perdita della struttura primaria della doppia elica del DNA dovuta alle diverse reazioni di ossidazione e idrolisi, che possono portare alla depurinazione e alla conseguente  $\beta$ -eliminazione della base.

### Qualità del DNA e contaminanti

In seguito ai trattamenti subiti durante la lavorazione, il DNA estratto da matrici alimentari risulta quindi molto degradato e presente in piccole quantità, ovvero a basso numero di copie. La possibilità di poter identificare e amplificare mediante PCR questi frammenti in modo corretto diminuisce drasticamente. 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, risulta quindi necessario operare in condizioni di sterilità e introducendo controlli negativi sia di

estrazione che di amplificazioni (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 *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1998), sono da considerarsi come tali anche 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 e la purificazione degli acidi nucleici, *iii*) inibire le reazioni di amplificazione (Wilson *et al.*, 1997). L'assenza di amplificazione è quindi spesso imputabile alla presenza di inibitori e non solo alla mancata estrazione del DNA dal campione.

Nel caso dell'olio di oliva è necessario fare estrema attenzione a purificare gli acidi nucleici, eliminando eventuali inibitori come i polifenoli e altre molecole presenti nei prodotti di origine vegetale che contaminano inevitabilmente il DNA. D'altro canto spesso le rese dei metodi di estrazione utilizzati sono basse proprio perché si cerca di eliminare queste piccole molecole a scapito della quantità di DNA purificato.

### **Artefatti della PCR**

L'analisi del DNA attraverso la PCR su campioni caratterizzati da un alto livello di degradazione e in basse quantità risulta spesso complicata dalla possibile generazione di artefatti e errori durante la fase di amplificazione. Come nel caso delle analisi sul DNA antico, anche nella tracciabilità molecolare degli alimenti diventa di fondamentale importanza rispettare rigorosi parametri per una 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 della PCR stessa. Ogni estrazione dovrebbe includere almeno un' estrazione di controllo, che non contenga nessun campione, ma che venga trattato allo stesso modo. Similarmente, 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. Questo serve a due scopi: *i*) permettere l'identificazione di contaminazioni sporadiche; *ii*) individuare eventuali cambiamenti negli ampliconi. Un altro parametro da valutare è la possibilità di quantificare il numero di molecole di DNA amplificabile, l'efficienza di amplificazione dovrebbe essere inversamente correlata con la lunghezza dell'amplificato atteso.

## **L'utilizzo della tecnica PCR per l'identificazione delle frodi**

La “*food authenticity*” e gli standard qualitativi proposti dalla recente normativa europea, in tema di sicurezza alimentare, hanno reso sempre più attuale il concetto di tracciabilità degli alimenti, dei mangimi, e dei loro ingredienti lungo tutta la filiera produttiva (regolamento CE n. 178/2002). La “tracciabilità molecolare” derivante dall'identificazione e dalla caratterizzazione di specie animali e vegetali, diventa uno strumento indispensabile per smascherare eventuali frodi perpetrate ai danni del consumatore, e per la certificazione di autenticità dei prodotti di origine controllata.

### **Identificazione delle componenti in prodotti a base di carne**

In questi ultimi anni nel settore zootecnico si sono avuti notevoli sviluppi nello studio del genoma degli animali impiegati nelle produzioni alimentari, specialmente in prospettiva di un utilizzo applicativo di tali conoscenze. Basti pensare a tutte le procedure di tracciabilità dei prodotti alimentari di origine animale: tali tecniche si basano, di fatto, sull'utilizzo del DNA al fine di garantire l'esatta e veritiera provenienza degli alimenti (Lasagna *et al.*, 2005).

Una adulterazione frequente nei 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 a problemi di intolleranza, allergie e all'introduzione di microrganismi patogeni peculiari di questa specie. La presenza di carne di suino in miscele di carne fresca di suino e manzo è stata identificata per la prima volta nel 1994 da Meyer *et al.*, utilizzando la metodica della PCR con primer specifici disegnati sul gene suino codificante per l'ormone della crescita, tracce di carne di maiale sono state rilevate con una soglia del 2% (w/w). Attraverso la tecnica PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) utilizzando sempre primer specifici per il gene mitocondriale del citocromo b il limite di rivelazione della carne di suino in preparati di carne di manzo è stato abbassato ulteriormente, permettendo di rilevare tracce di maiale fino al 1% (w/w). (Meyer *et al.*, 1995). Oggi l'analisi del gene codificante il citocromo b è stata universalmente adottata per identificare specie animali e aviarie nei prodotti di macelleria e nei prodotti ittici (Aida *et al.*, 2007; Che *et al.*, 2007). Questo gene localizzato nel DNA mitocondriale è multicopia, presenta quindi il vantaggio di essere facilmente identificabile, i mitocondri sono inoltre più resistenti al processamento termico tipico delle preparazioni industriali (Wolfe and Primorse, 2004). Nel lavoro di Laube *et al.*, (2003) viene 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).

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.(Lopez *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2006). La PCR si rivela inoltre un utile strumento in grado di affiancare le normali analisi microscopiche, nella determinazione della presenza di resti animali in mangimi per la zootecnia.(Martin *et al.*, 2007).

### **Identificazione delle componenti in 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 attualmente 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 può essere 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 falsamente dichiarate code di rospo (*Lophius piscatorius*).

Oltre ai tetraodontidae, anche altre famiglie sono considerate velenose: canthigasteridae, diodontidae, molidae (D.Lgs 531/92 art. 5), a cui ne vanno aggiunte altre quali alcuni squaliformi (*Somniosus microcephalus*, *Carcharhinus leucas*) ed i gempilidae (*Ruvettus pretiosus*, *Lepidocibium flavobrunneum*), questi ultimi oggetto di uno specifico divieto di commercializzazione sul territorio nazionale data la presenza di tali pesci 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). Un altro esempio di frode nel settore ittico è rappresentato dalla sostituzione di bivalvi sgusciati precotti nostrani con bivalvi esotici, non sempre raccolti in aree controllate per la presenza di biotossine (termoresistenti); oppure 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 questa 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 risultate essere l'IsoElettroFocalizzazione (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 che congelati. Negli Stati Uniti la Food and Drug Administration ha realizzato una "Regulatory Fish Enciclopedia" dove, per quasi un centinaio di specie ittiche oggetto di commercio, vengono fornite informazioni riguardo le caratteristiche morfologiche, i tracciati della IEF metodo AOAC (Association Of Analytical Communities, 1990), ed in futuro sarà possibile reperire informazioni sulle sequenze di DNA.

Le metodiche basate sulla PCR per l'identificazione delle specie ittiche comprendono amplificazioni su DNA genomico e mitocondriale (Asenio *et al.*, 2001; Pascoal *et al.*, 2003), utilizzo di primer specie specifici (Cespedes *et al.*, 1998), PCR RFLP (Hold *et al.*, 2001; Quintiero *et al.*, 2001) PCR SSCP (Asenio *et al.*, 2001) e RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (Asenio *et al.*, 2002).

Wolf *et al.*, (2004) descrivono una semplice metodica basata sulla tecnica PCR RFLP per identificare ventitre diverse specie di pesce tra cui, salmone, tonno e merluzzo bianco. Sempre attraverso l'uso di questa tecnica è stato possibile discriminare tra carne proveniente da dieci specie di salmone fresco, amplificando una specifica regione del citocromo b, i pattern di restrizione ottenuti sono stati poi visualizzati su gel di poliacrilammide. Il metodo è stato poi validato applicandolo ad un vasta gamma di prodotti lavorati contenenti salmone, in un caso è stata rilevata la presenza di carne di trota in un prodotto dove veniva dichiarato 100% salmone (Russell *et al.*, 2000).

L'elettroforesi capillare abbinata alla metodica 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 di questo lavoro 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).

La sostituzione di carne di sogliola (*Solea solea*) con quella di halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) rappresenta un'altra possibile frode a livello commerciale; dopo la lavorazione diventa molto difficile identificare in base a caratteristiche morfologiche un filetto di sogliola da uno di halibut. La metodica PCR RFLP è stata applicata con successo a questo tipo di matrice analizzando sequenze mitocondriali del citocromo b sia con primer specifici (Lahiff *et al.*, 2001) che attraverso la metodica RFLP (Skurikhina *et al.*, 2008), riuscendo a discriminare tra queste

due differenti specie ittiche. I geni mitocondriali rispetto a quelli nucleari presentano numerosi vantaggi: sono multicopia, quindi facilmente amplificabili, sono caratterizzati da un livello di polimorfismo maggiore, risultano quindi utili per analisi sia inter che infra-specifiche. Inoltre il genoma mitocondriale è stato caratterizzato per molti organismi.

Un'altra specie ittica soggetta a frequenti adulterazioni e sofisticazione è il tonno, in particolare quello lavorato e inscatolato. I maggiori problemi derivano dalla sostituzione di specie appartenenti alla stessa famiglia *Thunnidae*, ma anche all'utilizzo di altre tipologie di pesce, come lo squalo. Rehbein *et al.*, (1998) hanno usato 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 che potevano essere utilizzati 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. La percentuale di successo nell'identificazione delle specie in questo studio è stata del 96% (Hold *et al.*, 2001), questo metodo è stato successivamente utilizzato per identificare correttamente le specie in campioni di pesce mescolato e processato. Più tardi, è stato scoperto che questo amplicone di 464 bp era altamente polimorfico in sogliola e questo ha permesso la corretta identificazione di ventuno su ventiquattro specie (Hold *et al.*, 2001). L'approccio quantitativo è stato usato nel 2007 da Pardo *et al.*, per sviluppare un saggio basato sull'impiego della tecnologia TaqMan, per discriminare tra tonno dalle pinne gialle, il più pregiato (*Thunnidae albacares*) e tonno dalle pinne blu (*Thunnidae allunga*) meno pregiato e costoso attraverso sonde disegnate sulla sequenza del gene 16S ribosomiale.

### **Identificazione di molluschi**

L'identificazione di specie di molluschi commerciali, risulta altrettanto importante per una corretta etichettatura. Le problematiche inerenti alla commercializzazione di preparazioni alimentari contenenti crostacei o molluschi sono divenute un serio problema per la categoria dei consumatori allergici a queste tipologie di prodotti. La recente Direttiva 2003/89/CE, specifica che l'etichettatura deve riportare gli ingredienti che possono essere potenzialmente allergizzanti, tra questi 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 quella economicamente più costosa, maggiormente apprezzata del consumatore e quindi soggetta più frequentemente a sostituzioni

fraudolente. Per differenziare tra queste tre specie Fernández *et al.*, (2002) hanno sviluppato una tecnica basata sui marcatori PCR RFLP, utilizzando primer specie specifici per il gene dell'actina. In un altro lavoro dei medesimi autori è stata sviluppata un'analisi attraverso la tecnica PCR SSCP sempre sul medesimo gene che ha permesso di distinguere tra le tre diverse specie (Fernandez *et al.*, 2003).

Le cozze sono un altro prodotto ittico di notevole importanza economica, sono rappresentate da un vasto numero di genere e di specie, 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. L'utilizzo di tecniche PCR-RFLP e di sequenziamento sono stati sviluppati per verificare la possibilità di poter tracciare a livello molecolare 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). 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.

### **Identificazione dei prodotti lattiero-caseari**

Le più comuni frodi sono rappresentate dalla sostituzione di latte di mucca ad alto valore con latte proveniente da altre specie. L'identificazione della specie di provenienza 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.*, 2002). Il riscontro di latte diverso da quello contemplato nei disciplinari di produzione è un reato di particolare gravità e si configura come frode in commercio. Le metodiche 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. Differenti approcci basati sulla PCR sono stati da allora sviluppati per differenziare latte proveniente da vacca, pecora, capra e bufala (Bania *et al.*, 2001; Mayer, 2005). Branciarì *et al.*, (2000) hanno dimostrato che è possibile estrarre DNA amplificabile da latte pastorizzato, filtrato, ultrafiltrato e in polvere. La possibilità di poter operare non solo sulle diverse tipologie di latte ma anche su formaggi per identificare eventuali adulterazioni con latte non conforme ai disciplinari di produzione è stata dimostrata in diverse ricerche (Plath *et al.*, 1997; Mafra *et al.*, 2004; Meyer, 2005)

Plath *et al.*, (1997) hanno sviluppato utilizzando la metodica PCR RFLP, amplificando il gene della beta-caseina, un'analisi in grado di discriminare tra latte proveniente da vacca, pecora, capra e bufala, la stessa metodica è stata poi applicata a formaggi preparati con miscele standard di queste differenti tipi di latte, con un limite di detection dello 0.5% (w/w).

Utilizzando primer specie specifici mitocondriali, Maudet and Taberlet (2001) hanno abbassato il limite di rivelazione portandolo 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 riportano in un altro lavoro 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 analizzare 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 sicuramente tra i prodotti maggiormente a rischio di adulterazione per l'impiego, durante il processo di lavorazione, di latte di specie diversa da quella indicata dal disciplinare. A tale proposito il più utilizzato è 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 2001 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 testata nella 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).

Un altro esempio di adulterazioni identificabili attraverso le metodiche di PCR è la sostituzione con latte di capra in modo fraudolento a latte proveniente da ovini. Una PCR è stata applicata con successo sulla sequenza mitocondriale 12S rRNA per la identificazione di latte di capra in formaggi dichiarati di ovino con 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 in un intervallo tra 0.6% e 10% (w/w). (Fajardo *et al.*, 2007).



## Identificazione di allergeni

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 può essere il caso dei cereali (Terzi *et al.*, 2005) o dei legumi (Weder *et al.*, 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) che sono potenzialmente dannosi 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. Infatti l'assunzione di glutine, anche in piccole dosi, può causare danni. La dieta senza glutine, condotta con rigore, è l'unica terapia che garantisce al celiaco un perfetto 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 possono contenere prolamine derivati dal frumento, grano duro, riso, orzo, avena, in una percentuale non superiore allo 0.002% (w/w) o essere prodotti con alimenti che contengono glutine derivato da frumento, grano duro, riso, orzo, avena in una percentuale non superiore allo 0.02% (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 stato sviluppato da Koppel *et al.*, (1998) utilizzando primer specifici in grado di identificare una contaminazione da glutine inferiore all'1% (w/w) in diversi prodotti commerciali. Una 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 realizzate in diverse 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 l'allergene anche in modo accidentale. Viste le conseguenze, anche molto gravi, di una reazione allergica, si rende sempre più importante la necessità di adottare sistemi in grado di monitorare le possibili "cross-contaminations" durante la produzione.

La nocciola (*Corylus avellana*) è un potenziale allergene spesso usata come ingrediente in molti prodotti alimentari, sia come pasta sia come olio. Esistono molti metodi sviluppati per la rilevazione di tracce di nocciola negli alimenti. Uno dei primi è stata una reazione di PCR convenzionale visualizzata su gel di agarosio (Holzauser *et al.*, 2000) che aveva come target la sequenza del gene Cor a 1; questa è stata poi progressivamente migliorata ed affinata, arrivando ai formati di analisi in Real-Time PCR e PCR-ELISA (Holzhäuser *et al.*, 2002). Holzhauser *et al.*, (2005) hanno dimostrato che l'analisi attraverso la PCR-ELISA rispetto ai saggi immunologici risulta maggiormente affidabile su campioni alimentari che hanno subito una forte processamento a livello termico, 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 (Nielsen *et al.*, 1999) sequenza-specifica (Germini *et al.*, 2005). Nel 2007 Píknova *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 hypogea*) 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).

## La Real-Time PCR

La PCR rappresenta lo strumento più importante per le analisi di tracciabilità molecolare. Questa tecnica si basa sull'impiego di un enzima, la *Taq* Polimerasi, che catalizza la reazione di amplificazione in vitro di una particolare sequenza di DNA a partire da una frazione di acido nucleico che viene utilizzato come stampo, mediante l'utilizzo di inneschi (primer) complementari a piccole porzioni di DNA stampo e di deossiribonucleotidi liberi.

Nel caso della Real-Time PCR (Lee *et al.*, 1993; Livak *et al.*, 1995) è possibile monitorare l'andamento della reazione mentre durante il suo svolgimento: in questo modo i dati che si ottengono a fine ciclo si possono utilizzare per effettuare una quantificazione del frammento amplificato.

Questo è possibile tramite l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR. La fluorescenza emessa viene quindi misurata in tempo reale da un apposito rivelatore, in questo modo è possibile monitorare l'amplificazione della sequenza target durante l'intera reazione di PCR fino al raggiungimento del punto di plateau.

La curva di amplificazione di un prodotto PCR è solo teoricamente esponenziale, ma in realtà, dopo la prima fase, assume un andamento rettilineo che progressivamente raggiunge un valore massimo al quale tendono tutti i campioni, a prescindere dalla quantità di DNA di partenza.

Un profilo di amplificazione è infatti composto da tre distinte fasi: esponenziale, in cui il prodotto di amplificazione aumenta seguendo l'equazione esponenziale  $2^n$ ; lineare, che porta al consumo dei reagenti e ad un conseguente rallentamento della cinetica della reazione; plateau, la reazione di amplificazione termina per mancanza di reagenti e il prodotto di amplificazione incomincia a degradarsi. La PCR tradizionale viene analizzata quando la reazione di amplificazione arriva al plateau, in questo modo non è possibile stabilire una correlazione diretta tra prodotto finale e la quantità iniziale di DNA realmente amplificato. I parametri che vengono valutati durante un'analisi in Real-Time PCR sono i seguenti:

1. la linea base della fluorescenza, denominata ciclo soglia che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato; cioè dove la fluorescenza supera del 5% il valore basale;
2. la linea soglia, parallela alla linea base, scelta dall'operatore in maniera da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase lineare;
3. il ciclo soglia ( $C_T$ ), specifico per ogni campione, identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia, in cui tutti i campioni raggiungono la stessa fluorescenza indipendentemente dal numero di cicli.

Il ciclo soglia ( $C_T$ ) è un indice preciso perché esiste una relazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA: minore è questa quantità e maggiore è il valore del ciclo soglia. Per potere effettuare una misurazione quantitativa è necessario effettuare parallelamente alla amplificazione della sequenza bersaglio, l'amplificazione di una serie di diluizioni di quantità note di DNA per poter realizzare una retta di taratura. Il valore di  $C_T$  di un campione sconosciuto verrà quindi interpolato nella retta di regressione che permetterà di estrapolare la sua quantità. Il rapporto tra il quantitativo di gene target considerato e il quantitativo totale di DNA analizzato permetterà di ottenere un accurato calcolo della percentuale di DNA target presente.

La Real-Time PCR trova quindi applicazioni in diversi settori: la quantificazione virale (Niesters, 2001; Mengelle, 2003, Katoha *et al.*, 2008), l'espressione genica (Geese *et al.*, 2008), la valutazione dell'efficienza di un farmaco (drug therapy efficacy) (Leruez-Ville *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2003; Kogure *et al.*, 2004), l'individuazione di patogeni (Uhl *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2004; Perandin *et al.*, 2004; Watzinger *et al.*, 2004; Perlin *et al.*, 2008), la genotipizzazione (Donohoe *et al.*, 2000; Lyon *et al.*, 2001; Waterfall e Cobb, 2002; Bennett *et al.*, 2003; Wittwer *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2008), applicazioni immunologiche (Adler *et al.*, 2003; Barletta *et al.*, 2004), la tracciabilità molecolare nel settore alimentare (Lockley *et al.*, 2000).

## **Chimiche impiegate per la rivelazione dell'amplificato**

I metodi che possono essere utilizzati per rivelare la presenza dell'amplificato possono essere di diverse tipologie.

### **SYBR<sup>®</sup> Green I**

La soluzione più economica è rappresentata dall'agente intercalante SYBR<sup>®</sup> Green I. Si tratta di un colorante fluorescente simile all'etidio bromuro che intercalandosi nella doppia elica, nel solco minore del DNA, incrementa di circa cento volte la sua fluorescenza, generando quindi un segnale visibile dal rivelatore proporzionale al numero di copie presenti. Il SYBR<sup>®</sup> Green I (e più recentemente il SYBER<sup>®</sup> Greener<sup>™</sup>) fa parte dei coloranti aspecifici sviluppati per le reazioni di PCR Real-Time: si tratta di una molecola fluorescente, in particolare una cianina asimmetrica la cui fluorescenza aumenta significativamente quando essa si trova complessata con il DNA a doppia elica: la molecola assorbe luce blu ( $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$ ) ed emette luce verde ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ). Il legame del fluoroforo al DNA avviene secondo due modalità diverse: il SYBR<sup>®</sup> Green, infatti, è in grado sia di intercalarsi tra le coppie di nucleotidi della doppia elica, sia di legarsi al solco minore che si forma nella molecola di DNA (Zipper *et al.*, 2004).

Questo modo di legare il DNA rende questo intercalante un reporter generalmente aspecifico, che permette di monitorare l'andamento della reazione, ma non consente di riconoscere a priori il prodotto amplificato che determina la comparsa del segnale di fluorescenza: basandosi solamente sul grafico di amplificazione non è possibile sapere se la fluorescenza è data dal target voluto o da un prodotto aspecifico, è però possibile riconoscere i vari prodotti in base all'analisi delle curve di melting.

Per Temperatura di melting ( $T_m$ ) si intende la temperatura alla quale un DNA a doppio filamento subisce denaturazione: dipende da diversi fattori, fra cui la lunghezza della molecola di DNA e la sua sequenza (ordine delle basi e percentuale di CG), ed è quindi caratteristica di ciascun frammento. Questo permette di identificare più specie di ampliconi prodotti nella stessa reazione e di eventuali amplificati aspecifici, come i dimeri di primer. Basandosi su questo principio, è stato dimostrato recentemente che è possibile sviluppare reazioni di Real-Time PCR multiplex con un numero anche elevato di target, purché i frammenti amplificati abbiano delle  $T_m$  sufficientemente differenti da essere distinguibili. Hernandez *et al.*, (2003) hanno sviluppato saggi di Real-Time PCR duplex e triplex con SYBR<sup>®</sup> Green I per identificare contemporaneamente più Organismi Geneticamente Modificati (diversi eventi di soia e mais); un altro gruppo di ricerca, invece, ha messo a punto una reazione di Real-Time duplex PCR per rilevare la presenza di batteri patogeni contaminanti delle acque e degli alimenti in campioni di feci (Fukushima *et al.*, 2003)

L'analisi della curva di dissociazione viene fatta dallo strumento al termine della reazione di amplificazione e consiste in un graduale innalzamento della temperatura, a partire da una temperatura prefissata (ad esempio 60°C) fino ad arrivare a circa 90-95°C. Lo strumento rileva il segnale di fluorescenza per tutta la durata dell'analisi: all'aumentare della temperatura il SYBR<sup>®</sup> Green si separa lentamente dalle molecole di DNA, ma al momento della denaturazione dei due filamenti si ha un drastico calo della fluorescenza.

Un software apposito trasforma i dati, relativi alla curva di melting, nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale: ne risulta un grafico che mostrerà un picco nel punto di massima pendenza della curva di melting, e tale picco sarà in corrispondenza della temperatura di melting di quello specifico amplicone.

### **Sonde FRET**

Un'altra tecnica per rivelare l'amplificato è data dall'utilizzo di sonde ad ibridazione, specifiche per la sequenza bersaglio, marcate con molecole fluorescenti (FRET, TaqMan<sup>™</sup>, Molecular Beacons, Scorpion). L'approccio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), sequenza specifico, è basato sul trasferimento di energia di risonanza fluorescente; un fluoroforo donatore,

eccitato da una opportuna lunghezza d'onda, trasferisce la sua energia ad un fluoroforo accettore solo nel momento in cui si trova nelle sue immediate vicinanze. Il fluoroforo accettore emette luce ad una lunghezza d'onda superiore che viene rilevata in canali specifici. Il principio FRET dipende dalla vicinanza sterica dei due fluorofori, presenti su due fluorofori diversi, che nel caso che riconoscessero delle sequenze bersaglio ibridano uno davanti all'altro. In assenza di amplificatore non avviene il trasferimento di energia, il risultato finale è che la quantità di coppie di sonde ibridate aumenta assieme al prodotto di PCR; il segnale è proporzionale alla quantità di amplicone accumulato.

Questo tipo di sonde sono state utilizzate con successo in campo medico per evidenziare la presenza di sostituzioni di base (SNP) in grado di indurre nel paziente gravi malattie genetiche (Hartshorn, 2002; Van Dijk, 2002).

### **Sonde TaqMan<sup>TM</sup>**

Nel saggio TaqMan<sup>TM</sup> (Holland *et al.*, 1991; Heid *et al.*, 1996), la sonda fluorogenica presenta all'estremità 5' un fluoroforo detto "reporter" ed all'estremità 3' una molecola detta "quencher", in una configurazione di questo tipo, la molecola "quencher" impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del fluoroforo reporter. La sonda è complementare alla sequenza del DNA bersaglio compresa tra il "forward" e il "reverse" primer. Durante l'amplificazione, nella fase di ibridazione, sia i primer che la sonda si ibridano al filamento stampo, la sonda essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi. Durante l'estensione del primer, la DNA polimerasi incontra la sonda ibridata che le sbarrava la strada e quindi la degrada utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica, portando così a termine la copiatura del frammento. Ogni qualvolta una sonda viene degradata dalla *Taq* polimerasi, si libera in soluzione una molecola fluorescente che genera il segnale rivelabile dallo strumento. Per ogni coppia di prodotto PCR, una sonda viene degradata. La sonda TaqMan fornisce un'ulteriore specificità, eliminando la possibilità che siano rivelati prodotti amplificati aspecifici dovuti al "mismatch" e alla formazione di primer dimer.

### **Molecular beacons**

Un approccio alternativo vede l'impiego dei "molecular beacons" (Mhlanga *et al.*, 2001; Vet *et al.*, 2002; Abravaya, 2003; Tan, 2004). Questi sono oligonucleotidi a singolo filamento in grado di ibridizzare con uno specifico amplicone. Quando non sono legati essi si presentano in forma di "hairpin loop" e nelle due estremità terminali della forcina sono situati il "quencher", costituito da due fluorofori ed il "reporter", in modo che il primo impedisca al secondo di emettere fluorescenza. La sonda nel momento in cui si viene a formare il prodotto di amplificazione si ibrida, l'eliminazione dell'ingombro sterico, permette al reporter di emettere fluorescenza (via FRET).

### **Sonde Scorpion™**

I primer Scorpion™ (Saha *et al.*, 2001; Solinas *et al.*, 2001; Terry *et al.*, 2002) sono oligonucleotidi che presentano una porzione funzionale nel primer e una estensione in 5'. L'estensione, in grado di ibridarsi a un prodotto specifico, garantisce la specificità della sonda, due sequenze autocomplementari portano alle loro estremità un fluoroforo ed un quencher.

Nella struttura ad “hairpin loop” il “quencher” forma una struttura non fluorescente interagendo con il fluoroforo. Quando il primer interviene nella PCR in presenza di un appropriata sequenza bersaglio, si ha l'estensione del prodotto che presenterà una zona complementare a quella contenuta nella parte della sonda che contiene il quencher ed il reporter. La sonda quindi, con un movimento simile ad un colpo di frusta, andrà ad appaiarsi a questa zona complementare neosintetizzata. Il fluoroforo di conseguenza si allontanerà dal “quencher” e potrà emettere la specifica fluorescenza.

### **UniPrimer™**

La reazione di amplificazione in Real-Time PCR può essere condotta anche utilizzando particolari primer chiamati UniPrimer™. L'UniPrimer™ consiste di una coda di 18 oligonucleotidi al 3' (Z sequence) e una sequenza intracomplementare al 5' marcata con molecole in grado di emettere fluorescenza per FRET.

La loro azione si svolge in maniera sequenziale ogni quattro cicli di amplificazione. Nel primo ciclo, il reverse primer che ha una particolare sequenza “tag”, permette la sintesi del filamento bersaglio. Nel secondo ciclo utilizzando come innesco la sequenza “tag”, il primer forward permette la sintesi di una sequenza complementare a quella sintetizzata precedentemente, a questo punto nel terzo ciclo l'UniPrimer™ ibrida con questa sequenza complementare attraverso la sequenza “tag”, la struttura ad “hairpin” blocca, attraverso il “quencher”, l'emissione di fluorescenza da parte del “reporter”, nell'ultimo passaggio la sintesi del filamento da parte della polimerasi apre la struttura a forcina permettendo l'emissione della fluorescenza da parte del reporter.

### **Sonde LNA™**

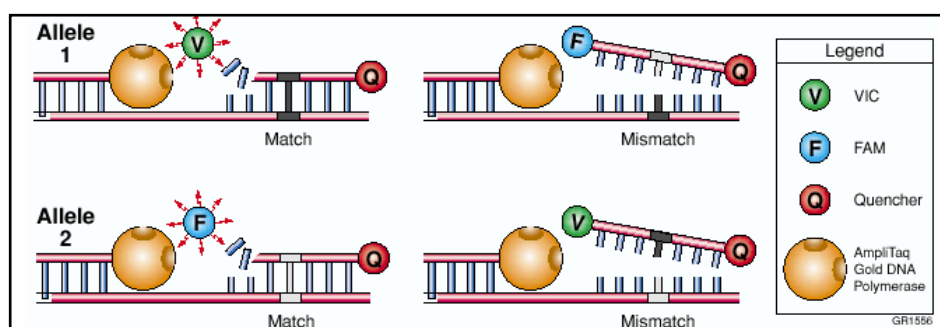
Un recente tipo di chimica che ha trovato una notevole espansione negli ultimi anni è quella che prevede l'impiego di sonde a LNA. Gli LNA® sono oligonucleotidi innovativi che contengono Locked Nucleic Acid™ (LNA), una base a LNA® è formata da un analogo di un acido nucleico che contiene un ponte metilenico tra il 2'-O e il 4'-C, questo ponte blocca in una conformazione 3'-endo l'anello ribofuranosico e chiude l'intera struttura in un anello rigido bicilico. Questa particolare conformazione presenta caratteristiche d'ibridazione superiori ed una elevata

biostabilità rispetto ai convenzionali oligonucleotidi a DNA. Cambiando la conformazione dell'elica e aumentando la stabilità del duplex, l'integrazione di basi LNA<sup>®</sup> nella sequenza degli oligonucleotidi apre nuove prospettive negli studi di affinità sia con il DNA che con l'RNA. Sonde a LNA<sup>®</sup> possono essere usati per migliorare tecniche che richiedano sonde altamente specifiche, come nell'analisi SNP, in studi d'espressione e applicazioni quantitative per l'identificazione di transgeni. (Latorra *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2008; Salvi *et al.*, 2008).

### La discriminazione allelica in Real-Time PCR

Una applicazione della Real-Time PCR è rappresentata dalla discriminazione allelica sfruttando i polimorfismi in singola base SNP (Livak *et al.*, 1995; Livak *et al.*, 1999).

In questo tipo di saggio, nella reazione di amplificazione viene inclusa una sonda marcata con un apposito reporter specifico per ciascun allele da individuare durante la reazione di amplificazione. Ciascuna sonda ibrida in modo specifico con la sequenza complementare compresa all'interno della sequenza su cui vengono opportunamente realizzate le sequenze dei primer. Nella figura seguente viene evidenziato il meccanismo di azione della reazione.



**Figura 1:** meccanismo di azione delle sonde nella analisi di discriminazione allelica in Real-Time PCR. (Tratto da TaqMan-MGB Probes for Allelic Discrimination. Applied Biosystems, 2000)

L'attività esonucleasica della polimerasi allontana il reporter dal “quencher” permettendo l'emissione della fluorescenza, che risulterà specifica nel caso si abbia una omozigosi per l'allele 1 o per l'allele 2. Entrambi i segnali saranno emessi nel caso di una eterozigosi. Per effettuare un'analisi ancora più affidabile e sensibile è possibile utilizzare particolari sonde denominate TaqMan MGB-NFQ.

Questi oligonucleotidi oltre a possedere i normali gruppi fluorescenti in 5' (FAM, VIC, TET), portano in 3' un “quencher” non fluorescente in modo da evitare ogni possibile interazione con il sistema di rilevazione (viene eliminato il rumore di fondo) ed una particolare molecola, denominata appunto MGB (Minor Groove Binder) in grado di legare in maniera molto stabile la



sonda al solco minore della doppia elica del DNA; di conseguenza è possibile osservare una notevole differenza nella temperatura di melting, quando si verifica una situazione di appaiamento o non-appaiamento sull'amplificato, consentendo in questo modo un'accurata discriminazione allelica (Irina *et al.*, 2002). Tale metodologia risulta efficace quando si vuole determinare non solo la specie ma anche la varietà delle materie prime con cui viene prodotto un alimento.

### **La PCR abbinata alla elettroforesi capillare (CGE-SC)**

La tecnica PCR può essere combinata con un'analisi mediante elettroforesi capillare: essa consente di rilevare simultaneamente una miscela di ampliconi piccoli e simili tra loro, che sono le condizioni ideali per analisi in multiplex PCR su alimenti complessi o altamente processati (Teletchea *et al.*, 2005).

Questa tecnica, infatti, combina l'identificazione degli ampliconi in base alla taglia (mediante elettroforesi capillare) e al colore, poiché vengono utilizzati primer marcati con molecole fluorescenti diverse che mostrano spettri di emissione ben distinti fra loro: questo approccio è denominato Elettroforesi Capillare su Gel - Size and Color (CGE-SC). È da notare come questo sistema non richieda una speciale reazione chimica per la marcatura degli ampliconi, ma questo passaggio è svolto durante la reazione di PCR, in quanto la molecola fluorofora è già incorporata in uno dei due primer. La tecnica è stata già utilizzata con successo per la rilevazione in multiplex di diversi eventi di mais geneticamente modificato e il saggio sviluppato ha mostrato un limite di rilevazione pari allo 0.1% per ciascun target, ove la Regolamentazione dell'Unione Europea fissa la soglia di OGM consentita sotto lo 0.9% (Nadal *et al.*, 2006).

### **Tracciabilità molecolare dell'olio di oliva: dalla genomica della pianta alla "Food Genomics"**

La caratterizzazione genetica della pianta di olivo (*Olea europea* L.) negli ultimi anni ha avuto un notevole sviluppo anche sui prodotti alimentari che derivano da questa coltura. Una prima caratterizzazione delle cultivar di olivo è stata fatta utilizzando marcatori morfologici e fenologici, e successivamente con marcatori molecolari (Fabbri *et al.*, 1995; Angiolillo *et al.*, 1999; Sefc *et al.*, 2000). Queste metodiche sono state applicate con successo per la genotipizzazione delle piante ma non dell'olio di oliva. Per l'olio di oliva esiste una specifica normativa che tutela le produzioni DOP (Denominazione di Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta), lo sviluppo di una tracciabilità interna è quindi un valido strumento per la

tutela della tipicità di questi prodotti. L'autenticità dell'olio d'oliva riguarda tre principali problemi: la purezza, che può essere compromessa dall'adulterazione con oli di altre specie vegetali, la conformità all'etichetta in relazione alla composizione, per le cultivar impiegate e le loro proporzioni relative ed infine la conformità all'etichetta in relazione alla provenienza geografica del prodotto. Un'altra caratteristica importante degli oli DOP e IGP è la regione da cui provengono. Risulta quindi importante verificare tale provenienza, indipendentemente dalle dichiarazioni dei produttori. I composti presenti nell'olio, soprattutto quelli volatili, ne definiscono il sapore e l'aroma, essendo caratteristici del metabolismo di ogni cultivar, dipendono dalle sue caratteristiche genetiche, ma in grande misura anche dall'ambiente di crescita. Il luogo d'origine influenza l'espressione delle caratteristiche genetiche tipiche delle cultivar e un olio DOP prodotto in determinate aree geografiche avrà caratteristiche specifiche. Un approccio basato sull'analisi genetica e sul contenuto metabolico è quindi altamente funzionale per definire l'origine e la composizione varietale di un olio e stabilire la sua conformità a quanto dichiarato in etichetta (Marmioli *et al.*, 2009).

### **Estrazione del DNA dall'olio di oliva**

Il primo requisito per effettuare un'analisi molecolare affidabile di un alimento è la disponibilità di DNA di buona qualità e quantità. La quantità di DNA presente negli alimenti e la sua qualità dipendono dal materiale originale utilizzato, dal trattamento che hanno subito, dal tempo trascorso dall'inizio del loro processamento. Questi e diversi altri fattori possono seriamente danneggiare le molecole di DNA, denaturarle, provocare modificazioni chimiche e diminuirne quantità e dimensioni. Ecco perché i metodi per estrarre e purificare il DNA dalle matrici alimentari devono essere sviluppati e adattati caso per caso.

L'olio è una matrice grassa, in cui il DNA è poco solubile e quindi difficilmente recuperabile come riportato da Hellebrand *et al.*, (1998). Il DNA estratto dall'olio di oliva presenta un alto livello di degradazione, la dimensione dei frammenti amplificabili in PCR non supera le 300 bp. Muzzalupo e Perri nel 2002 e Busconi *et al.*, nel 2003 sono fra i primi autori a riportare la possibilità di recuperare e caratterizzare il DNA estratto da olio vergine d'oliva. Un anno dopo è stato presentato uno studio comparativo su diversi metodi di estrazione di DNA da campioni di olio d'oliva, con il fine di individuare il migliore per il recupero di DNA di qualità utilizzabile poi in analisi di tipo molecolare (Breton *et al.*, 2004). Altri autori hanno dimostrato la capacità di poter estrarre DNA dall'olio di oliva e la possibilità di poterlo amplificare mediante PCR per successive analisi con marcatori molecolari (Pasqualone *et al.*, 2004; Pafundo *et al.*, 2005; Pafundo *et al.*, 2007; Pasqualone *et al.*, 2007). Nel 2008 Palmieri e Consolandi hanno applicato

le metodiche di estrazione del DNA dall'olio di oliva ad una piattaforma microarray UA-LDR per il riconoscimento varietale delle cultivar impiegate per la produzione di oli monovarietali. Nella tabella seguente sono riportati i metodi di estrazione attualmente pubblicati, suddivisi per metodica, volume iniziale di estrazione, tipologia di olio utilizzato e possibilità di amplificare il DNA estratto in PCR.

Metodo	Volume di olio iniziale	Tipologia di olio	Amplificabilità	Fonte bibliografica
<b>CTAB</b>				
CTAB modificato	50-100 ml	MVVO, VMIX, NFVO, FVO	Positiva	Busconi <i>et al.</i> , 2003
CTAB modificato	2x50 ml	VMIX	Positiva	Muzzalupo and Perri, 2002
CTAB modificato	2x50 ml	VMIX	Positiva	Fabbri <i>et al.</i> , 1995
CTAB modificato	50 ml	VMIX, MVVO	Positiva	Kobayashi <i>et al.</i> , 1998
PVPP/CTAB	400 ml	MVVO	Negativa	Breton <i>et al.</i> , 2004
<b>Interazione con resine</b>				
DNA stool mini kit Qiagen	1-6 ml	MVVO, VMIX, NFVO, FVO, REF	Positiva	Testolin and Lain, 2005
Nucleo Spin Plant Macherey-Nagel	1-2 ml	MVVO, VMIX	Positiva	Vietina <i>et al.</i> , 2008 Pafundo <i>et al.</i> , 2007
Hydroxyapatite (HA) biogel Sigma	200 ml	MVVO	Positiva	Breton <i>et al.</i> , 2004
HA/PVPP	400 ml	MVVO	Positiva	Breton <i>et al.</i> , 2004
HA/CTAB	400 ml	MVVO, VMIX	Positiva	Breton <i>et al.</i> , 2004
Sigma GenElute plant genomic	6x0.7 ml	NFVO, FVO, REF	Positiva	Pasqualone <i>et al.</i> , 2004 Pasqualone <i>et al.</i> , 2007
<b>Altri metodi</b>			Positiva	
Esano	2x1 ml	NFVO, FVO	Positiva	Consolandi and Palmieri, 2008 Pafundo <i>et al.</i> , 2005
Solventi organici	50 ml	VMIX, MVVO	Negativa	Van Bragt <i>et al.</i> , 1996
Solventi organici	200 ml	VMIX, MVVO	Positiva	Hellebrand <i>et al.</i> , 1998

**Tabella 1:** metodi di estrazione del DNA dall'olio di oliva. La tabella riporta il volume di olio iniziale, la tipologia di olio (olio monovarietale vergine: MVVO; olio commerciale vergine non monovarietale: VMIX; olio vergine non filtrato: NFVO; olio vergine filtrato: FVO; olio raffinato: REF), l'amplificabilità in PCR e la fonte bibliografica di riferimento.

Questi studi evidenziano che è possibile eseguire analisi di tipo molecolare su olio d'oliva e quindi di poterle utilizzare per la tracciabilità di questo prodotto. I risultati riportati nella letteratura internazionale sulla possibilità di poter estrarre con successo il DNA dall'olio di oliva, aprono la prospettiva dell'impiego dei marcatori molecolari per applicazioni di "fingerprinting" genetico.

Differenti tipologie di marcatori molecolari: RAPD (Wiesman *et al.*, 1998; Besnard *et al.*, 2001b; Belaj *et al.*, 2003), SSR (Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002; Belaj *et al.*, 2007), AFLP (Angiolillo *et al.*, 1999) e SNP (Mekuria *et al.*, 1999; Baldoni *et al.*, 2006) già testati sul DNA estratto dalla pianta di olivo, sono quindi stati testati sul DNA estratto dall'olio di oliva.

## **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Il metodo RAPD (Williams *et al.*, 1990) è basato sulla 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 geniche casuali, grazie all'impiego di oligonucleotidi di sole 10 bp. Il profilo elettroforetico che si viene ad evidenziare presenterà 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. Questo rende i RAPD dei marcatori mendeliani dominanti, che non permettono cioè di distinguere tra individui omozigoti ed eterozigoti per un dato locus. L'applicazione dei marcatori RAPD per analisi di "fingerprinting" sul DNA estratto dall'olio di oliva è stato riportato da diversi autori. Muzzalupo *et al.*, (2002), riportano, come dopo l'amplificazione, i profili elettroforetici non sono completamente comparabili con quelli ottenuti dalla amplificazione del DNA vegetale di riferimento. La riproducibilità sembra essere uno dei parametri limitanti per l'applicazione di questa tipologia di marcatori, il loro uso alla tracciabilità molecolare dell'olio di oliva presuppone lo sviluppo di marcatori SCAR (Busconi *et al.*, 2003).

## **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)**

La tecnica AFLP è stata messa a punto da Vos *et al.*, nel 1995 ed è basata sulla combinazioni di due diverse fasi: la digestione del DNA, 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 presenta numerosi vantaggi, come quello di essere universalmente applicabile a tutti gli organismi viventi e quello di permettere l'analisi contemporanea di un grosso numero di loci genetici. Il vantaggio di questo tipo di marcatori per le analisi di tracciabilità nel settore oleico è rappresentato dal fatto che non sono necessari informazioni sulle sequenze da analizzare, questo è estremamente importante a causa della scarsità di sequenze di olivo (*Olea europaea* L.) disponibile nelle banche dati. Questi marcatori presentano una elevata riproducibilità e una facile realizzazione sperimentale. Queste caratteristiche diventano basilari, quando si cerca di analizzare una matrice assai complessa, come l'olio di oliva, dove il DNA è estremamente degradato, la riproducibilità diventa quindi un fattore estremamente importante (Pauli *et al.*, 1998). La tecnologia AFLP è stata impiegata per analizzare il DNA estratto da diverse tipologie 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 (Muzzalupo *et al.*, 2002). Busconi *et al.*, (2003) hanno utilizzato marcatori AFLP, su DNA estratto da olio sottolineando come 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, analizzando i diversi parametri che possono influire sulla efficienza e sulla 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). Le conclusioni di questo lavoro hanno messo in evidenza i seguenti punti critici: *i*) il fattore limitante dell'intera metodologia è l'estrazione del DNA, *ii*) il DNA è altamente degradato, *iii*) difficilmente si possono amplificare frammenti di dimensione superiore alle 250 bp, *iv*) con una buona estrazione la corrispondenza olio-cultivar è al massimo del 70% (Pafundo *et al.*, 2005). Recentemente, un altro lavoro descrive l'analisi AFLP condotta su oli di oliva italiani, in questo caso la corrispondenza nei profili di "fingerprinting" risulta totale tra il DNA estratto dall'olio e quello proveniente dalle foglie dalla cultivar di olivo di riferimento (Montemuro *et al.*, 2008). Gli oli esaminati in questo lavoro non sono però commerciali risultano prodotti in laboratorio attraverso una procedura non industriale e sono analizzati subito dopo la loro preparazione, come sottolineato da Pafundo *et al.*, (2009, submitted) il tempo intercorso tra la spremitura delle olive e l'estrazione del DNA, assieme alle modalità di conservazione dell'olio sono i parametri che ne influenzano l'estraibilità e la successiva amplificabilità con marcatori molecolari AFLP.

### **SCAR (Simple Characterized Amplified Region)**

Tali marcatori sono solitamente 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. Il loro primo utilizzo è stato riscontrato in un lavoro di ricerca in cui è stata caratterizzata una specifica sequenza dimostratasi 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 per ovviare al problema della degradazione del DNA. I valori di riproducibilità dei profili sul DNA estratto dall'olio di oliva con marcatori multi locus e di corrispondenza di questi ultimi con quelli ottenuti dal DNA estratto dalle foglie delle cultivar di riferimento non sempre sono sufficientemente alti per permettere una corretta identificazione delle cultivar che compongono un olio. L'uso di marcatori a singolo locus, realizzati in modo da ottenere ampliconi compresi tra 50 bp e 400 bp, come gli SCAR, può essere un'utile strategia per ovviare ai numerosi problemi dell'olio di oliva, in termini di estraibilità e amplificabilità (Pafundo *et al.*, 2007). Busconi *et al.*, (2003) hanno sviluppato da profili RAPD ottenuti da DNA estratto da foglie di olivo marcatori SCAR non specifici. Questi marcatori sono stati testati sul DNA estratto da olio di oliva e successivamente visualizzati mediante gel di agarosio. I profili elettroforetici hanno permesso di valutare come l'amplicone ottenuto fosse delle dimensioni attese e perfettamente corrispondente a quello amplificato sul DNA estratto dalle foglie della cultivar di olivo corrispondente. Solo in un caso è stato rilevato un frammento non corrispondente con quello ottenuto dalla foglia. Gli autori hanno spiegato questa incongruenza con la possibile presenza nell'olio di una cultivar non dichiarata. La strategia scelta da Pafundo *et al.*, (2007) è stata quella di sviluppare marcatori SCAR da profili AFLP, ottenuti direttamente dal DNA estratto dall'olio. Questa scelta è dovuta alla necessità di implementare le possibilità di successo dell'analisi operando direttamente sulla matrice olio. Gli autori evidenziano come un marcatore SCAR, sviluppato direttamente da un marcatore multi locus AFLP ottenuto da DNA estratto da olio, possa avere maggiori probabilità di poter amplificare il DNA dell'olio stesso. Seguendo questo approccio sono stati sviluppati tre marcatori SCAR, dopo averli testati su DNA vegetale per verificare il grado di polimorfismo soltanto uno si è rivelato polimorfico, permettendo agli autori di realizzare quattro raggruppamenti tra le varietà di olivo analizzate.

## **SNP (Single Nucleotide Polymorphism)**

Per SNP intendiamo variazioni che avvengono naturalmente e che hanno effetto su un singolo nucleotide (Brookes *et al.*, 1999). Hanno il vantaggio di essere uniformemente diffusi nel genoma, sono inoltre di facile identificazione. Gli SNP sono comunemente usati nella caratterizzazione della struttura delle popolazioni e nelle ricerche riguardanti la storia dei geni e hanno una notevole importanza per gli studi di mappaggio tramite ricombinazione.

Possiamo classificare gli SNP nel seguente modo: *i*) non codificanti, nelle regioni non trascritte in 5' o in 3' UTR (Untranslated Region); *ii*) codificanti possono essere polimorfismi di sostituzione, cioè che cambiano l'amminoacido codificato, oppure polimorfismi sinonimi, ovvero che cambiano il codone ma non il corrispondente amminoacido codificato; *iii*) di non sostituzione,

comprendono polimorfismi sinonimi e non codificanti, molti dei quali possono comunque influenzare le funzioni del gene come quelli che si basano 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 trasversioni  $C \leftrightarrow A$  ( $G_1 \leftrightarrow T_1$ ),  $C \leftrightarrow G$  ( $G_1 \leftrightarrow C_1$ ) e  $T \leftrightarrow A$  ( $A_1 \leftrightarrow T_1$ ), e una sola transizione  $C \leftrightarrow T$  ( $G_1 \leftrightarrow A_1$ ). Nell'uomo la frequenza dei quattro tipi di SNP non è eguale, infatti i 2/3 degli SNP riguardano il tipo  $C \leftrightarrow T$  ( $G_1 \leftrightarrow A_1$ ) e questo è dovuto probabilmente alla reazione di deaminazione della 5-metilcitosina, che è nota accadere frequentemente, in particolare a livello dei dinucleotidi CpG (Holliday and Grigg, 1993). Inoltre a causa della natura del codice genetico, è meno probabile che le transizioni modifichino gli amminoacidi rispetto alle trasversioni: di conseguenza si ritiene che le transizioni siano mantenute nelle regioni codificanti con una probabilità maggiore. Può sembrare paradossale tornare all'impiego di polimorfismi biallelici dopo avere individuato dei marcatori pluri-allelici, ma il grande vantaggio nell'utilizzo degli SNP è dato dall'elevato numero di polimorfismi che possono essere genotipizzati e dalla loro elevata densità lungo un genoma.

Nel campo vegetale marcatori di singolo polimorfismo 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 *et al.*, 2002). L'alta flessibilità degli SNP li rende marcatori molecolari ottimali per la sua estrema adattabilità alle piattaforme "high-throughput", come microarray e Real-Time PCR, consentendo di realizzare analisi ad ampio spettro sia qualitative che quantitative. La combinazione di diversi SNP ha permesso di individuare particolari aplotipi peculiari di alcune cultivar di olivo ottenuti attraverso la tecnica del minisequenziamento. Attraverso un Array LDR-UA (Ligation Detection Reaction- Universal Array) con diciassette marcatori SNP è stato possibile discriminare quarantanove differenti cultivar di olivo, caratterizzando il DNA estratto dalle foglie (Consolandi *et al.*, 2007). Lo stesso array è stato applicato in seguito al DNA estratto da otto oli di oliva monovarietal, dimostrando come sia possibile per ogni olio rilevare uno specifico profilo di "fingerprinting" molecolare (Consolandi and Palmieri, 2008).

## SSR (Simple Sequence Repeat)

Con la sigla SSR vengono indicate le regioni di DNA caratterizzate da una ripetizione in tandem di una stessa sequenza di 2-6 basi, ad esempio  $(AG)_n$ . 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).

Le differenze trovate a livello di sequenza tra diverse cultivar di olivo possono essere usate come “tracciante” per identificare la presenza di specifico materiale vegetale nell’olio, e valutarne quindi l’origine varietale. Breton *et al.*, (2004), hanno dimostrato come sia possibile amplificare con marcatori microsatelliti il DNA estratto da diverse tipologie di olio di oliva con differenti metodi, realizzando uno studio dei profili di dissociazione degli alleli mediante Real-Time PCR, valutando in questo modo la loro corrispondenza con quelli identificati nel DNA estratto dalla rispettiva cultivar di riferimento. Marcatori microsatelliti sono stati usati analizzati attraverso una nested PCR, per migliorare l’amplificabilità del DNA. L’approccio si è rivelato positivo, permettendo di amplificare con successo diversi alleli, poi visualizzati attraverso elettroforesi capillare (Testolin and Lain, 2005). L’analisi dei profili microsatelliti per la comparazione degli alleli identificati nell’olio e nelle rispettive cultivar di riferimento è stata sviluppata anche su su gel di agarosio (Pasqualone *et al.*, 2004; Pasqualone *et al.*, 2007).

### **Errori nella genotipizzazione con marcatori molecolari microsatelliti**

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 temprato. Taberlet *et al.*, 2006, Hoffman e Amos 2005 hanno discusso le numerose fonti di errori che possono incorrere nell’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” sono un classico problema dovuto allo scivolamento della 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. Il picco più alto 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 bp più piccola rispetto al picco principale, si possono però individuare picchi di “stutter” rispettivamente di 4 bp e 6 bp 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 di bande di “stutter” minore.

L’“allele dropout” consiste invece nella amplificazione preferenziale di uno soltanto dei due alleli, generalmente il più piccolo fra i due. La causa di questa tipologia di errore è spesso dovuta al bassissimo 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 percentuale di allele dropout (Bjourklund *et al.*, 2005).

Un altro errore dovuto alla reazione di amplificazione è dato dalla tendenza della *Taq* polimerasi ad aggiungere alla estremità 3' dei prodotti di PCR una adenina durante la fase di elongazione (Clark *et al.*, 1988; Magnuson *et al.*, 1996) questo porta all'aggiunta di una base alla reale dimensione dell'allele. Questo problema può essere risolto predisponendo una incubazione finale compresa tra 60°C e 72°C in modo da favorire l'aggiunta di un nucleotide a tutti prodotti di PCR, è così possibile omogeneizzare i risultati (Clarck *et al.*, 1988).

L'“allele nullo” rappresenta una altra tipologia di errore che intercorre durante l'amplificazione, è dovuto ad una mutazione nel sito di appaiamento dei primer, questo porta alla determinazione nel caso di campioni omozigoti, della mancata individuazione dell'allele, generando errori di interpretazione. Il drastico calo della percentuale di eterozigosità all'interno di una popolazione è un chiaro indice della possibile presenza di mutazioni. Per risolvere questa tipologia di 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 al ridisegno di una nuova coppia di primer per il locus microsatellite in esame (Schumm *et al.*, 1996).

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

### **L'approccio mini-SSR nell'analisi del DNA degradato**

In ambito forense la genotipizzazione attraverso l'utilizzo di marcatori microsatelliti è ormai una prassi comune, universalmente riconosciuta. I microsatelliti a confronto con altri marcatori, presentano il vantaggio di essere: numerosi, equamente distribuiti in tutta la parte eu cromatica del genoma, altamente polimorfici e quindi informativi, analizzabili facilmente tramite multiplex PCR.

Notevoli problemi possono sorgere nella applicazione di questa tipologia di marcatori su campioni contenenti DNA altamente degradato e presente in condizioni di “low copy number”, che possono accentuare la possibilità di errori nella corretta genotipizzazione dei campioni (vedi paragrafo precedente). E' quindi necessario utilizzare particolari marcatori molecolari che permettono di analizzare piccoli frammenti di DNA.

Diverse pubblicazioni hanno dimostrato l'esistenza di una relazione diretta tra dimensione attesa dell'amplicone e il reale successo dell'amplificazione (Whitaker *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 2004). L'analisi attraverso mini-SSR si presenta sicuramente come l'approccio più informativo, rispetto alla tradizionale genotipizzazione con loci SSR di dimensioni maggiori su campioni contenenti DNA altamente degradato. Whitaker *et al.*, (1995) hanno dimostrato l'esistenza di questa relazione comparando la possibilità di amplificare con successo due loci SSR caratterizzati da differenti dimensioni. Le amplificazioni sono state condotte sui medesimi campioni (provenienti dal disastro di WACO, Texas, USA) amplificando il locus FES/FPS e il locus VWA con alleli rispettivamente compresi tra 212 bp - 240 bp e 130 bp - 169 bp.

Le amplificazioni sul primo locus hanno fornito rispettivamente novantuno campioni positivi mentre per il secondo locus centoquindici. Bille *et al.*, (2001) hanno utilizzato questo approccio per il riconoscimento delle vittime dell'attentato al World Trade Center.

In un articolo intitolato "Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers" Wiegand and Kleiber (2001) hanno dimostrato come riducendo le dimensioni degli ampliconi su sequenze microsatelliti sia possibile aumentare l'amplificabilità di campioni contenenti DNA degradato e presente in piccole quantità. Questo approccio è stato realizzato da numerosi autori (Hellman *et al.*, 2001; Tsukada *et al.*, 2002; Butler *et al.*, 2003), attraverso il riposizionamento dei primer vicino e in alcuni casi con parziale sovrapposizione alla sequenza ripetuta del locus microsatellite.

Lo svantaggio principale dell'utilizzo dei miniSSR è dato dalle dimensioni degli alleli generati, queste infatti diventano difficili da identificare attraverso l'approccio multiplex, a causa delle dimensioni estremamente ridotte o prossime tra un locus ed un altro. Un altro problema che non deve essere trascurato nell'impiego di questi marcatori con dimensioni ridotte è la verifica della percentuale di "allele dropout" rispetto al locus non modificato, come sottolineato nel lavoro di Opel *et al.*, (2004), questo può generare dei problemi nella valutazione dell'eterozigosità del campione.

Il DNA estratto da matrici alimentari, come precedentemente discusso, presenta quindi delle caratteristiche molto simili ai campioni biologici delle analisi forensi, ecco quindi che questo nuovo approccio, supportato da evidenze sperimentali, potrebbe essere impiegato con successo nelle analisi di tracciabilità molecolare degli alimenti.

## L'olio di oliva

### Caratteristiche chimiche-nutrizionali

L'olio di oliva, al pari di tutti gli oli vegetali, è composto da una frazione saponificabile (trigliceridi) e da una frazione insaponificabile (componenti minori) (Esti, 1998). Nella frazione saponificabile pari al 98-99,5% troviamo:

- acido oleico (65-80%)  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$ ;
- acido palmitico (9-15%)  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COOH}$ ;
- acido linoleico (6-15%)  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ;
- acido stearico (1,5-3%)  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COOH}$ ;
- acido linolenico (tracce)  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{CH=CH)}_3\text{(CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$ .

L'acido oleico stimola la secrezione dei succhi digestivi, da qui l'alta digeribilità dell'olio d'oliva, l'acido linoleico è essenziale come fattore di crescita e per la salute della pelle. Come si vede, esiste una netta prevalenza dell'acido oleico, monoinsaturo, una scarsa percentuale di acidi grassi saturi (palmitico e stearico) ed una discreta percentuale di acidi grassi polinsaturi (linoleico e linolenico). Gli acidi grassi polinsaturi, non potendo essere sintetizzati autonomamente dall'organismo debbono venir forniti ogni giorno con la dieta. L'olio di oliva costituisce perciò una buona fonte alimentare di questi acidi grassi essenziali. La presenza dei legami insaturi negli acidi grassi, conferisce agli oli particolari qualità biologiche, li rende però anche attaccabili dall'ossigeno determinando il fenomeno dell'auto-ossidazione.

Questo fenomeno procede con una velocità proporzionale al numero dei doppi legami esistenti ed è contrastato dalla natura e dalla concentrazione delle sostanze anti-ossidanti. L'olio di oliva presenta, a questo proposito, una composizione acidica con una insaturazione non troppo elevata e contiene numerose sostanze anti-ossidanti che gli consentono di mantenere una particolare stabilità. Nella frazione insaponificabile pari al 0,5-2% troviamo in tracce:

- Idrocarburi saturi ( $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$  -  $\text{C}_{35}\text{H}_{72}$ );
- Idrocarburi insaturi (Squalene)  $\text{C}_{30}$ ;
- Cere (alcoli da  $\text{C}_{16}$  -  $\text{C}_{36}$ );
- Steroidi liberi o esterificati (fitosterolo, beta-sitosterolo);
- Alcoli alifatici ( $\text{C}_{16}$  -  $\text{C}_{30}$ );
- Alcoli triterpenici;
- Vitamine liposolubili: A, D E K;
- Pigmenti;

- Carotenoidi;
- Clorofilla;
- Polifenoli;
- Oleoeuropeina;
- Flavoni;
- Acidi fenolici;
- Tocoferoli;
- Fosfolipidi;
- Aldeidi;
- Altri prodotti volatili.

Le sostanze anti-ossidanti, unitamente ad altri componenti minori, fanno parte della frazione insaponificabile dell'olio di oliva. Innanzi tutto ricordiamo i tocoferoli, rappresentati per il 90% dalla forma alfa, biologicamente la più attiva. Il loro contenuto è di circa 150-170 mg/kg e, oltre a costituire un importante elemento stabilizzante nei processi di auto-ossidazione, rappresentano una preziosa sorgente vitaminica alimentare. Un ruolo molto importante è svolto dalla vitamina E, un antiossidante che protegge dalla ossidazione/perossidazione i grassi, interagendo con l'ossigeno e con i radicali liberi, e promuove l'utilizzazione della vitamina A e la sintesi dell'eme (aumentando i livelli degli enzimi delta-aminolevulinico-sintetasi e deidratasi). È usata come coadiuvante nella aterosclerosi e nella sterilità, ed è un noto antiabortivo. La carenza causa fragilità dei globuli rossi e sintomi neurologici, oltre a distrofia muscolare. Un'altra importante azione anti-ossidante viene svolta dai composti fenolici (fenoli, acidi fenolici e polifenoli). Sotto questo aspetto l'olio di oliva, e soprattutto quello vergine, presenta una situazione particolarmente interessante in quanto è ricchissimo di  $\alpha$ -tocoferolo (Pirisi *et al.*, 1997). Nell'olio di oliva sono contenuti inoltre altri componenti minori di cui alcuni dotati di interesse biologico come gli steroli. A differenza di altri oli è l'unico a possedere una concentrazione particolarmente elevata di  $\beta$ -sitosterolo, sostanza che si oppone all'assorbimento intestinale del colesterolo. Altri fitosteroli presenti sono il campesterolo e lo stigmasterolo. Tra gli idrocarburi, troviamo lo squalene ed il  $\beta$ -carotene, anti-ossidante. Gli alcoli terpenici sono presenti nell'olio di oliva sia liberi che esterificati con gli acidi grassi. Di particolare interesse tra questi è il cicloartenolo la cui azione favorisce l'escrezione fecale del colesterolo per un aumento dell'escrezione degli acidi biliari. I fosfolipidi risultano presenti in quantità non molto elevate sono rappresentati dalla fosfatidilcolina e dalla fosfatidilietanolamina. Le sostanze coloranti sono rappresentate dai carotenoidi, ma soprattutto dalla clorofilla. Questo pigmento, la cui quantità può variare in rapporto a vari fattori, svolge biologicamente un'azione di stimolo sulla

crescita cellulare, sulla produzione del sangue e di accelerazione dei processi di cicatrizzazione. Infine ricordiamo le sostanze aromatiche, rappresentate da numerosi composti in parte non ancora identificati, ma che nel loro insieme contribuiscono a creare quei particolari caratteri organolettici tipici dell'olio. Tali caratteri organolettici non vanno sottovalutati in quanto influenzano positivamente la digestione (Consiglio Oleicolo Internazionale, 1987). Le informazioni nutrizionali dell'olio di oliva vengono riportate nella seguente tabella.

Calorie:	9 Kcal /gr o37 Kj/gr
Colesterolo:	Assente
Vitamina E:	0.2 -0.3 mg/g
Grassi totali:	0.98 gr per 1 gr di olio
Grassi saturi:	10-15%
Grassi monoinsaturi:	70-80%
Grassi poliinsaturi:	5-8%

**Tabella 2:** parametri nutrizionali dell'olio extravergine di oliva.

(Fonte: Laboratorio Chimico Merceologico della Camera di Commercio di Firenze)

## **Il settore dell'olio di oliva nell'Unione Europea**

La coltivazione delle olive, diffusa in tutti i paesi del Mediterraneo, è importante per l'economia rurale, il patrimonio locale e l'ambiente. La superficie coltivata ad oliveti in Europa è all'incirca di 5 milioni di ettari. Nel settore lavorano quasi 2.5 milioni di produttori (circa un terzo di tutti gli agricoltori dell'Unione Europea), di cui 1.160.000 in Italia, 840.000 in Grecia, 380.000 in Spagna e 130.000 in Portogallo (<http://www.europamica.it>; <http://www.ismea.it>).

L'Unione Europea occupa il primo posto nel mondo, con una produzione dell'80% e un consumo del 70% dell'olio di oliva mondiale. L'Unione Europea ha intrapreso negli ultimi anni una campagna di valorizzazione dell'olio d'oliva e attualmente punta a migliorare la qualità del prodotto e a incoraggiare gli olivicoltori a soddisfare i consumatori.

A tale scopo è stato emanato un regolamento sulle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva che contempla disposizioni in materia di imballaggio, etichettatura, presentazione e pubblicità richiesti per la commercializzazione, tutelando il consumatore e consentendo al produttore di ottimizzare i proventi delle vendite di prodotti di alta qualità (Il settore dell'olio di oliva nell'Unione Europea, Commissione Europea Direzione generale dell'agricoltura, 2002).

## La lavorazione dell'olio

Nonostante la lunga storia dell'olio di oliva e le continue innovazioni tecnologiche, la sua lavorazione prevede ancora oggi tre differenti fasi:

1. la frangitura o molitura;
2. la gramolatura;
3. l'estrazione.

Altre operazioni, quali la decantazione ed eventualmente il filtraggio, consentono di ottenere un olio pronto per la commercializzazione al pubblico.

Le olive vengono trasportate al frantoio, dopo essere state raccolte e stoccate in apposite contenitori con fori laterali, in modo da consentire all'aria di circolare liberamente evitando il deterioramento dell'oliva stessa. Una prima operazione è quella del lavaggio e della defogliatura, in modo da eliminare tutti i corpi estranei e eventuali foglie rimaste dopo la raccolta.

Le olive, pronte per la molitura, vengono frantumate ottenendo così una pasta formata dalla polpa e dal nocciolo; la frantumazione è necessaria per rompere e spezzettare la polpa dalla quale si estrae l'olio. Attualmente i metodi di molitura più utilizzati sono due: tradizionale, dove due mole di granito girano su un grande piatto dove avviene la frantumazione e la produzione della pasta e moderno, a ciclo continuo, dove la pasta di oliva si ottiene spezzettando le olive grazie ad una serie di martelletti meccanici.

Una volta ottenuta la pasta di olive si passa alla seconda operazione in apposite gramolatrici. La gramolatura è un passaggio delicato, in quanto la pasta viene nuovamente lavorata, rimescolandola a temperatura controllata. Così facendo si riduce il volume della pasta stessa, si rompono le emulsioni di acqua e olio, che si sono formate durante la frangitura, favorendo così la successiva fase dell'estrazione.

Quest'ultima è considerata l'operazione più importante di tutta la lavorazione, i metodi oggi disponibili e maggiormente usati sono tre:

1. tradizionale: la pasta gramolata viene spalmata su appositi *fiscoli*, ovvero dei pannelli circolari filtranti in fibra sintetica (un tempo fatti esclusivamente in fibre vegetali), forati sul centro in modo tale da poter essere sovrapposti (ogni tre *fiscoli* viene messo un disco rigido di acciaio formando le *teme*) e impilati in un'apposita colonna di acciaio adagiata su un carrello dotato di scanature. Una volta formata la torre, composta da circa 20 *teme*, viene effettuata una premitura intorno alle quattro atmosfere;

2. ciclo continuo con centrifuga: la pasta viene immessa in un centrifuga orizzontale a due o tre uscite aggiungendo acqua (dal 10 al 20% rispetto al peso delle olive) ad una temperatura controllata di circa 28°C, il liquido risultante viene poi raccolto;
3. percolamento: viene sfruttata la differente tensione superficiale dell'olio e dell'acqua di vegetazione presenti nella pasta di olive gramolata. Proprio in quest'ultima vengono fatti affondare un numero elevato (circa un migliaio) di pettini in acciaio. Questi si ricoprono di un velo d'olio che viene fatto sgocciolare in un apposito contenitore.

L'olio, dopo l'estrazione, viene conservato in ambienti privi di odore, protetti dalla luce e ad una temperatura non superiore a 15°C. (Sacchi, 2003). La filiera dell'olio può essere facilmente riassunta nel seguente schema:

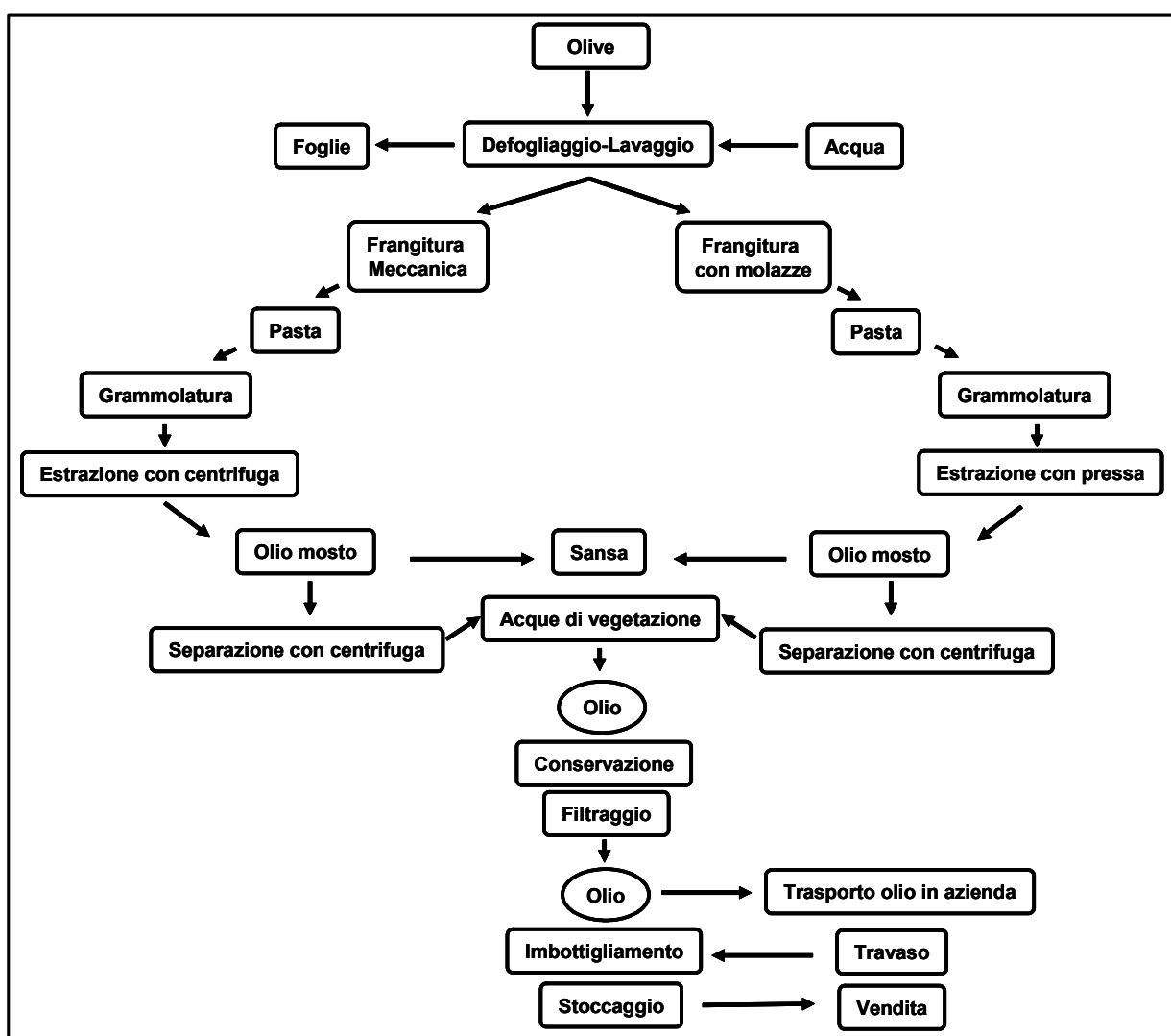


Figura 2: ciclo di lavorazione dell'olio di oliva. (Tratto da: <http://www.guidaolio.com>)

## Denominazione e definizione degli oli di oliva

L'olio di oliva destinato al consumo umano relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti, può essere commercializzato secondo le seguenti classificazioni merceologiche (Reg. CEE 510/2006):

### **Olio di oliva vergine**

E' l'olio che si ottiene dal frutto dell'olivo soltanto mediante processi meccanici o altri processi fisici, in condizioni termiche che non causano alterazioni dell'olio stesso, e le olive non hanno subito alcun trattamento diverso dal lavaggio, dalla decantazione, dalla centrifugazione e dalla filtrazione; è escluso l'olio ottenuto mediante solvente o con processi di riesterificazione e qualsiasi miscela con oli di altra natura. Detto olio di oliva è oggetto della classificazione e delle denominazioni che seguono:

***Olio extra vergine di oliva:*** olio di oliva vergine il cui punteggio organolettico è uguale o superiore a 6.5, la cui acidità libera espressa in acido oleico è al massimo di 1 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria;

***Olio di oliva vergine:*** olio di oliva vergine il cui punteggio organolettico è uguale o superiore a 5.5, la cui acidità libera espressa in acido oleico è al massimo di 2 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria;

***Olio di oliva vergine corrente:*** olio di oliva vergine il cui punteggio organolettico è uguale o superiore a 3.5, la cui acidità libera espressa in acido oleico è al massimo di 3.3 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria;

***Olio di oliva vergine lampante:*** olio di oliva vergine il cui punteggio organolettico è inferiore a 3.5 e/o la cui acidità libera espressa in acido oleico è superiore a 3.3 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria.

### **Olio di oliva raffinato**

Ottenuto dalla raffinazione di oli di oliva vergini, la cui acidità libera espressa in acido oleico non può eccedere 0.5 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria.

### **Olio di oliva**

Ottenuto da un taglio di olio di oliva raffinato e di oli di oliva vergini diversi dall'olio lampante, la cui acidità libera espressa in acido oleico non può eccedere 1.5 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria.



### **Olio di sansa di oliva greggio**

Prodotto mediante trattamento al solvente di sansa di oliva, esclusi gli oli ottenuti con processi di riesterificazione e qualsiasi miscela con oli di altra natura e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria.

### **Olio di sansa di oliva raffinato**

Ottenuto dalla raffinazione di olio di sansa di oliva greggio, la cui acidità libera espressa in acido oleico non può eccedere 0.5 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria.

### **Olio di sansa di oliva**

Prodotto da un taglio di olio di sansa di oliva raffinato e di oli di oliva vergini diversi dall'olio lampante, la cui acidità libera espressa in acido oleico non può eccedere 1.5 gr per 100 gr e avente le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria.

## **Etichettatura degli oli**

Il Regolamento della Commissione n. 1019/2002 ha introdotto una nuova normativa sulla etichettatura dell'olio d'oliva in vendita al dettaglio, modificando in parte quanto era già presente in Italia e sul territorio comunitario. Prima della nuova normativa a tutela del consumatore, la pubblicità relativa al commercio ed all'etichettatura degli oli venivano regolate dalla legislazione comunitaria (Direttive 395 e 396 del 1989) e nazionale (DL 109/92 e Legge 35/1968).

### **Indicazioni obbligatorie**

- a. denominazione legale di vendita (conforme alla classificazione ed alle definizioni previste dalla normativa);
- b. nome e cognome (o ragione sociale o marchio depositato) e sede del produttore o del confezionatore o del venditore stabilito nella Unione Economica. Di norma, tale indicazione è preceduta da diciture quali "*imbottigliato da ...*", "*prodotto da...*", "*prodotto ed imbottigliato da...*", "*confezionato da...*", "*distribuito da...*" e simili;
- c. sede dello stabilimento di produzione o di confezionamento.
- d. quantità nominale di prodotto, espressa in Litri (L o l), Centilitri (cl) o Millilitri (ml).  
Gli oli di oliva, destinati al consumatore, devono essere posti in vendita esclusivamente in recipienti chiusi ermeticamente di capacità non superiore a 10 litri;
- e. termine minimo di conservazione (con la dicitura "*Da consumarsi preferibilmente entro il ...* ": specificare almeno mese/anno);

- f. lotto (preceduto dalla Lettera L): identificazione dell'insieme di latte o bottiglie prodotte o confezionate in circostanze praticamente identiche. Il lotto è determinato dal produttore o dal confezionatore dell'olio ed è apposto sotto la propria responsabilità. Non è richiesta tale indicazione se il termine minimo di conservazione riporta giorno/mese/anno;
- g. indicazioni ecologiche: un invito, chiaramente visibile sui contenitori o sulle etichette, a non disperdere i contenitori nell'ambiente dopo l'uso, in forma di messaggio scritto o di un pittogramma.

### **Indicazioni facoltative**

- a. la lettera minuscola "e": marchio CE per gli imballaggi preconfezionati corrispondenti ai requisiti delle norme CEE;
- b. materiali imballaggio, se diversi dal vetro;
- c. designazione dell'origine: la normativa comunitaria ha vietato qualsiasi menzione geografica, a partire dal 1° Luglio 1999, ad eccezione degli oli che hanno ottenuto la denominazione di origine o l'indicazione geografica protetta;
- d. modalità di estrazione;
- e. eventuali abbinamenti gastronomici;
- f. varietà di olive da cui l'olio deriva;
- g. informazioni nutrizionali, nel rispetto della normativa in materia;
- h. le modalità di conservazione consigliate.

## **La certificazione DOP e IGP**

A partire dal 1992 per poter tutelare la tipicità dei suoi prodotti alimentari, caratteristici sia per processi di produzione che per caratteristiche nutrizionali e culturali, scoraggiando la concorrenza da parte di prodotti simili, l'Europa ha creato alcuni marchi di certificazione noti come DOP (Denominazione di Origine Protetta), IGP (Indicazione Geografica Protetta) e STG (Specialità Tradizionale Garantita) per promuovere e tutelare i prodotti agroalimentari (Regolamento CEE n. 2082/92, relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli ed alimentari).

Allo stato attuale, gli oli d'oliva possono ottenere le certificazioni:

- DOP Denominazione di Origine Protetta;
- IGP: Indicazione Geografica Protetta;

- Biologico.

L'Articolo 2 del Regolamento CEE n. 2082/92 recita: *"Ai fini del presente regolamento si intende per: denominazione di origine il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese che serve a designare un prodotto agricolo o alimentare originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese la cui qualità o le cui caratteristiche siano dovute essenzialmente od esclusivamente all'ambiente geografico comprensivo dei fattori naturali ed umani e la cui produzione, trasformazione ed elaborazione avvengano nell'area geografica delimitata"*. Per indicazione geografica si intende il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese che serve a designare un prodotto agricolo o alimentare originario di tale regione, luogo determinato o di tale paese di cui una determinata qualità, la reputazione o un'altra caratteristica possa essere attribuita all'origine geografica e la cui produzione e/o trasformazione e/o elaborazione avvenga nell'area geografica delimitata. In pratica, il marchio DOP indica un prodotto legato molto strettamente alla zona di produzione perchè garantisce la zona di origine di un olio extra vergine di oliva. La Denominazione di Origine Protetta è lo strumento di tutela di queste tipicità e di orientamento per il consumatore, conferito esclusivamente agli oli extra vergine di oliva prodotti nel pieno rispetto della tradizione della propria zona di origine. Per il marchio IGP è invece sufficiente che solo una delle fasi di produzione sia effettuata nella zona d'origine. La denominazione Biologico viene assegnata a tutti quei prodotti per i quali non vengono utilizzati diserbanti o fitofarmaci che distruggono gli equilibri della natura, e la cui produzione oltre a rispettare il paesaggio rurale, riduce l'inquinamento delle falde, difende il territorio, ripristina siepi e boschi (Reg. CEE n° 2092/91 modificato da Reg. CEE n°1935/95).

## **Le frodi nel settore oleario**

Nel campo degli oli e dei grassi destinati al consumo alimentare è possibile trovarsi di fronte a casi di adulterazione degli stessi, per lo più con grassi di origine vegetale dal valore economico estremamente inferiore rispetto alle matrici che vanno ad adulterare.

Le frodi più comuni sono rappresentate da:

- extravergini non puri, contenenti oli raffinati, di oliva e di semi; oli di sansa decerati a freddo con acetone;
- oli con parametri analitici non conformi alla classificazione;
- oli di semi commercializzati come oli di oliva;
- miscelazione di oli di oliva con oli esterificati (dichiarati non commestibili);

- miscelazione di oli di semi con olio fortemente colorato.

Esistono diversi metodi per il riconoscimento delle frodi: la spettrofotometria UV., che permette di indagare sulla presenza di legami coniugati, dieni e trieni, le analisi gascromatografiche degli acidi grassi, come esteri metilici, le analisi gascromatografiche della frazione insaponificabile (steroli, eritrodiole, alcoli alifatici) e analisi enzimatiche (metodo lipasi pancreatico) per quantificare gli acidi grassi saturi che esterificano in posizione due (acido palmitico).

Nell'olio vergine proveniente dalla sola spremitura, i doppi legami degli acidi grassi insaturi sono in posizioni particolari e non sono mai vicini, cioè non ci sono doppi legami contigui; ma se si effettua un processo di raffinazione si lasciano tracce caratteristiche. La soda impiegata per deacidificare l'olio agisce sulla struttura degli acidi grassi, provocando lo slittamento dei doppi legami. Nella decolorazione su terre attive di oli lampanti perossidati si ha la formazione di trieni coniugati e la formazione di composti chetonici, questo comporta un assorbimento caratteristico all'ultravioletto rilevando un picco peculiare se è presente olio rettificato (olio di sansa e semi) per la presenza di dieni.

Nel caso di un olio di oliva estratto chimicamente da sansa con esano, si possono individuare delle cere derivanti dalle bucce delle olive (monoesteri di un acido grasso e di un alcool a lunga catena) prodotte dall'azione del solvente organico e rinvenute nell'olio. Anche se l'olio venisse decerato, con acetone, con un processo vietato dalla legge, si possono riconoscere altre sostanze correlate al trattamento chimico precedente.

Nella decolorazione con terre acidificate e nei trattamenti termici di deodorazione si formano isomeri di acidi grassi trans, in seguito a questi trattamenti si verifica una rotazione della molecola intorno ad un doppio legame che porta la naturale configurazione cis-cis in una configurazione trans-cis. Questo piccolo cambiamento ha considerevoli effetti negativi sulla salute: gli acidi grassi cis-trans rendono le cellule più permeabili al passaggio di molecole esterne. Gli acidi grassi trans aggravano le carenze di acidi grassi essenziali, ostacolando la produzione di prostaglandine, che regolano il tono muscolare delle pareti arteriose, la pressione del sangue, le funzioni renali.

L'analisi gascromatografica degli acidi grassi (come esteri metilici) permette di ottenere un cromatogramma con picchi ben visibili per tutti gli acidi grassi, anche quelli in tracce. Con particolari colonne capillari si può ottenere un cromatogramma dove si distingue il picco caratteristico dell'acido elaidinico, indice di olio ottenuto non da spremitura ma proveniente da esterificati, da oli rettificati e da oli di sansa rettificati.

L'analisi gascromatografica degli steroli permette invece l'individuazione di frodi dovute anche a oli vegetali provenienti da piante modificate geneticamente: la composizione sterolica è tipica di ogni sostanza grassa, e non si modifica per eventuali variazioni genetiche della pianta (Dall'olivo all'olio: classificazione, chimica e frodi dell'olio, 2004).

Nella tabella seguente vengono riportati i parametri qualitativi dell'olio extravergine, con i limiti di legge e la possibile spiegazione per eventuali alterazioni di questi indici.

Parametro analitico	Lim CEE	Significato
Acidità (% ac.oleico)	1,0	Dipende da idrolisi dei trigliceridi: funzione dello stato di conservazione della materia prima
N°Perossidi (meq.O <sub>2</sub> /Kg oil)	20,0	Indice di stato di ossidazione dell'olio: funzione della cattiva manipolazione e conservazione
K232	2,40	Assorbimento UV dei dieni coniugati, presenti per raffinazione o ossidazione dell'olio
K270	0,20	Assorbimento di trieni coniugati, presenti per raffinazione o ossidazione dell'olio
ΔK	0,01	Rappresenta l'entità dell'assorbanza a 270nm rispetto alla curva di assorbanza UV: se elevato è indice di presenza di oli raffinati
C14:0 (%)	0,05	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi
C18:3 (%)	0,9	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi, in particolare soia o colza
C20:0 (%)	0,6	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi, in particolare soia colza o arachide
C20:1 (%)	0,4	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi, in particolare soia colza
C22:0 (%)	0,2	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi, in particolare colza o arachide
C24:0 (%)	0,2	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi, in particolare arachide
Colesterolo (%)	0,5	Valore elevato è indice di presenza di grassi estranei anche vegetali (p.es. palma)
Brassicasterolo (%)	0,1	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi, in particolare soia colza
Campesterolo (%)	4,0	Valore elevato è indice di presenza di olio di semi
Stigmasterolo (%)	>campest.	Negli oli di semi spesso campest. e stigmaster. sono equivalenti
Δ-7-stigmaster. (%)	0,5	Valore elevato è indice di presenza di olio di girasole, cartamo, anche ad alto oleico
betasistosterolo+ Δ5avanester. +Δ5.23stigm. +cleroster. +sitostan. +Δ5.24stigmastadie.	93	Valore basso è indice di miscelazione con olio di semi
Steroli totali (ppm)	1000	Valore basso è indice di miscelazione con olio di semi desterolati

**Tabella 3:** parametri dell'olio di oliva extravergine e loro significato chimico.

Parametro analitico	Lim CEE	Significato
Cere (ppm)	250	Valore alto è indice di miscelazione con olio estratto con solventi (sansa)
Ac. grassi saturi in posizione 2 del trigliceride	1,3	Valore alto è indice di presenza di oli esterificati, con trigliceridi ottenuti per sintesi chimica
Eritrodiole + uvaolo (%)	4,5	Valore alto è indice di miscelazione con olio estratto con solventi (sansa)
ECN 42 (HPLC-teor.)	0,2-	Valore alto è indice di presenza di oli diversi dall'oliva, anche a elevato contenuto di oleico
Stigmastadieni (%)	0,15	Derivano da modificazioni degli steroli: valore alto è indice di presenza di oli raffinati, anche desterolati
C18:1 T (%)	0,05	I trans isomeri si formano in raffinazione: un valore elevato è indice di oli raffinati o desterolati
C18:2 + C18:3 T (%)	0,05	I trans isomeri si formano in raffinazione: un valore elevato è indice di oli raffinati o desterolati
Acido arachico (%)	0,6	Se superiore, presenza di oli di semi
Acido eicosenoico (%)	0,4	Se superiore, presenza di oli di semi
Acido miristico (%)	0,05	Se superiore, presenza di oli di semi
Acido beenico (%)	0,2	Se superiore, presenza di oli di semi

**Tabella 3A:** parametri dell'olio di oliva extravergine e loro significato chimico.

## L'olio di semi

Secondo la legge è denominato olio di semi l'olio ottenuto dalla estrazione a mezzo solvente o dalla pressione meccanica di semi oleaginosi (secondo l'O.M. 6.6.1985 ed il D.M. 9.8.1995, per semi oleaginosi s'intendono: arachide, canapa, cartamo, colza, cotone, girasole, lino, papavero, ravizzone, ricino, senape, sesamo e soia) e successivamente sottoposto, per essere reso commestibile, a processo industriale di rettificazione, altrimenti detto di raffinazione. Alla suddetta denominazione dovrà aggiungersi l'indicazione della specie del seme oleoso sempre che l'olio di semi sia stato prodotto da una sola specie, mentre, qualora l'olio sia costituito da miscele di oli prodotti da diverse specie di semi oleosi, esso dovrà essere denominato "olio di semi vari" (Legge 27.1.1968, art. 1).

Gli oli di semi, rispetto a quelli di oliva, sono molto ricchi di acidi grassi polinsaturi, resistono meno al calore ma presentano il vantaggio di contenere molti acidi grassi "essenziali" (acidi linolenico, linoleico e arachidonico). Preferibili, anche se più costosi sono gli oli di semi cosiddetti "naturali", perché non ottenuti tramite estrazione con solventi organici, ma per semplice pressione a freddo. Solo tale modalità di estrazione, infatti, garantisce il mantenimento di quella quota (dal 50 al 70%) di acidi grassi essenziali. Le differenze tra i vari tipi di oli vegetali riguarda principalmente la composizione in acidi grassi. La maggior parte degli oli

vegetali contengono in prevalenza acidi grassi mono e polinsaturi, e pochi acidi grassi saturi. Fanno eccezione gli “oli tropicali” che invece contengono una grossa percentuale di acidi grassi saturi. Esistono diverse tipologie di oli di semi, di seguito vengono riportati i principali.

### **Olio di semi di girasole**

È estratto dai semi di *Helianthus annuus* della famiglia delle Composite. La coltivazione del girasole è tipica dell'est europeo, ma negli ultimi anni si è estesa anche in Europa e in Italia. L'olio di semi di girasole contiene una percentuale molto elevata di grassi polinsaturi, in particolare l'acido linoleico (fino al 75%), e una notevole quantità di vitamina E (68 mg /100 gr). Questo tipo di olio incorre facilmente in processi di irrancidimento a causa dell'elevato grado di insaturazione, quindi non è indicato per cucinare e friggere, e andrebbe conservato in frigorifero in bottiglie opache. Esistono oli di girasole ottenuti da piante geneticamente modificate che hanno un contenuto di acidi grassi modificato a favore di quelli monoinsaturi, vengono utilizzati per friggere, soprattutto nel Nordamerica, grazie alla maggior stabilità alle alte temperature.

### **Olio di semi di mais**

È estratto dai germi dei semi di *Zea mais*, una graminacea tipica del Nordamerica, coltivata anche in Italia. Ha una composizione simile a quello di girasole, molto ricco di acido linoleico e vitamina E.

### **Olio di semi di soia**

L'olio si ricava dai semi della soia gialla (*Glycine max*) che ne forniscono fino al 20% del loro peso, il prodotto è ricco di acidi grassi essenziali, sali minerali, oligoelementi, lecitina, vitamine A ed E. Tra gli oli di semi è quello più completo poiché contiene entrambi gli acidi essenziali, linoleico (50% circa) e linolenico (8% circa), venti grammi di olio di soia non raffinato soddisfano il fabbisogno giornaliero di entrambi i grassi essenziali. Anch'esso andrebbe conservato in frigorifero, in bottiglie opache.

### **Olio di semi di colza**

Si ricava dai semi di *Brassica napus* e di *Brassica campestris*, della famiglia delle Crucifere. L'olio che si ottiene contiene una notevole quantità di acido erucico, una sostanza che viene metabolizzata con difficoltà dall'organismo umano e che si accumula nei grassi del muscolo cardiaco, causando alterazioni. La legge impone che nell'olio di semi vari e nelle margarine non sia presente una quantità maggiore al 5% di acido erucico. Viene utilizzato per la preparazione di oli e grassi utilizzati dalle industrie alimentari.

### **Olio di semi di sesamo**

Si ricava dalla spremitura dei semi di sesamo (*Sesamum indicum*). Ha un aspetto giallo dorato e un sapore leggermente amaro. Contiene un'alta percentuale di acidi grassi essenziali (acido linoleico fino al 48%), oltre ad antiossidanti come sesamolo e sesamolina. Inoltre contiene buone quantità di lecitina.

### **Olio di nocciola**

L'olio di nocciola (*Coryllus avellana*) si ricava per spremitura delle nocciole, l'olio contiene il 35% di vitamina E e circa il 70% di acidi grassi monoinsaturi, contiene inoltre vitamine B6, B1, B2 e PP.

### **Olio di vinaccioli**

Si ricava dai residui della vinificazione dopo un leggero processo di decolorazione e raffinazione del mosto. E' ricco di acido linoleico e vitamina E.

## **Processi estrattivi per l'olio dei semi**

L'estrazione dell'olio di semi, come avviene per l'olio di oliva, può avvenire attraverso due metodiche: con procedimenti esclusivamente meccanici, a temperature che mantengono inalterate le caratteristiche dell'olio, oppure con la raffinazione chimica.

La grande maggioranza degli oli vegetali in commercio, e la totalità di quelli utilizzati dall'industria alimentare nella produzione di prodotti da forno sono ottenuti con il processo di raffinazione chimica, le cui fasi sono riportate di seguito.

### **1. Estrazione con solventi**

I semi dai quali si vuole estrarre l'olio vengono sbriciolati finemente, messi in un bagno di esano o eptano e posti in agitazione. Dopo aver separato l'insieme olio - solvente da ciò che resta del seme, il solvente viene rimosso per evaporazione a una temperatura di 150°C.

### **2. Degommazione**

Questa fase del processo rimuove alcuni composti simili alle fibre, i carboidrati complessi, alcuni composti simili alle proteine, e i fosfolipidi. La degommazione rimuove anche la clorofilla, e i minerali di calcio, ferro, magnesio e rame. La temperatura del processo è di 60°C.

### **3. Deacidificazione**

L'olio è mescolato con una base estremamente corrosiva, la soda caustica, oppure con una miscela di soda caustica e carbonato di sodio. Questi composti ne abbassano l'acidità a un livello adatto per l'alimentazione umana. La miscela viene agitata e poi separata; questa parte del



processi di raffinazione avviene a circa 75°C. La deacidificazione rimuove gli acidi grassi liberi dall'olio ma elimina anche i fosfolipidi. L'olio si presenta a questo stadio del processo di lavorazione di colore giallo.

#### **4. Decolorazione**

L'olio viene trattato con filtri per 30 minuti a 110°C, per rimuovere tutti i pigmenti (clorofilla e betacarotene), ed eventuali tracce di residui derivanti dai precedenti trattamenti. Vengono anche rimosse sostanze aromatiche naturali. Durante questo processo, gli acidi grassi essenziali vengono alterati (si formano perossidi e acidi grassi coniugati).

#### **5. Deodorazione**

Durante questa fase del processo di raffinazione l'olio viene distillato a vapore a 270°C, sotto pressione e in assenza di aria, per 30 - 60 minuti. Vengono rimosse sostanze aromatiche, acidi grassi liberi, ed eventuali molecole generate dai processi precedenti che possono dare un sapore sgradevole. In questo processo si formano gli acidi grassi "trans" nella misura del 5% circa. I tocoferoli (vitamina E), i fitosteroli e alcuni residui tossici (pesticidi e tossine) vengono rimossi.

## Scopo della Ricerca

L'olivo (*Olea europea* L.) è una delle piante coltivate più caratteristiche ed importanti all'interno del bacino del Mediterraneo. I maggiori produttori a livello europeo sono Spagna (42%), Italia (24%) e Grecia (12%), per un totale di piante coltivate che ammonta a 400-500 milioni. L'Europa si trova dunque al primo posto nel mondo con una produzione di olio pari all'80%.

Fin dall'antichità l'olivo e l'olio da esso ricavato hanno rivestito un ruolo chiave, sia come tipo di coltivazione, che come prodotto alimentare. Nella società moderna il valore nutrizionale dell'olio di oliva è ormai un patrimonio consolidato. La sua tipicità e l'alto livello di qualità hanno fatto sì che questo prodotto venisse apprezzato dai consumatori di tutto il mondo. Proprio a causa dell'espandersi del mercato internazionale dell'olio, è nata la necessità di tutelare sia i produttori che i consumatori, cercando di incrementare tutte le possibili tecnologie che possano portare allo sviluppo di metodi di analisi sempre più selettivi e sicuri. Poiché l'attenzione dei consumatori alla provenienza e all'autenticità dei prodotti alimentari è cresciuta notevolmente in questi ultimi anni. Diverse ricerche sono in corso per creare degli strumenti, e migliorare quelli esistenti, in grado di determinare con precisione le frodi nel settore alimentare, anche nel settore dell'olio d'oliva.

Per queste ragioni lo scopo di questo lavoro di tesi è stato finalizzato allo sviluppo e alla implementazione di tecnologie biotecnologiche e molecolari in grado di permettere di tracciare, verificandone l'autenticità, e di caratterizzare la composizione varietale dell'olio di oliva.

Il lavoro di ricerca è stato quindi lo sviluppo e l'applicazione di metodiche basate sulla PCR e marcatori molecolari che permettano:

- di individuare una metodica di estrazione del DNA ottimale per la matrice olio;
- di individuare la presenza di altri tipi di oli, derivanti non dalle olive;
- di verificare l'origine varietale di un olio;
- di applicare questi marcatori a piattaforme per la quantificazione.

L'ambiente chimico lipofilo (la matrice di estrazione) rende l'isolamento del DNA molto complesso. Poiché il DNA è presente in basse quantità e ad alti livelli di degradazione, la ricerca di un metodo adattabile per ottimizzare il potere estrattivo diventa fondamentale. Il primo obiettivo di questo lavoro è stato quindi di valutare e individuare un metodo di estrazione che permettesse di isolare il DNA dall'olio in modo rapido e con una buona resa.

Metodi di estrazione del DNA sono stati applicati anche a oli non di oliva: mais, nocciola, girasole, sesamo, riso, zucca, soia e arachide. Successivamente, con l'obiettivo di sviluppare un'analisi molecolare per identificare eventuali adulterazioni dell'olio di oliva con oli di semi, si sono ottimizzate reazioni di PCR: prima in "singolplex" e poi in "duplex" mediante "end point"

PCR e successivamente in Real-Time PCR con SYBR<sup>®</sup> GreenER ed analisi delle curve di dissociazione degli ampliconi. La stessa analisi è stata realizzata in elettroforesi capillare su gel - size and color (CGE-SC).

E' stata poi valutata la possibilità di utilizzare i marcatori molecolari microsatelliti per determinare la composizione varietale dell'olio. Undici microsatelliti sono stati quindi impiegati per analizzare ventuno oli monovarietali. Per ciascun marcatore microsatellite e per ogni olio analizzato si è poi valutata l'applicabilità della metodica di analisi. Per migliorare quest'ultima sono stati provati anche mini-microsatelliti, ovvero gli stessi marcatori microsatelliti ma accorciati rispetto agli originali e quindi, almeno in teoria, più facilmente amplificabili su DNA altamente degradato.

Un altro aspetto del lavoro è stato lo sviluppo di analisi in Real-Time PCR quantitativa per definire la composizione varietale in miscele di oli monovarietali. I saggi si sono basati sull'utilizzo di sonde TaqMan disegnate su marcatori SNP in grado di caratterizzare le cultivar di olivo.

## Materiali

### Foglie e olio di oliva

Le foglie di olivo (*Olea europea* L.) e i rispettivi oli monovarietali (normali e denocciolati) utilizzati nel lavoro di ricerca sono riportati nella tabella 4.

Cultivar di olivo	Provenienza
<b>Frantoio<sup>a</sup>, Moraiolo<sup>a</sup>, Ogliarola<sup>b</sup>, Coratina<sup>b</sup></b> Foglie Olio Olio denocciolato Regione di coltivazione	Istituto di Genetica Vegetale (CNR Perugia, Italia). Dip. Scienze dell'alimentazione (Università di Perugia, Italia) Dip. Scienze dell'alimentazione (Università di Perugia, Italia) <sup>a</sup> Ambito nazionale, <sup>b</sup> Basilicata
<b>Leccino</b> Foglie Olio Olio denocciolato Regione di coltivazione	Azienda Agricola <i>Il Posticcio</i> (Lusuolo di Mulazzo, Italia) Azienda Agricola <i>Il Posticcio</i> (Lusuolo di Mulazzo, Italia) Azienda Agricola <i>Il Posticcio</i> (Lusuolo di Mulazzo, Italia) Ambito nazionale
<b>Itrana, Rosciola, Rappagliana</b> Foglie Olio Regione di coltivazione	Azienda Agricola <i>Colle Morgante</i> (Roma, Italia) Azienda Agricola <i>Colle Morgante</i> (Roma, Italia) Lazio
<b>Biancolilla, Tonda Iblea, Ogliarola Messinese, Nocellara del Bellice, Nocellara Etna, Moresca, Giaraffa</b> Foglie Olio Regione di coltivazione	Dipartimento di Colture Arboree (Università di Palermo, Italia) Dipartimento di Colture Arboree (Università di Palermo, Italia) Sicilia
<b>Taggiasca</b> Foglie Olio Regione di coltivazione	Consorzio Nazionale degli Olivicoltori (Roma, Italia) Consorzio Nazionale degli Olivicoltori (Roma, Italia) Liguria

**Tabella 4:** elenco delle foglie di olivo (*Olea europea* L.) utilizzate nel lavoro.

Le foglie sono state conservate a -80°C mentre i campioni di olio sono stati conservati a temperatura ambiente al buio fino al momento dell'estrazione del DNA.

## Oli di semi e foglie

Gli oli di semi impiegati sono riportati nella tabella 5, viene riportato il nome scientifico della specie vegetale utilizzata per la produzione dell'olio, la metodica di estrazione e la tipologia del prodotto.

Nome scientifico	Olio	Metodo di estrazione	Tipologia
<i>Zea mays</i>	Mais	Olio di semi ottenuto mediante estrazione con solvente	Commerciale
<i>Helianthus annuus</i>	Girasole	Olio di semi ottenuto mediante estrazione con solvente	Commerciale
<i>Corylus avellana</i>	Nocciola	Olio di semi ottenuto mediante estrazione con solvente	Commerciale
<i>Sesamum indicum</i>	Sesamo	Olio di semi ottenuto mediante estrazione con solvente	Commerciale
<i>Oryza sativa</i>	Riso	Olio di semi ottenuto mediante estrazione con solvente	Commerciale
<i>Cucurbita pepo</i>	Zucca	Olio di semi ottenuto mediante estrazione meccanica	Commerciale
<i>Glicine max</i>	Soia	Olio di semi ottenuto mediante estrazione con solvente	Commerciale
<i>Arachis hypogaea</i>	Arachide	Olio di semi ottenuto mediante estrazione con solvente	Commerciale

**Tabella 5:** elenco degli oli di semi utilizzati nel lavoro.

I materiali vegetali (foglie, drupe o semi) da cui è stato estratto il DNA sono riportati nella seguente tabella.

Specie vegetali	Matrice
Mais ( <i>Zea mays</i> )	Foglia
Arachide ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Semi sgusciati e pelati
Sesamo ( <i>Sesamum indicum</i> )	Drupa sgusciata
Soia ( <i>Glycine max</i> )	Farina
Zucca ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Semi
Girasole ( <i>Helianthus annuus</i> )	Foglia
Riso ( <i>Oryza sativa</i> )	Chicco
Nocciola ( <i>Corylus avellana</i> )	Foglia
Orzo ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Foglia
Grano ( <i>Triticum aestivum</i> )	Foglia
Noce ( <i>Juglans regia</i> )	Foglia
Anacardio ( <i>Anacardium occidentale</i> )	Drupa sgusciata
Mandorla ( <i>Prunus dulcis</i> )	Drupa sgusciata

**Tabella 6.** materiale vegetale utilizzato per l'estrazione del DNA.

## **Metodi**

### **Estrazione di DNA da foglie**

Il DNA genomico è stato estratto dalle diversi tipologie di foglie (o semi) utilizzando il metodo CTAB descritto da Doyle and Doyle (1987).

### **Estrazione di DNA da olio di oliva e di semi**

Differenti metodi sono stati utilizzati per estrarre DNA da oli di oliva monovarietali e di semi. Questi possono essere suddivisi in tre categorie in base alle caratteristiche chimico-fisiche delle metodologie con cui viene isolato e purificato il DNA:

1. interazione attraverso apposite matrici che legano il DNA;
2. separazione attraverso solventi;
3. estrazione tramite CTAB.

Per tutti i metodi di estrazione sono stati allestiti dei controlli negativi di estrazione.

#### **Nucleospin<sup>®</sup> Plant (Macherey-Nagel)**

Le diverse tipologie di olio sono state estratte utilizzando un kit commerciale indirizzato all'estrazione di DNA da materiale vegetale. Tale kit si basa sull'utilizzo di colonnine a polipropilene contenenti una membrana filtrante di silicio attivato in grado di trattenere gli acidi nucleici separandoli dalle proteine contaminanti, dai grassi, e da altri componenti cellulari.

Il protocollo eseguito è lo stesso fornito dal produttore ma con le seguenti modifiche. 1 ml di tampone C1 (fornito dal kit) è stato aggiunto ad 1 ml di olio, per un volume iniziale di 2 ml. Dopo l'omogeneizzazione mediante vortex, il campione è stato incubato a 65°C per 90 minuti sotto agitazione. Dopo un'estrazione fenolo/cloroformio/isoamil alcool (25:24:1), il supernatante è stato centrifugato a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C, 400 µl di questa soluzione sono stati prelevati e uniti a 400 µl di tampone C4 (fornito dal kit) e 300 µl di etanolo assoluto in una nuova eppendorff da 1.5 ml, il tutto è stato mescolato per 30 secondi mediante vortex. La soluzione è stata caricata nelle colonnine "Nucleospin Plant column" (fornite dal kit) e processata seguendo le istruzioni fornite dal protocollo standard del kit. Il DNA è stato eluito in 200 µl di acqua sterile e conservato a -20 °C.

## Metodo Consolandi-Palmieri

L'olio di oliva monovarietale è stato estratto seguendo il protocollo sperimentale Consolandi and Palmieri (2008).

## Protocollo Sperimentale CTAB

In una provetta da 15 ml sono stati miscelati 4 ml di olio e 2 ml di CTAB tampone di estrazione (100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% w/v CTAB; 0.2% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol) addizionato di DTT 1% prima dell'uso. I campioni sono stati incubati a 65°C per 30 minuti agitando regolarmente.

Dopo aver fatto raffreddare la miscela a temperatura ambiente è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio/alcol isoamilico (24:1) seguito da una centrifugazione a 14000 rpm per 20 minuti. La fase superiore acquosa è stata trasferita in una nuova provetta da 15 ml; il DNA è stato quindi precipitato aggiungendo 1 volume di isopropanolo freddo e centrifugando a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il pellet è stato lavato due volte con etanolo 70%, asciugato a temperatura ambiente e risospeso in 60  $\mu$ l di acqua preriscaldata a 37°C e conservato a -20 °C.

## PCR qualitativa per lo studio di degradazione del DNA

Lo studio sulla degradazione del DNA è stato svolto mediante l'utilizzo di coppie di primer, disegnate sulla sequenza del cDNA dell'oleosina di *Olea europea* L. (NCBI AY083161) in grado di amplificare frammenti di lunghezza decrescente (Tabella 7).

Forw. primer 5'-3'	Rev. primer 5'-3'	Amplicone (bp)
AGGGCAAGAAGTCGAAATCTG	GGCGATCGTTAGGTCATAAAC	157
GGCGGCGGAATGAAGAGTGTCG	GAACCCTACTGGCACTCGCC	106
CCAAAAAAGTGTCCTCAAC	GCCAACAGGGAGGATGAGT	61
CCAAAAAAGTGTCCTCAAC	AGGGAGGATGAGTGACGACT	57

**Tabella 7:** sequenze dei primer e dimensione degli ampliconi attesi utilizzati per lo studio di degradazione del DNA.

Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25  $\mu$ l partendo da 8  $\mu$ l di soluzione di DNA estratto da olio o 40 ng di DNA estratto da foglia, in presenza di buffer di PCR 1x (50mM Tris-HCl, 10mM KCl, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM di ogni dNTP, 0.2  $\mu$ M di primer forward e reverse, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA (Roche Applied Science), 1U FastStart *Taq* DNA Polymerase (Roche Applied Science).

Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore TC-512 (Techne, Duxford, Cambridge, UK) nelle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti; 40 cicli a 95°C per 30 secondi, 58°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi con una fase di estensione finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio a concentrazione 4% (w/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in tampone di corsa TAE 1X contenente 1 µg/mL di Etidio Bromuro. I gel venivano visualizzati mediante lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 Image Detector (BIO-RAD, Hercules, USA).

### PCR qualitativa del DNA estratto da olio di oliva e di semi

Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25 µl partendo da 8 µl di soluzione di DNA estratto da olio o 40 ng di DNA estratto da foglie o semi, in presenza di buffer di PCR 1x (50mM Tris-HCl, 10mM KCl, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.3), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM di ogni dNTP, 0.2 µM di primer forward e reverse, 0.1 µg/µl BSA (Roche Applied Science), 1U FastStart *Taq* DNA Polymerase (Roche Applied Science). Le amplificazioni sono state realizzate in un termociclatore TC-512 (Techne, Duxford, Cambridge, UK) nelle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti; 40 cicli a 95°C per 45 secondi, la corrispondente temperatura di annealing per 45 secondi, 72°C per 35 secondi, 72°C per 30 minuti. Le temperature di annealing e le caratteristiche dei primer utilizzati sono riportati nella seguente tabella.

Specificità	Fonte	Codice identificativo	Amplicone (bp)	An. Temp. (°C)
<i>Olea europea</i>	Bautista <i>et al.</i> , 2002	J18	71	60
<i>Olea europea</i>	AY083163	Fad726	103	58
<i>Zea mays</i>	X04050	Adh56	56	60
<i>Helianthus annuus</i>	AF529201.1	Sun41	41	58
<i>Coryllus Avellana</i>	*****	Noc54	54	60

**Tabella 8:** caratteristiche dei primer utilizzati in PCR qualitativa per le prove di amplificabilità del DNA estratto da olio di oliva e di semi (\*\*\*= coperto da brevetto).

### Real-Time PCR con tecnologia SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup>

Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25 µl partendo da 10 µl di soluzione di DNA, in SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup> qPCR Supermix for ABI PRISM<sup>®</sup> 1X (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California), 0.2 µM di primer reverse (Tabella 7), 0,1 µg/µl BSA (Roche, Applied Science, Germany). Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando lo strumento ABI PRISM 7000 (Roche, Applied BioSystem, Foster City, CA, USA), seguendo il seguente profilo termico: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95 ° C per 15 secondi e 50°C per 1



minuto. Per ogni reazione di PCR sono stati realizzati controlli negativi (senza DNA) e positivi, amplificando 40 ng di DNA estratto da foglia. I primer sono stati disegnati attraverso il programma Primer 3 (Rozen and Helen, 2000), la temperatura di melting degli ampliconi è stata analizzata mediante il software Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (Kibbe, 2007), al fine di valutare la loro compatibilità con le caratteristiche tecniche del termociclatore su cui si sarebbero realizzate le amplificazioni di PCR, con particolare attenzione alla fase finale di dissociazione degli ampliconi. Nelle tabelle seguenti vengono riportate le caratteristiche dei primer utilizzati per l'analisi in Real Time PCR.

Codice identificativo	Specificità	Fonte	Amplicone (bp)
J18	<i>Olea europea</i>	Bautista <i>et al.</i> , 2002	71
Fad726	<i>Olea europea</i>	AY083163	103
Hmg77	<i>Zea mays</i>	AJ131373.1	77
Sun66	<i>Helianthus annuus</i>	AF529201.1	66
Noc54	<i>Coryllus Avellana</i>	*****	54
Ses	<i>Sesamum indicum</i>	*****	100
Gos51	<i>Oryza sativa</i>	X51909	50
Matk	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ536666	65
Le2	<i>Glicine max</i>	EU070414.1	51

**Tabella 9:** caratteristiche dei primer utilizzati in SYBR® GreenER™ Real-Time PCR (\*\*\*= coperto da brevetto).

Codice identificativo	Forw. primer 5'-3'	Rev. primer 5'-3'
J18	GACGGTACGCGTTCGGTTT	TCATACACAATTGAATTTCACTGCAT
Fad726	GATCGAGAACGTGCTCAAAT	AATACCCAAGCGAGTCCTT
Hmg77	AGACTGCTCCTGCTGGTCAT	AGCTGCAGTGCTCTGAACAA
Sun66	CATGGTGCACCCAAGTGTAG	GGTAGGCACGGTGTGAGATT
Noc54	*****	*****
Ses	*****	*****
Gos51	GCTTTTAGCCTCCCGTGCAGA	CGTCCGAAGAAACCAACCAC
Matk	TCTGCTTGGATCATTGGCTA	TCGGCTTACTAATGGGATGC
Le2	GCTCGATTTGAAGGTTGCTC	AGTCCGGTGGTAGCAGAGAA

**Tabella 10:** sequenze e dimensioni degli ampliconi dei primer utilizzati in SYBR® GreenER™ Real-Time PCR (\*\*\*= coperto da brevetto).

La possibilità di poter discriminare due o più ampliconi mediante profili di dissociazione è collegata alla dimensione e alla composizione in basi dell'amplicone stesso, ma anche al potere dello strumento di risolvere profili di dissociazione con temperature vicine. Per questo motivo alcuni primer precedentemente usati in PCR qualitativa sono stati ridisegnati per ottimizzarne l'applicabilità alla piattaforma della Real-Time PCR. Le reazioni di PCR sia duplex che singole sono state testate su miscele di olio di oliva e di olio di semi (nociola, mais, girasole)

appositamente preparate da cui è stata estratto il DNA con il metodo commerciale Nucleospin Plant (Macherey-Nagel). Gli oli e le loro percentuali sono riportati nella successiva tabella.

Olio di oliva monovarietale Leccino	Olio di semi di mais	Olio di nocciola	Olio di semi di girasole
70%	30%	30%	30%
50%	50%	50%	50%
30%	70%	70%	70%

**Tabella 11:** percentuali delle miscele olio di oliva e di semi utilizzate per le estrazioni di DNA.

## PCR con primer marcati ed elettroforesi capillare (CGE-SC)

La PCR-CGE-Size and Color è una tecnica che abbina ad una prima amplificazione in PCR una seconda fase di elettroforesi capillare, quest'ultima permette di separare gli ampliconi sia in base alla dimensione che alla emissione di una specifica fluorescenza. L'analisi è stata effettuata con i primer riportati in tabella 8 (per amplificare il DNA estratto dalla foglia di olivo e dall'olio è stato usato il primer Fad726), le sequenze dei primer forward sono state marcate al 5' con il fluoroforo IRD700 (Eurofins MWG Operon, Huntsville, USA). La separazione dei frammenti è stata eseguita mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore CEQ™ 2000 XL (Beckman-Coulter). Ogni campione è stato preparato utilizzando 0.2 µl di CEQ™ DNA Size Standard 400 (Beckman-Coulter) e 0.5 µl di reazione di PCR in un volume finale di 30 µl di formamide. Le corse di PCR 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.

## Real-Time PCR con tecnologia TaqMan® MGB

### Studio dell'effetto matrice nella estrazione del DNA dall'olio di oliva

Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25 µl partendo da 8 µl di soluzione di DNA o di 40 ng di DNA estratto da foglia, in presenza di Taq Gold MMix 2X (Roche, Applied BioSystem, Foster City, CA, USA), 0.2 µM di primer forward e reverse, 0.2 µM di sonda TaqMan®-MGB, 0.1 µg/µl BSA (Roche, Applied Science, Germany). Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando lo strumento ABI PRISM 7000 (Roche, Applied BioSystem, Foster City, CA, USA), seguendo il seguente profilo termico: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 50°C per 1 minuto.

Di seguito sono riportate le sequenze dei primer e della sonda che sono state realizzate utilizzando il programma Primer Express v. 2.0 (Roche, Applied BioSystem, Foster City, CA,

USA) sulla sequenza codificante per il gene codificante per la subunità cloroplastici della ribuloso 1-5 bisfosfato carbossilasi (NCBI AJ001766). La dimensione attesa dell'amplicone è di 58 bp.

Primer forward: 5' CAGCATTCCGAGTAACTCCTCAA 3'

Primer reverse: 5' ACCGCAGCCCCTGCTT 3'

Sonda: 5' VIC-CTGGAGTTCCGCCTGA-NFQ MGB 3'

La retta standard per la quantificazione dei campioni è stata ottenuta da diluizioni seriali 1:2 del DNA vegetale della cultivar di origine dell'olio in analisi, in un intervallo di quantità di DNA compreso tra 200 ng e 0.16 ng. Per studiare l'effetto matrice sono state aggiunte quantità di DNA note a due differenti tipi di olio monovarietale (Taggiasca e Petit Ribier) da estrarre eseguendo diluizioni seriali 1:2 partendo da una quantità di DNA di 200 ng e arrivando ad una quantità finale di 0.16 ng. Il DNA vegetale precedentemente quantificato allo spettrofotometro è stato aggiunto ai campioni di olio sia in forma liquida che precipitata mediante sodio acetato e etanolo seguendo il protocollo descritto da Sambrook and Russell (2001).

## **Analisi quantitativa mediante marcatori molecolari SNP**

### **Varietà di olivo utilizzate**

La genotipizzazione delle cultivar di olivo mediante SNP attraverso la tecnica del minisequenziamento ha permesso di individuare diversi genotipi caratteristici per alcune varietà (Vietina, 2005, Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Genetica e Biotecnologie Ambientali, Università degli Studi di Parma). Le varietà di olivo utilizzate e la mutazione precedentemente individuata sono riportati nella seguente tabella.

<b>Cultivar di olivo</b>	<b>SNP</b>
Leccino	CC
Nocellara del Bellice	CT
Biancollila	TT

**Tabella 12:** cultivar di olivo e polimorfismi SNP.

### **Disegno dei primer e delle sonde**

Per svolgere un'analisi di tipo quantitativo in Real-Time PCR utilizzando i polimorfismi di sequenza rilevati a seguito dell'analisi SNP, sono state disegnate due sonde fluorescenti TaqMan<sup>®</sup> MGB in prossimità di tale polimorfismo utilizzando il programma Primer Express v. 2.0 (Roche, Applied BioSystem, Foster City, CA, USA). La sequenza in cui è stato individuato il

polimorfismo SNP, di tipo C/T, ha numero di accessione NCBI AY083161 e rappresenta un cDNA codificante per la proteina oleosina, responsabile della formazione dei corpi oleosi. La dimensione attesa dell'amplicone è di 78 bp. Di seguito sono riportate le sequenze dei primer e delle sonde:

Primer forward Oleo78F 5' CGGAATGAAGAGTGTCTT 3'

Primer reverse Oleo78R 5' AACAGGGAGGATGAGTGACG 3'

Sonda T 5' 6FAM -AGCCAAGTTTGGC- NFQ MGB 3'

Sonda C 5'VIC -TAGCCAAGCTTGG - NFQ MGB 3'

### **Verifica della specificità delle sonde fluorescenti**

E' stata svolta un'analisi di ibridazione incrociata per verificare la specificità delle sonde per i differenti polimorfismi utilizzati nell'analisi quantitativa secondo il seguente schema.

<b>Sonda</b>	<b>SNP da rilevare</b>
Sonda T	Cultivar con SNP C
Sonda C	Cultivar con SNP T

**Tabella 13:** schema dell'analisi di specificità eseguita con le sonde TaqMan<sup>®</sup> MGB in Real-Time PCR.

### **Ottimizzazione della concentrazioni dei primer e delle sonde**

L'analisi quantitativa è stata condotta su campioni di DNA estratto da foglie di olivo cultivar allo scopo di poter individuare la singola mutazione. Per poter ottenere una reazione di amplificazione bilanciata e efficiente, le concentrazioni dei primer sono state bilanciate allestendo una matrice di "bilanciamento" con i seguenti valori: 50 nM, 100 nM, 300 nM, 600 nM e 900 nM sia per il forward che per il reverse primer. La concentrazione delle coppia di sonde è stata ottimizzata verificandone il funzionamento a 50 nM, 100nM, 200 nM, 200 nM e 300 nM. Il risultato della reazione veniva rilevato come livello di fluorescenza ai differenti cicli in tempo reale. Una volta ottenuto il risultato della reazione di amplificazione in Real-Time PCR, è stato individuato, in base alle curve di fluorescenza rilevate, il ciclo soglia di amplificazione utile per le diverse reazioni contenenti le diverse concentrazioni di primer. I dati ottenuti sono stati riportati su una matrice ed analizzati graficamente per individuare il bilanciamento ideale dei primer in base al numero di cicli e al valore di fluorescenza. La reazione è stata condotta in un volume finale di 25 µl con 40 ng di DNA, in presenza di Taq Gold MMix 1X (Roche, Applied BioSystem, Foster City, CA, USA) e di una specifica concentrazione di primer e sonde in base alla matrice di ottimizzazione. Le amplificazioni sono state eseguite sul termociclatore ABI PRISM 7000 (Roche, Applied BioSystem, Foster City, CA, USA), seguendo

il seguente profilo termico: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 50°C per 1 minuto.

### Preparazione della retta standard

La retta standard per la quantificazione dei campioni è stata ottenuta da diluizioni seriali 1:2 del DNA vegetale delle cultivar Leccino, per la variante CC, e Biancollila per la variante TT, partendo da una quantità di DNA di 100 ng e arrivando ad una quantità finale di 0.16 ng. La combinazione delle rette specifiche per i due SNP, ha permesso di realizzare un'unica retta standard in un intervallo di quantità di DNA compreso tra 100 ng e 0.16 ng. La specificità delle sonde utilizzate ha consentito di rilevare sempre ed esclusivamente la cultivar con il polimorfismo di interesse.

### Analisi con marcatori molecolari microsatelliti

I microsatelliti utilizzati per la genotipizzazione di sedici cultivar di ventuno oli di oliva monovarietali sono stati scelti seguendo le informazioni già presenti in letteratura. Nove microsatelliti nucleari (De La Rosa *et al.*, 2002; Sefc *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 2002; Carriero *et al.*, 2002) e due microsatelliti cloroplastici (Weising *et al.*, 1999) sono quindi stati utilizzati per determinare l'identità del contenuto degli oli monovarietali con le rispettive cultivar.

Locus	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	An. Temp. (°C)	Size range (bp)
EMO 30	GTCTCTGCCCAACAATG	CATACATGAGTGTGTGTG	55	183-196
EMO90	CATCCGGATTCTTGCTTTT	AGCGAATGTAGCTTTGCATG	55	180-197
DCA5	AACAAATCCCATACGAACTGCC	CGTGTGTCTGTGAAGAAAATCG	58	195-211
DCA8	ACAATTCAACCTCACCCCATACCC	TCACGTCAACTGTGCCACTGAACTG	60	123-139
DCA17	GATCAAATTCTACAAAAATATA	TAATTTTTGGCACGTAGTATTGG	58	101-183
DCA18	AAGAAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC	GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	55	168-184
GAPU71B	GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA	ACAACAAATCCGTACGCTTG	56	121-143
GAPU89	GATCATTCCACACACGAGAG	AACACATGCCACAAACTGA	53	160-203
UDO99-009	TTGATTTCACATTGCTGACCA	CATAGGGAAGAGCTGCAAGG	53	80-118
CCMP5	TGTTCCAATATCTTCTGTGCATTT	AGGTTCCATCGGAACAATTAT	54	104
CCMP10	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA	TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	52	102

**Tabella 14:** microsatelliti utilizzati per l'analisi di determinazione varietale, sequenze dei primer, temperatura di annealing e intervallo di dimensione degli ampliconi.

Ogni DNA di cultivar è stato analizzato in triplo per ogni locus così come ognuna delle tre estrazioni da olio di oliva monovarietale. Ciò significa che per ogni olio analizzato sono state eseguite nove genotipizzazioni per ogni locus senza considerare l'analisi dei controlli di estrazione eseguite per verificare l'assenza di contaminazioni accidentali. I primer forward dei microsatelliti sono stati marcati con i fluorofori Cy5 e IRD700 (Eurofins MWG Operon, Huntsville, USA). per la rilevazione fluorimetrica in elettroforesi capillare. Le amplificazioni sono state condotte in un volume finale di 25 µl partendo da 8 µl di soluzione di DNA estratto da olio o 50 ng di DNA estratto da foglie, in presenza di buffer di PCR 1x (50mM Tris-HCl, 10mM KCl, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.3), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM di ogni dNTP, 0.2 µM di primer forward e reverse, 0.1 µg/µl BSA (Roche Applied Science), 1U FastStart *Taq* DNA Polymerase (Roche Applied Science). Le amplificazioni sono state realizzate in un termociclatore TC-512 (Techne, Duxford, Cambridge, UK) nelle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti; 40 cicli a 95°C per 45 secondi, la corrispondente temperatura di annealing per 45 secondi, 72°C per 35 secondi; 72°C per 30 minuti. Le temperature di annealing dei primer per ogni microsatellite sono descritte nella tabella 14 insieme alle altre caratteristiche. La separazione dei frammenti degli SSR è stata eseguita mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore CEQ™ 2000 XL (Beckman-Coulter). Ogni campione è stato preparato utilizzando 0.2 µl di CEQ™ DNA Size Standard 400 (Beckman-Coulter), 0.5 µl di reazione di PCR in un volume finale di 30 µl di formamide. Le corse di PCR 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.

### **Tecnologia mini SSR**

Sono stati ridisegnati i primer di cinque marcatori SSR in modo tale da ottenere ampliconi di dimensioni inferiori alle originali attraverso il programma Primer 3 (Rozen and Helen, 2000).

<b>Locus</b>	<b>Forward primer 5'-3'</b>	<b>Reverse primer 5'-3'</b>	<b>An. Temp. (°C)</b>	<b>Amplicone (bp)</b>
EMO 30	GGTTGTTTGGTCTCTGTTT	CATACATGAGTGTGTGTG	55	65
EMO90	TTTTTTGGAGACAAGGTGAT	CAAAAGATTGATTCTTCGAGCA	55	60
DCA8	ACATCGCAGGGAAAACATCT	CAAAAGATTGATTCTTCGAGCA	55	88
DCA14	AATTTTTTAATGCACTATAATTTAC	TGATTCTGTGTCCTAGTA	50	88
DCA18	ACATCGCAGGGAAAACATCT	CAAAAGATTGATTCTTCGAGCA	55	104

**Tabella 15:** mini microsatelliti utilizzati per l'analisi di determinazione varietale, sequenze dei primer, temperatura di annealing e dimensione degli ampliconi attesi.

Nei risultati si farà riferimento a questi SSR con la sigla mini dopo il nome del locus (es: EMO30-mini). Le reazioni di amplificazione, il profilo termico ed il numero di repliche eseguite sono le stesse descritte nel precedente paragrafo. Le cultivar di olivo e i rispettivi oli di oliva monovarietali utilizzati per questo tipo di analisi erano: Rosciola, Tonda Iblea, Leccino, Rappagliana, Giaraffa e Taggiasca (Tabella 4).

### **Purificazione delle reazioni di PCR e sequenziamento**

Diversi prodotti di PCR sono stati isolati e sequenziati per confermare la loro identità con le sequenze attese. Le reazioni di PCR sono state purificate con il Kit GFX™ PCR DNA and Band Purification (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Gli ampliconi selezionati sono stati clonati all'interno del vettore pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) secondo il protocollo pGEM®-T Vector and pGEM®-T Easy Vector Systems; fornito dal kit.

I plasmidi ricombinati ottenuti sono stati successivamente purificati mediante il kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel, Duren, Germany) e quantificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (2%) attraverso l'uso del marcatore di peso Molecular Weight Marker XIV (100-1500 bp) (Roche, Applied Science, Germany).

Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite con primer universali M13 con il Kit CEQ™ DTCS Quick Start (Beckman-Coulter) in un termociclature Genius Techne TC 512 thermal cycler (Duxford, Cambridge, UK) secondo il seguente profilo termico: 40 cicli a 96°C per 40 secondi, 50°C per 40 secondi, 60°C per 40 minuti. I prodotti di sequenziamento sono stati risospesi in 40 µl di formamide e analizzati mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico CEQ 2000 XL (Beckman-Coulter). L'analisi delle sequenze è stata poi realizzata mediante l'utilizzo del software CEQ 8000 DNA Analysis System software (Beckman-Coulter).

### **Quantificazione fluorimetrica del DNA**

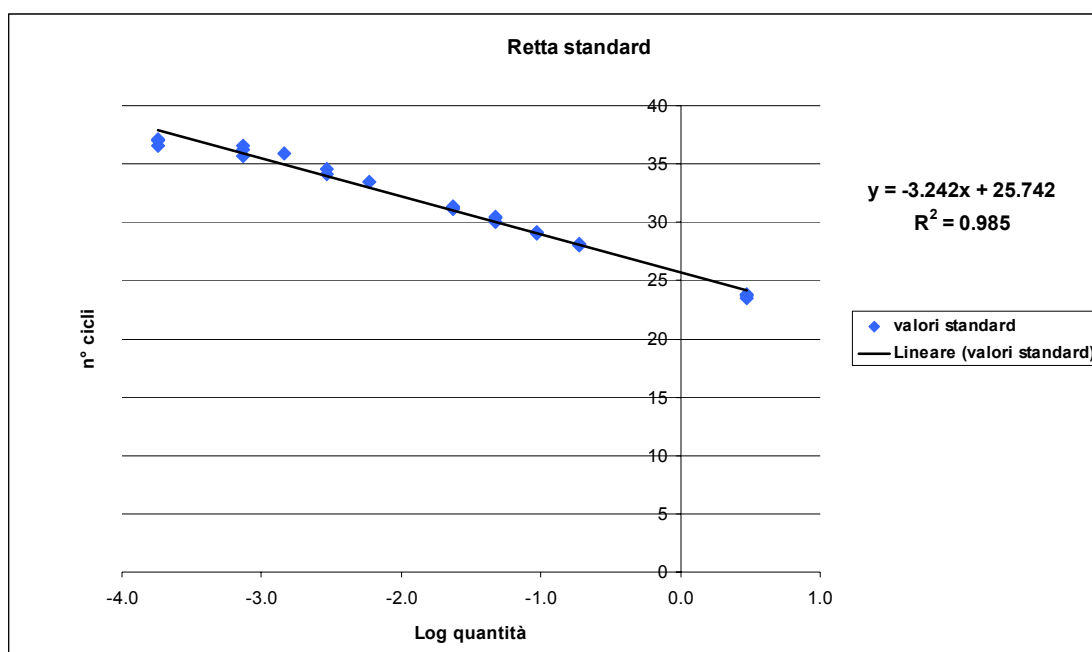
Il fluorocromo sensibile PicoGreen® si lega selettivamente al DNA a doppia, è stato quindi usato per quantificare il DNA estratto da diversi tipi di oli di semi, seguendo il protocollo riportato nel kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits, Invitrogen, USA.

## Risultati

### Analisi dell'effetto matrice sulle metodiche di estrazione del DNA dall'olio di oliva

La tecnica Real-Time PCR è stata utilizzata per: *i*) quantificare il DNA estratto da oli di oliva monovarietali, *ii*) studiare l'effetto matrice, ovvero la capacità di recuperare DNA puro diluito in olio di due diversi metodi di estrazione: Nucleospin Plant e il protocollo sperimentale Consolandi and Palmieri (2008), al fine di valutare quale dei due fosse il più adatto per effettuare l'estrazione e per le successive analisi con marcatori molecolari.

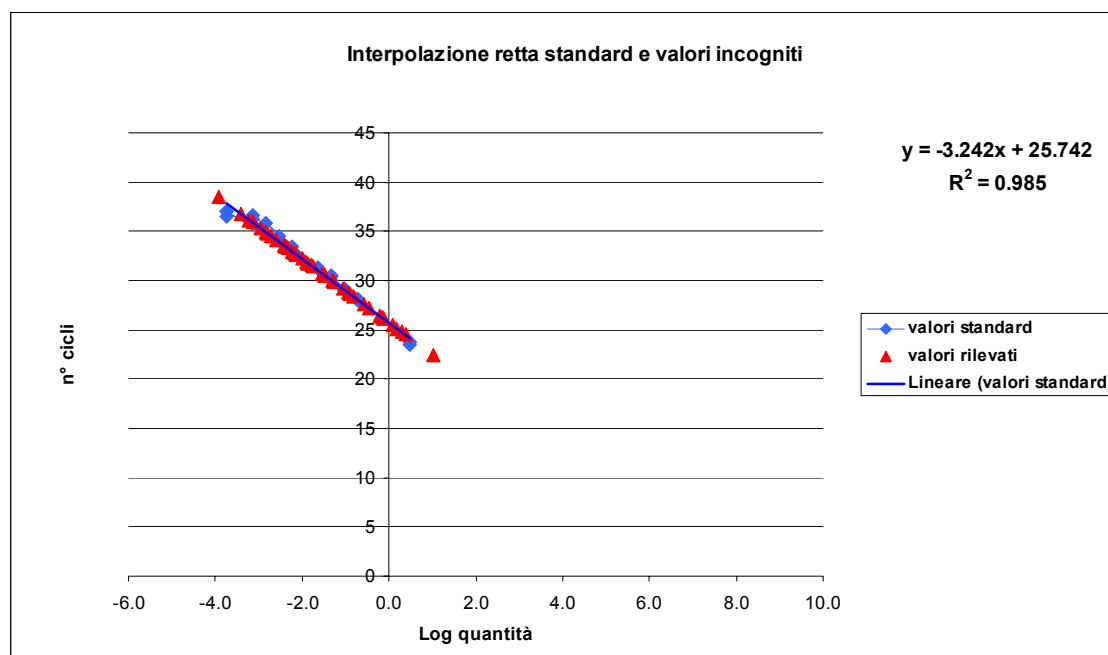
A tale scopo è stata quindi realizzata una retta di taratura con diluizioni seriali di DNA (estratto dalle foglie di olivo a concentrazione nota), da 200 ng a 0.16 ng (Figura 3).



**Figura 3:** retta di taratura ottenuta dalla quantificazione mediante Real-Time PCR di diluizioni seriali di DNA vegetale a quantità note.

La retta di taratura presenta un limite di rilevabilità, inteso come la quantità minima di DNA identificabile all'interno dell'intervallo di linearità pari a 0.16 ng di DNA. I valori dei cicli soglia delle amplificazioni del DNA estratto dagli oli monovarietali analizzati sono stati interpolati con la retta di taratura, verificando che tali valori si posizionassero nell'intervallo di linearità atteso. Come si può osservare dalla figura seguente il risultato è stato conforme alle aspettative.





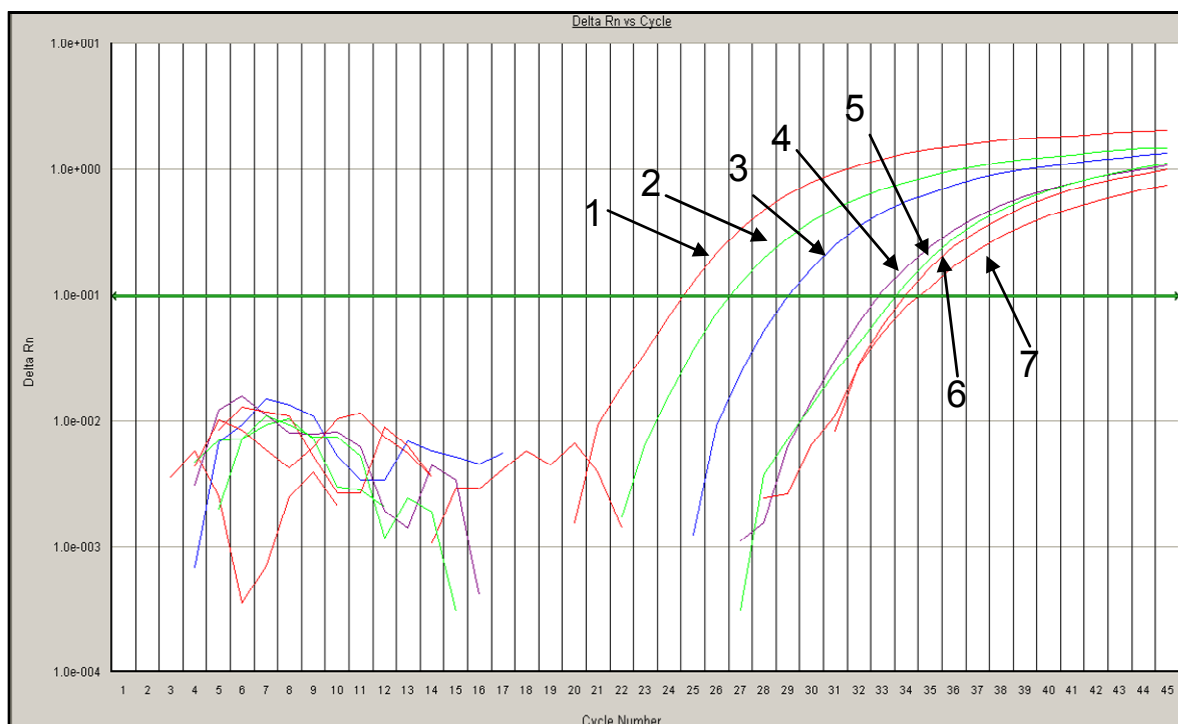
**Figura 4:** interpolazione valori incogniti con la retta standard.

Per valutare quindi l'effetto matrice sono state allestite una serie di estrazioni di DNA da campioni di 1 ml di olio d'oliva in cui sono state addizionate diverse quantità di DNA estratto dalle foglie delle rispettive cultivar di riferimento. Il DNA è stato aggiunto sia in forma liquida che precipitato per ovviare al problema della immiscibilità dell'acqua con l'olio. Le analisi sono state effettuate su due diversi tipi di olio monovarietale: Taggiasca (cultivar italiana) e Petit Ribier (cultivar francese). Mediante la retta di taratura precedentemente costruita, è stata calcolata la percentuale di recupero del DNA dei due metodi di estrazione. In base ai risultati della quantificazione è stata calcolata la resa media di estrazione dei metodi testati (Tabella 16).

Parametri costanti	Parametro valutato		Resa media percentuale
Tipo di olio Metodo di estrazione	Tipologia del DNA aggiunto	Precipitato	9% ± 0.2
		Liquido	5% ± 0.1
Tipologia del DNA aggiunto Metodo di estrazione	Tipo di olio	Taggiasca	9% ± 0.2
		Petit Ribier	5% ± 0.1
Tipologia del DNA aggiunto Tipo di olio	Metodo di estrazione	Nucleo Spin Plant	13% ± 0.2
		Palmieri-Consolandi	1% ± 0.1

**Tabella 16:** analisi dei parametri valutati per lo studio dell'effetto matrice sull'olio di oliva attraverso l'analisi in Real-Time PCR.

Come si può osservare dai profili di amplificazione del DNA estratto, aggiunto e riestratto nuovamente dall'olio Taggiasca, è stata osservata una linearità tra i cicli soglia ( $C_T$ ) e la quantità di DNA corrispondente fino alla diluizione seriale 1:8 del DNA in olio (Figura 5). Tuttavia tra una diluizione e l'altra non è stata osservata la differenza di un ciclo, come atteso per una diluizione di un fattore 1:2, infatti tra la curva del campione di olio addizionato con 100 ng di DNA e quello addizionato con 50 ng, si presentavano quasi tre cicli di differenza, che aumentavano a quattro tra il campione addizionato con 50 ng e quello addizionato con 25 ng. Il campione di DNA estratto da olio non addizionato aveva un ciclo soglia di amplificazione, rispecchiando quanto era stato previsto, all'incirca di dieci cicli a valle rispetto a quello contenente 100 ng di DNA di foglia di cultivar e un ciclo a valle rispetto al campione addizionato con 6.25 ng di DNA di foglia.



**Figura 5:** profilo di amplificazione del DNA estratto con il metodo commerciale Nucleo Spina Plant da olio d'oliva Taggiasca precedentemente addizionato con quantità note di DNA vegetale estratto dalla foglia di riferimento (diluizioni seriali 1:2). 1: DNA estratto da foglia (100 ng), 2: olio addizionato con 100 ng di DNA, 3: olio addizionato con 50 ng di DNA, 4: olio addizionato con 25 ng di DNA, 5: olio addizionato con 12.5 ng di DNA, 6: olio addizionato con 6.5 ng di DNA, 7: olio non addizionato.

La quantità recuperabile e amplificabile di DNA aggiunto all'olio da estrarre risultava quindi essere influenzata principalmente dal metodo di estrazione e dalla presenza di inibitori associati al DNA eluito. Attraverso i controlli di estrazione e la successiva analisi quantitativa è stata valutata la resa di estrazione dei due metodi. Il confronto è stato effettuato prendendo in

considerazione anche altri parametri, quali il volume di olio necessario per l'estrazione, il ciclo soglia medio, il tempo e il costo di estrazione per campione. Il confronto ha stabilito che il metodo commerciale Nucleo Spin Plant, anche se leggermente più costoso, fornisce rese di estrazione migliori e richiede tempi di lavorazione ridotti. I parametri analizzati sono riportati nella seguente tabella.

Parametri valutati	Metodo Palmieri-Consolandi	Nucleo Spin Plant
Volume iniziale olio	12 ml	1 ml
Ciclo soglia medio	31 ± 0.5	27 ± 0.5
Resa stimata (ng/ml olio)	2.1 ± 0.5	31 ± 0.5
Tempo	12 ore	5 ore
Costo	1 euro	3 euro

**Tabella 17:** tabella riassuntiva dei parametri analizzati per i differenti metodi di estrazione analizzati.

### Analisi delle metodiche di estrazione del DNA estratto dall'olio di semi

L'estrazione del DNA dall'olio di semi di nocciola, mais, girasole, zucca, soia, arachide, sesamo e riso è stata effettuata utilizzando un protocollo sperimentale modificato a base di CTAB e il metodo commerciale Nucleo Spin Plant, utilizzando sempre la parte liquida dell'olio. Il DNA è stato estratto estratto in triplicato e quantificato attraverso fluorimetria con l'uso dell'intercalante PicoGreen<sup>®</sup>, dopo aver realizzato una apposita retta di taratura (Tabelle 18 e 18A)

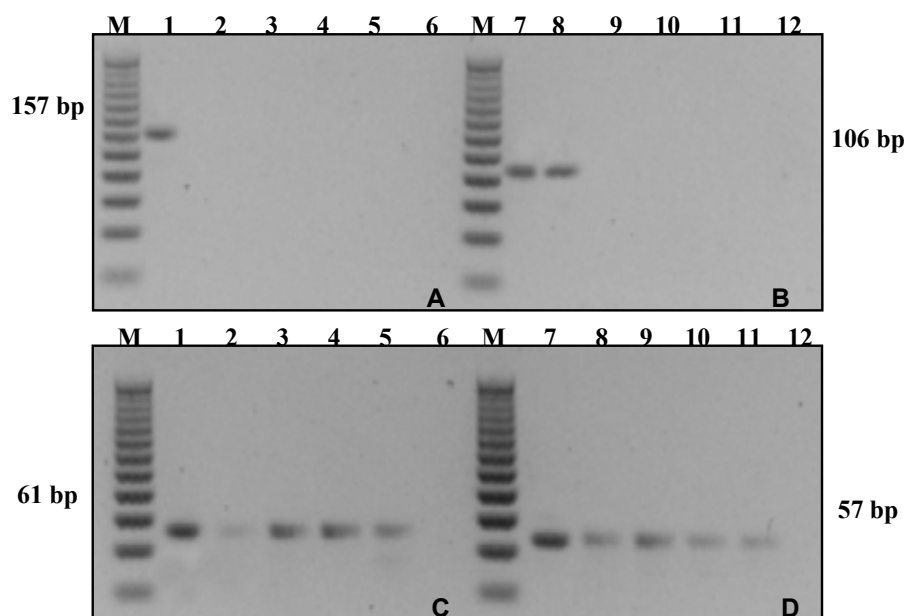
Tipo di olio	Resa stimata Nucleo Spin Plant (ng/ml olio) Volume iniziale olio: 1 ml	Resa stimata metodo CTAB (ng/ml olio) Volume iniziale olio: 4 ml
Nocciola estraz. 1	53.53	5.31
Nocciola estraz. 2	47.99	5.31
Nocciola estraz. 3	46.60	5.31
Mais estraz. 1	46.60	6.00
Mais estraz. 2	45.22	6.00
Mais estraz. 3	47.99	6.17
Girasole estraz. 1	45.22	5.48
Girasole estraz. 2	43.83	5.31
Girasole estraz. 3	43.83	5.65
Zucca estraz. 1	23.30	5.83
Zucca estraz. 2	22.61	5.65
Zucca estraz. 3	23.30	5.83

**Tabella 18:** risultati della quantificazione fluorimetrica della quantità di DNA estratto da diverse tipologie di oli.

Tipo di olio	Resa stimata Nucleo Spin Plant (ng/ml olio) Volume iniziale olio: 1 ml	Resa stimata metodo CTAB (ng/ml olio) Volume iniziale olio: 4 ml
Soia estraz. 1	23.99	6.17
Soia estraz. 2	21.92	6.17
Soia estraz. 3	21.92	7.38
Arachide estraz. 1	22.61	5.65
Arachide estraz. 2	22.61	5.65
Arachide estraz. 3	23.30	5.83
Sesamo estraz. 1	24.69	6.17
Sesamo estraz. 2	24.69	6.17
Sesamo estraz. 3	29.53	7.38
Riso estraz. 1	23.69	5.92
Riso estraz. 2	21.69	5.42
Riso estraz. 3	22.53	5.63

**Tabella 18A:** risultati della quantificazione fluorimetrica della quantità di DNA estratto da diverse tipologie di oli.

Al fine di valutare il livello di degradazione del DNA estratto e la sua amplificabilità sono state disegnate quattro coppie di primer sulla sequenza del gene oleosina (Tabella 7), che permettevano l'amplificazione di frammenti di lunghezza decrescente pari a: 157 bp, 106 bp, 61 bp e 57 bp. Le amplificazioni sono state condotte sulle estrazioni realizzate con entrambi i metodi.



**Figura 6:** elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA estratto da: 1-7: controllo positivo di DNA di olivo estratto da foglia (60 ng); 2-8: olio di oliva Leccino monovarietale; 3-9:olio di semi di nocciola; 4-10: olio di semi girasole ; 5-11: olio di semi di mais; 6-12: controllo negativo di PCR; M: marcatore di peso molecolare 25 bp. Le coppie di primer A, B, C, D amplificano ampliconi rispettivamente di 157 bp, 106 bp, 61 bp e 57 bp. Il DNA è stato estratto dall'olio con il metodo commerciale Nucleo Spin-Plant.

Il DNA estratto da olio di oliva è stato amplificato fino a un massimo di 106 bp. L'amplificazione del DNA estratto dalle tre tipologie di oli di semi forniva invece solo frammenti di 61 bp e 57 bp (Figura 6).

L'analisi è stata effettuata solo sui campioni di DNA estratti da olio di oliva, nocciola, mais e girasole, con l'obiettivo di valutare la possibilità di sviluppare reazioni di PCR duplex per la identificazione di oli non di oliva in miscele di olio di oliva.

## PCR su DNA estratto da olio di oliva e di semi

### Analisi di specificità e ottimizzazione delle concentrazioni dei primer in PCR singola

In seguito ai risultati dello studio di degradazione si è deciso di disegnare primer che producessero ampliconi in un intervallo di lunghezza compreso tra 50 bp e 100 bp, specifici per i DNA delle varie specie da utilizzare in "end point" PCR (Tabella 8).

La prima fase del lavoro è stata quindi di verificare la specificità dei primer sulle diverse matrici vegetali per escludere la possibilità di cross-reazioni. Questa analisi diventa fondamentale con la prospettiva di sviluppare una PCR duplex sia tradizionale che in Real-Time PCR.

I primer disegnati si sono rivelati specifici amplificando esclusivamente le specie vegetali selezionate. Il successivo passaggio è stata l'ottimizzazione della concentrazione dei primer nella reazione, questa infatti può influire sulla formazione di prodotti aspecifici, quali i "primer dimer". La concentrazione dei primer e la formazione di eventuali prodotti aspecifici possono inoltre influire sull'andamento stesso dell'amplificazione.

Per questo è stato necessario individuare, per ciascuna coppia di primer, la concentrazione ottimale per le reazioni di PCR in singolo. Questo è stato fatto testando le concentrazioni di primer partendo da una concentrazione pari a 250 nM per ciascun primer secondo la tabella sottostante.

Forward Primer	Reverse primer		
	150 nM forward 150 nM reverse	150 nM forward 200 nM reverse	150 nM forward 250 nM reverse
	250 nM forward 150 nM reverse	250 nM forward 250 nM reverse	250 nM forward 300 nM reverse
	300 nM forward 150 nM reverse	300 nM forward 250 nM reverse	300 nM forward 300 nM reverse

**Tabella 19:** matrice di bilanciamento della concentrazione dei primer in PCR singola.

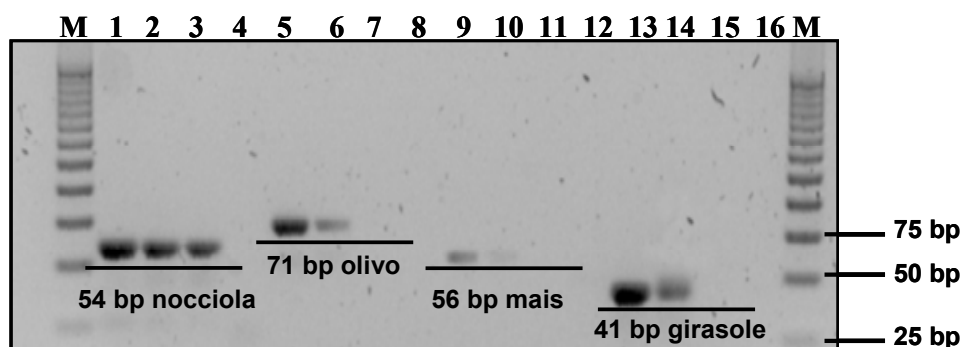
Le concentrazioni ottimali individuate sono riportate nella seguente tabella.

Codice identificativo primer	Concentrazione ottimale
J18	F-300 nM/ R-300 nM
Adh56	F-150 nM/ R-150 nM
Sun41	F-250 nM/ R-250 nM
Noc54	F-150 nM/ R-150 nM

**Tabella 20:** concentrazioni risultate ottimali per ciascuna coppia di primer per amplificazioni in PCR singola.

### Analisi di amplificabilità

Nella figura sottostante è invece possibile osservare per i quattro oli analizzati le amplificazioni con i rispettivi controlli positivi sul DNA estratto da foglie di: olivo, mais, nocciola e girasole. L'amplificazione del DNA estratto da olio di nocciola ha prodotto un amplicone di 54 bp (campioni 2 e 3), per l'olio di oliva di 71 bp (campione 6), per l'olio di mais di 56 bp (campione 10) ed infine per l'olio di girasole un amplicone di 41 bp (campione 14).



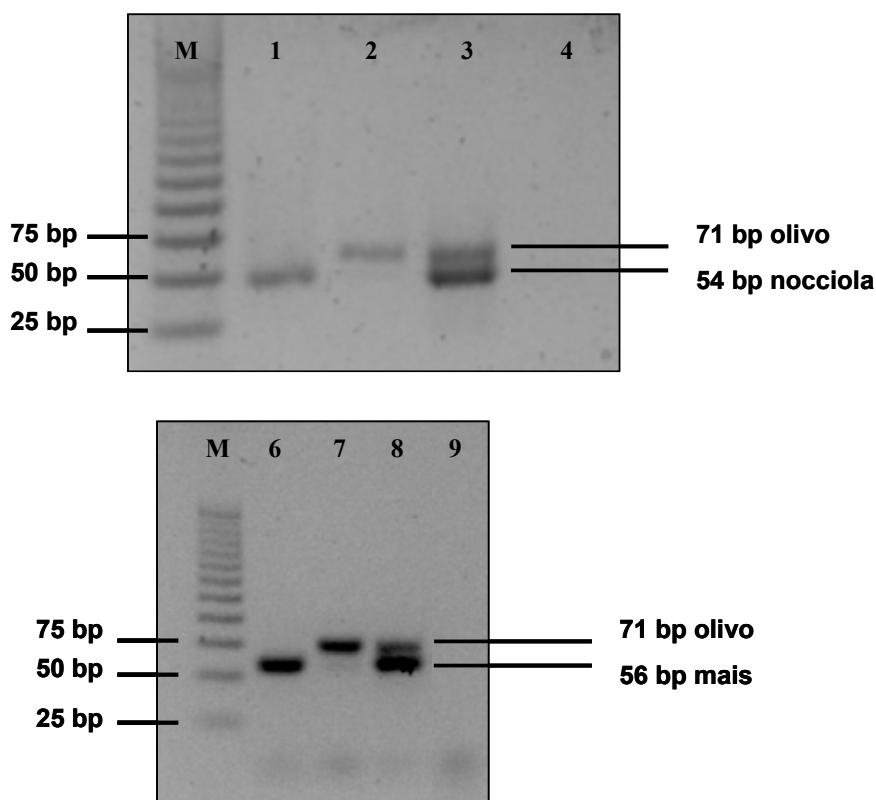
**Figura 7:** elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA estratto da: 1: controllo positivo di DNA di nocciola estratto da foglia (60 ng); 2-3: olio di nocciola estratto rispettivamente con i metodi Nucleo Spin Plat e CTAB; 4: controllo negativo di PCR; 5: controllo positivo di DNA di olivo estratto da foglia (60 ng); 6-7: olio di oliva estratto rispettivamente con i metodi Nucleo Spin Plat e CTAB; 8: controllo negativo di PCR; 9: controllo positivo di DNA di mais estratto da foglia (60 ng); 10-11: olio di semi di mais estratto rispettivamente con i metodi Nucleo Spin Plat e CTAB; 12: controllo negativo di PCR; 13: controllo positivo di DNA di girasole estratto da foglia (60 ng); 14-15: olio di girasole estratto rispettivamente con i metodi Nucleo Spin Plat e CTAB; 16: controllo negativo di PCR; M: marcatore di peso molecolare 25 bp.

Le prove di amplificabilità sono state condotte ottimizzando anche le temperature di annealing dei primer in gradienti di temperatura tra 56°C e 62°C ( $\Delta 2^\circ\text{C}$ ) e con ripetizioni dei cicli di 35-40-45-50 volte, questa scelta è stata effettuata a cause delle bassa quantità di DNA estraibile dall'olio. Come si può osservare dal gel elettroforetico, l'amplificazione sul DNA estratto dalle diverse matrici ha prodotto amplificazioni delle dimensioni attese.

## PCR duplex

I primer precedentemente ottimizzati e testati in PCR singola, sono stati utilizzati per sviluppare una PCR duplex. L'ottimizzazione delle reazioni è stata condotta su DNA estratto da foglie delle varietà vegetali esaminate.

In figura 8 sono riportati i gel elettroforetici con gli amplificati ottenuti in PCR duplex usando i primer J18-Noc54 e J18-Adh56 su DNA estratto rispettivamente da foglia di olivo e di nocciola e di olivo e di mais, amplificati separatamente e in miscela. Analoga reazione di PCR duplex è stata sviluppata su DNA estratto da foglie di olivo e di girasole con i primer Fad726 e Sun41, amplificando rispettivamente frammenti di 106 bp e 41 bp. Come si può osservare un solo amplicone viene ottenuto con il DNA di una singola specie e due ampliconi con le miscele dei DNA. Le dimensioni degli ampliconi corrispondono a quelle attese.



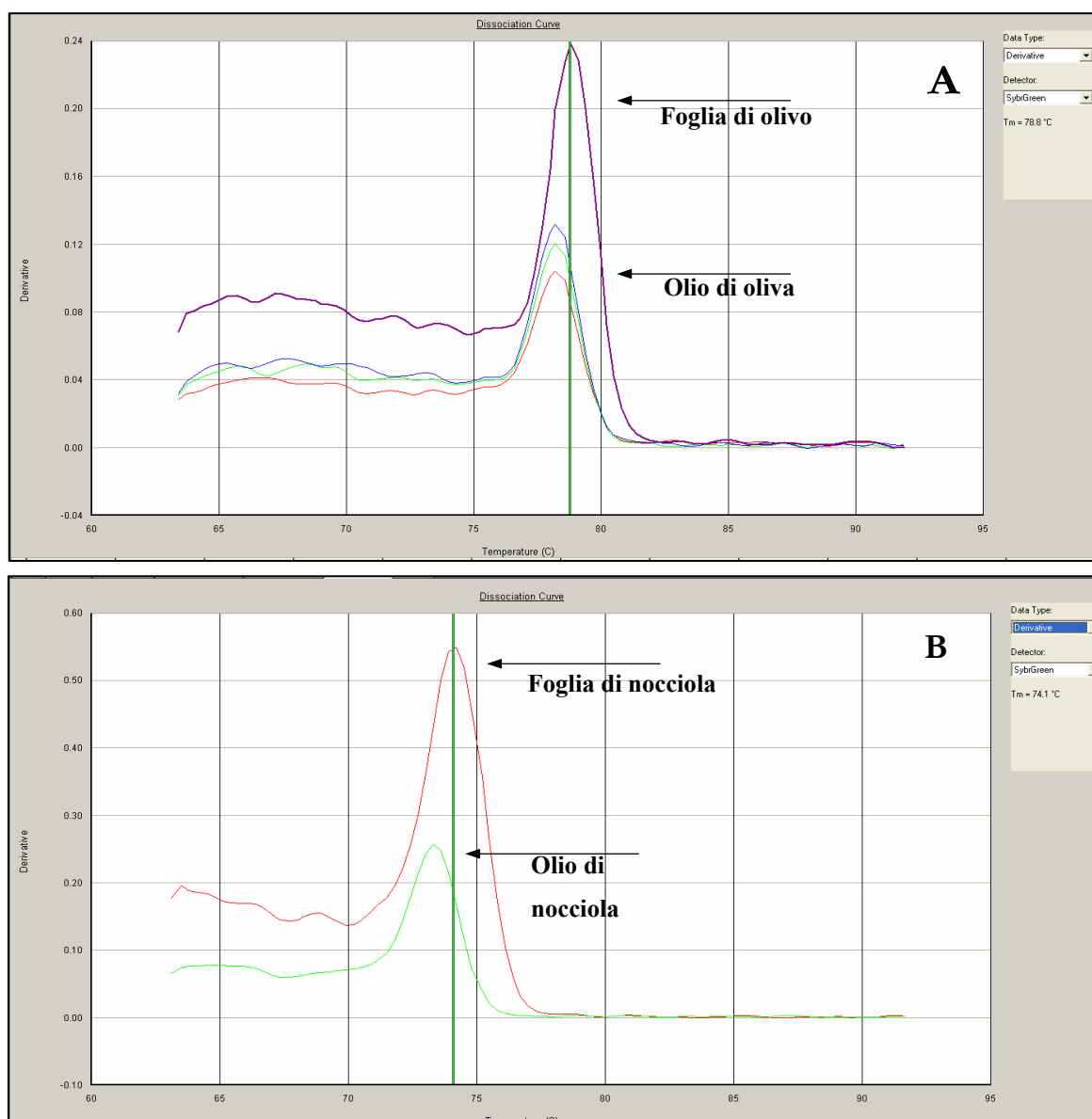
**Figura 8:** elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA estratto da: 1: DNA di nocciola estratto da foglia (30 ng); 2: DNA di olivo estratto da foglia (30 ng); 3: miscela di DNA estratto da foglia di olivo e di nocciola (60 ng); 4: controllo negativo di PCR; 6: DNA di mais estratto da foglia (30 ng); 7: DNA di olivo estratto da foglia (30 ng); 8: miscela di DNA estratto da foglia di olivo e mais (60 ng); 9: controllo negativo di PCR; M: marcatore di peso molecolare 25 bp.

## Real-Time PCR con SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup> su DNA estratto da olio di oliva e di semi

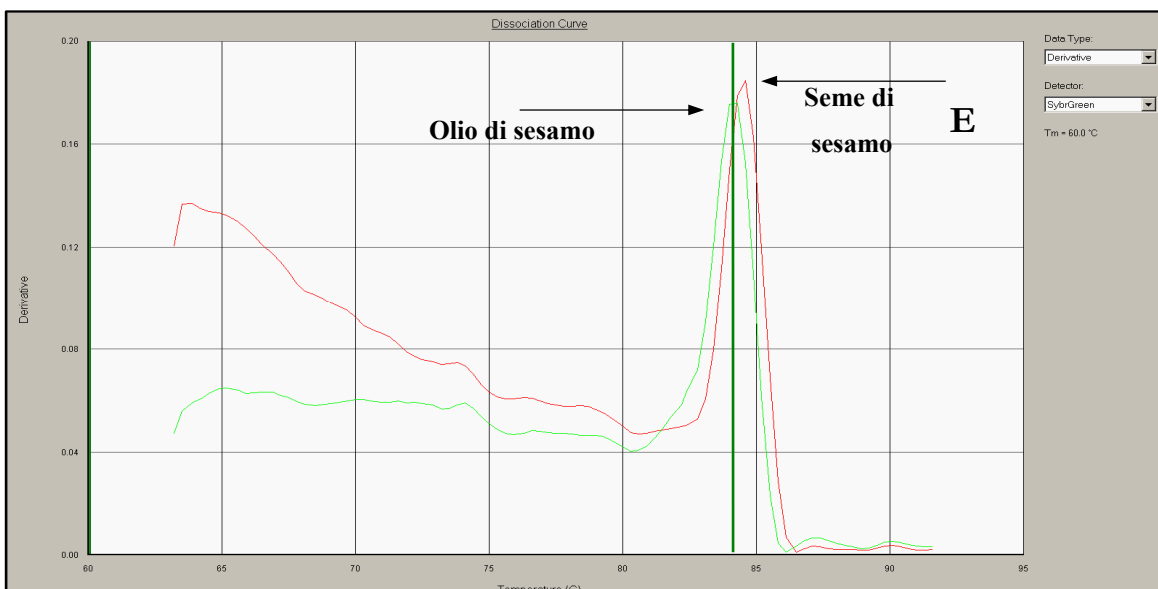
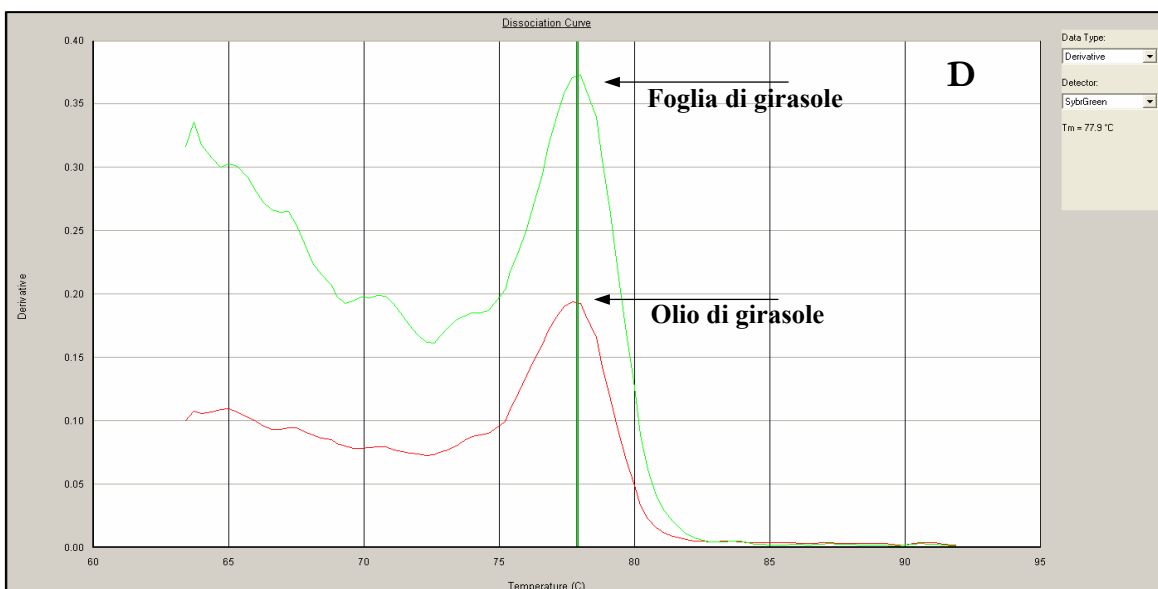
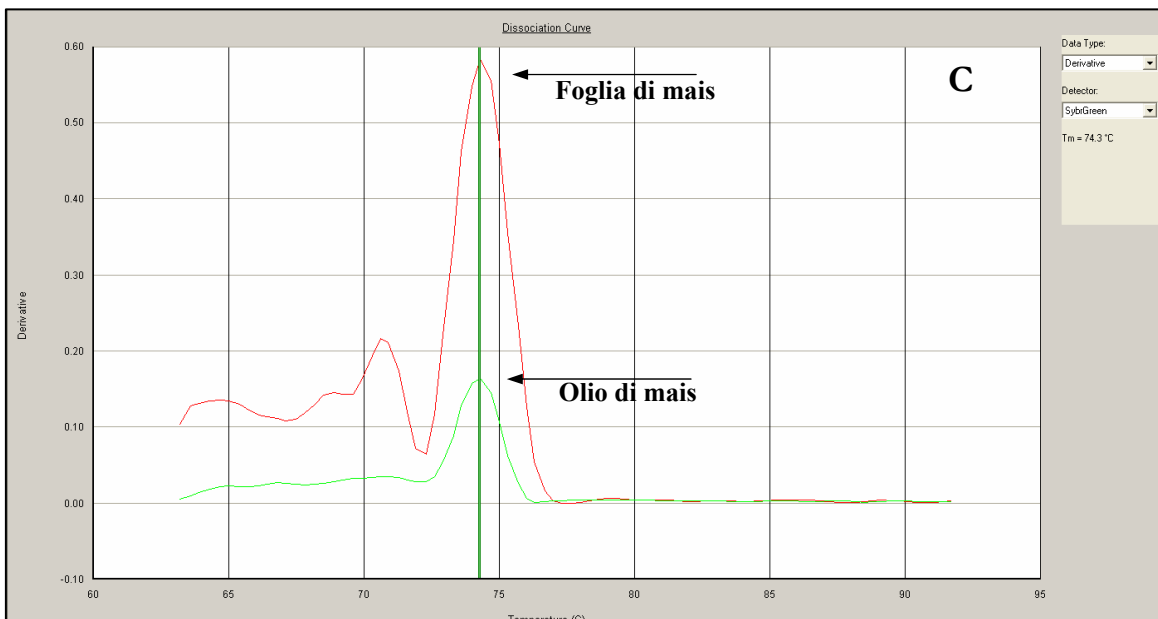
### Real-Time PCR singola

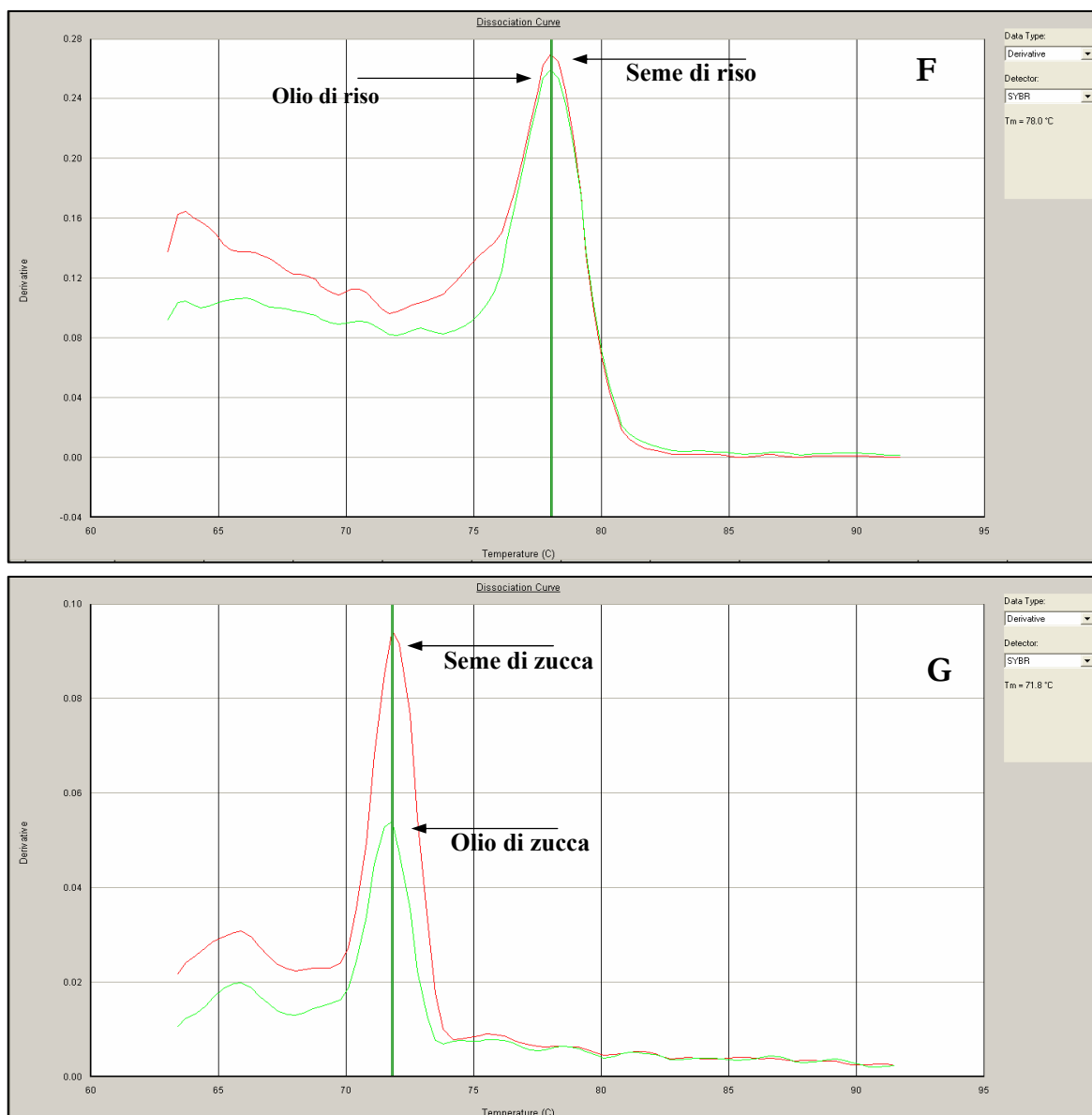
Per aumentare la sensibilità delle reazioni di PCR e per verificare, attraverso l'analisi dei profili di dissociazione la corrispondenza tra ampliconi ottenuti sul DNA estratto da foglia e quello dei rispettivi oli, sono state condotte reazioni in PCR utilizzando l'intercalante SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup> e i primer riportati in tabella 9.

Come si può osservare dalla seguente figura, i profili di dissociazione degli ampliconi ottenuti dal DNA estratto dall'olio di oliva, di semi di mais, nocciola, girasole, sesamo, zucca e riso coincidono con quelli del DNA delle rispettive foglie o semi di riferimento.









**Figura 9:** derivata della curva di dissociazione osservata per l'amplificazione di ciascun primer sul suo target specifico: (A) DNA estratto da foglia e da olio di oliva (B) DNA estratto da foglia e da olio di semi di nocciola (C) DNA estratto da foglia e da olio di semi mais (D) DNA estratto da foglia e da olio di semi girasole (E) DNA estratto da seme e da olio di semi di sesamo, (F) DNA estratto da seme e da olio di riso, (G) DNA estratto da semi e da olio di zucca.

Le temperature di dissociazione degli ampliconi ottenuti delle diverse specie, riportate nella successiva tabella sono risultate abbastanza diverse per consentire lo sviluppo di reazioni di Real-Time PCR multiplex.

La valutazione della dimensione degli ampliconi e delle relative temperature di dissociazione è un requisito basilare per poter sviluppare reazioni specifiche per l'analisi del DNA estratto da miscele di olio di oliva e di semi.

Matrice	Amplicone (bp)	T <sub>m</sub> °C
Olio di oliva	71	78.4 ± 0.4
Foglia di oliva		78.8 ± 0.4
Olio di semi di nocciola	54	72.9 ± 0.4
Foglia di nocciola		73,1 ± 0.3
Olio di semi di mais	56	71.6 ± 0.4
Foglia di mais		71.6 ± 0.4
Olio di semi di girasole	66	77.3 ± 0.2
Olio di semi di girasole		77.3 ± 0.2
Seme di sesamo	100	84.2 ± 0.3
Olio di sesamo		84.3 ± 0.3
Seme zucca	65	72.4 ± 0.4
Olio di semi zucca		71.6 ± 0.1
Seme di riso	50	77.9 ± 0.2
Olio di semi di riso		78.1 ± 0.1

**Tabella 21:** risultati delle amplificazioni ottenute con ciascuna coppia di primer su tutte le matrici. Sono riportate la dimensione, la temperatura media di dissociazione (T<sub>m</sub>) di ciascun amplicone prodotto.

### Verifica della specificità dei primer in Real-Time PCR singola

La specificità dei primer disegnati sulle sequenze di olivo, nocciola, mais, girasole, arachide e soia utilizzati nelle successive reazioni di duplex Real-Time PCR è stata verificata allestendo prove di specificità su diverse specie vegetali attraverso lo studio dei profili di dissociazione. Nella tabella seguente sono mostrati i risultati di tale analisi.

Specie vegetale	J18	Fad726	Noc54	Hmg77	Sun66	Ara	Le2
Olivo ( <i>Olea europaea</i> )	+	+	-	-	-	-	-
Mais ( <i>Zea mays</i> )	-	-	-	+	-	-	-
Arachide ( <i>Arachis hypogea</i> )	-	-	-	-	-	+	-
Sesamo ( <i>Sesamum indicum</i> )	-	-	-	-	-	-	-
Soia ( <i>Glycine max</i> )	-	-	-	-	-	-	+
Zucca ( <i>Cucurbita pepo</i> )	-	-	-	-	-	≠	-
Girasole ( <i>Helianthus annuus</i> )	-	-	-	-	-	-	-
Riso ( <i>Oryza sativa</i> )	-	-	-	-	-	-	-
Nocciola ( <i>Corylus avellana</i> )	-	-	+	-	≠	-	-
Orzo ( <i>Hordeum vulgare</i> )	-	-	-	-	≠	-	-
Grano ( <i>Triticum aestivum</i> )	-	-	-	-	≠	-	-
Noce ( <i>Juglans regia</i> )	≠	≠	-	-	≠	-	-
Anacardio ( <i>Anacardium occidentale</i> )	-	≠	-	-	-	-	-
Mandorla ( <i>Prunus dulcis</i> )	-	≠	-	-	-	-	-

**Tabella 22:** prove di specificità dei primer utilizzati in Real-Time PCR su diverse specie vegetali (-: nessuna amplificazione; +: amplificazione positiva; ≠: amplificato con T<sub>m</sub> diversa da quella attesa).

I primer non mostrano amplificazioni incrociate per quanto riguarda le specie analizzate, è possibile riscontrare amplificazioni non specifiche per alcuni primer, tuttavia le temperature di

dissociazione relative ai prodotti ottenuti differiscono dalle temperature di dissociazione caratteristiche per le specie di interesse.

### Verifica della efficienza e della sensibilità delle reazioni di amplificazione in Real-Time PCR singola

Per verificare la sensibilità dell'amplificazione e quindi del metodo di rilevazione è stata effettuata una prova su diluizioni seriali di DNA estratto da foglie di olivo, nocciola, mais e girasole utilizzando i primer precedentemente sviluppati. Lo studio della reazione di amplificazione a basse quantitativi di template, condizione tipica dei campioni di DNA estratto da olio, permette di valutare l'efficienza stessa della reazione di amplificazione.

La retta che descrive l'andamento della PCR su diluizioni seriali è descritta dalla seguente equazione:  $y = -mx + q$  dove  $y$  è il numero di cicli letti al valore soglia di fluorescenza,  $m$  la pendenza della retta,  $x$  il log [quantità di DNA] e  $q$  il valore dell'intercetta sull'asse delle ordinate. Il valore di  $y$  è ricavato sperimentalmente, mentre la pendenza  $m$  è correlata all'efficienza della reazione, calcolata secondo la formula:  $E = 10^{-1/m} - 1$ .

Nel caso ideale in cui l'efficienza fosse del 100% la pendenza risulterebbe pari a 3.3, che è il valore a cui ci si deve avvicinare per avere la miglior regressione possibile. L'altro valore da tenere in considerazione per avere una retta di regressione attendibile è il valore del coefficiente di correlazione  $R^2$  che deve risultare compreso tra 0.98 e 1.

Le rette standard sono state realizzate con diluizioni seriali (fattore di diluizione 1:2) di DNA genomico, partendo da una quantità iniziale di 100 ng fino ad una finale di 6.25 ng.

La Real-Time PCR è stata quindi in grado di rivelare fino a 6.25 ng di DNA, con valori delle rette standard accettabili. Infatti come si vede dalla tabella seguente, i valori del coefficiente di correlazione  $R^2$  risultano prossimi a 0.99, mentre la pendenza risulta compresa tra -3.39 per Hmg77 e -3.59 per Fad726, valori che si avvicinano a quelli ottimali. Anche l'efficienza percentuale, compresa tra 89.91% e 97.04% è risultata buona.

Codice primer	Specificità	Equazione Retta standard	$R^2$	Efficienza percentuale
Noc54	Nocciola	$y = -3,4086x + 29,262$	0,9975	96,51%
Sun66	Girasole	$y = -3,4928x + 41,642$	0,9955	93,33%
J18	Olivo	$y = -3,434x + 34,275$	0,9923	95,53%
Fad726	Olivo	$y = -3,590x + 37,338$	0,9938	89,91%
Hmg77	Mais	$y = -3,3949x + 28,664$	0,9938	97,04%

**Tabella 23:** risultati delle prove di efficienza dei primer in Real-Time PCR singola.

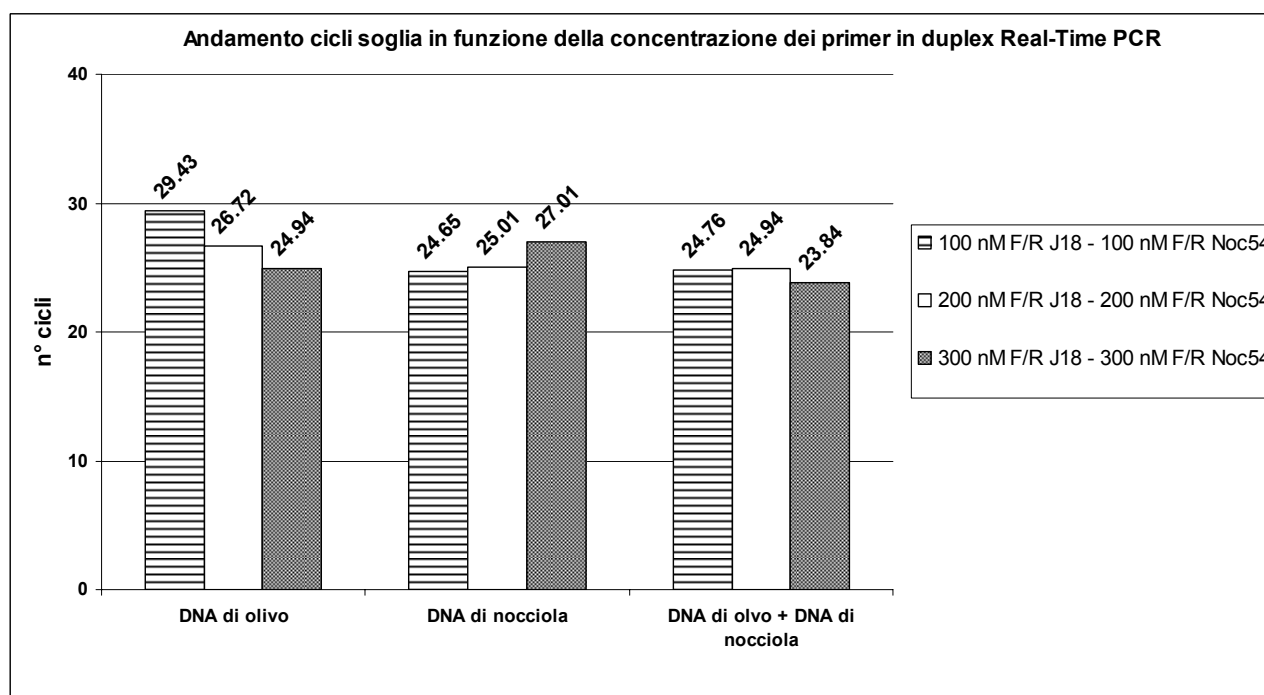
## Sviluppo e ottimizzazione della reazione di duplex Real-Time PCR

Lo sviluppo di un saggio di multiplex PCR comporta una delicata fase di ottimizzazione delle concentrazioni dei primer.

Le coppie di primer utilizzate non devono essere in competizione per la formazione dell'amplicone ma la loro azione deve svolgersi in maniera bilanciata ed i cicli soglia a cui compaiono gli ampliconi devono essere comparabili. Le coppie di primer precedentemente utilizzate per le reazioni in singolo sono state ottimizzate per lo sviluppo di una reazione duplex secondo la tabella sottostante. È stato valutato l'andamento dei cicli soglia sulle amplificazioni condotte su DNA estratto dalle foglie delle varietà esaminate.

Coppia primer 2 \ Coppia primer 1	100 nM F/R	200 nM F/R	300 nM F/R
100 nM F/R	100 nM F/R-100 nM F/R	100 nM F/R-200 nM F/R	100 nM F/R-300 nM F/R
200 nM F/R	200 nM F/R-100 nM F/R	200 nM F/R-200 nM F/R	200 nM F/R-300 nM F/R
300 nM F/R	300 nM F/R-100 nM F/R	300 nM F/R-200 nM F/R	300 nM F/R-300 nM F/R

**Tabella 24:** matrice di bilanciamento della concentrazione dei primer in duplex Real-Time PCR.



**Figura 10:** rappresentazione grafica della correlazione tra cicli soglia in Real-Time PCR e concentrazione dei primer a parità di DNA temprato in reazione.

In figura 10 è possibile osservare come la concentrazione ottimale dei primer per la coppia J18 - Noc54 sia 200 nM, a tale concentrazione sia l'amplificazione condotta sui singoli DNA che sulla

miscela (DNA di olivo e DNA di nocciola) presenta cicli soglia prossimi tra loro. Questi valori indicano che la coppia di primer usati è in un buon equilibrio competitivo verso i rispettivi templati.

Le stesse reazioni di ottimizzazione sono state realizzate per valutare le concentrazioni dei primer delle altre due duplex che sono state sviluppate. Nella tabella seguente vengono riportate le concentrazioni ottimali utilizzate nelle reazioni di duplex PCR.

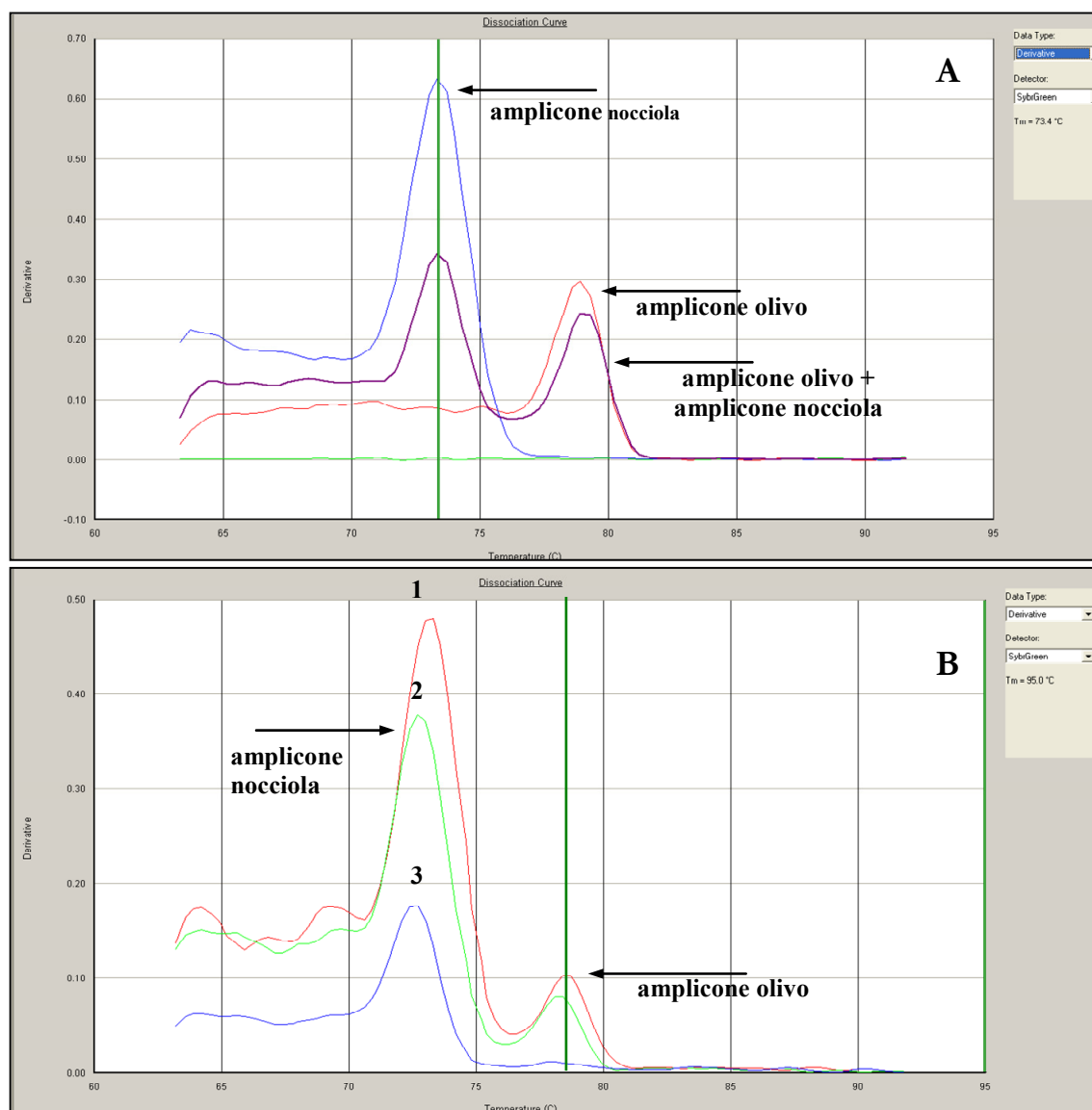
<b>Codice identificativo primer</b>	<b>Specificità</b>	<b>Concentrazione ottimale in duplex Real-Time PCR</b>
J18	Olivo	F-200 nM/ R-200 nM
Noc54	Nocciola	F-200 nM/ R-200 nM
J18	Olivo	F-200 nM/ R-200 nM
Hmg77	Mais	F-100 nM/ R-100 nM
Fad726	Olivo	F-200 nM/ R-200 nM
Sun66	Girasole	F-200 nM/ R-200 nM

**Tabella 25:** concentrazioni ottimali per ciascuna coppia di primer per le amplificazioni in duplex Real-Time PCR.

## Real-Time PCR duplex

Utilizzando le coppie di primer riportate in tabella 25 sono state allestite tre reazioni di Real-Time PCR duplex specifiche per l'identificazione di olivo, nocciola, mais e girasole.

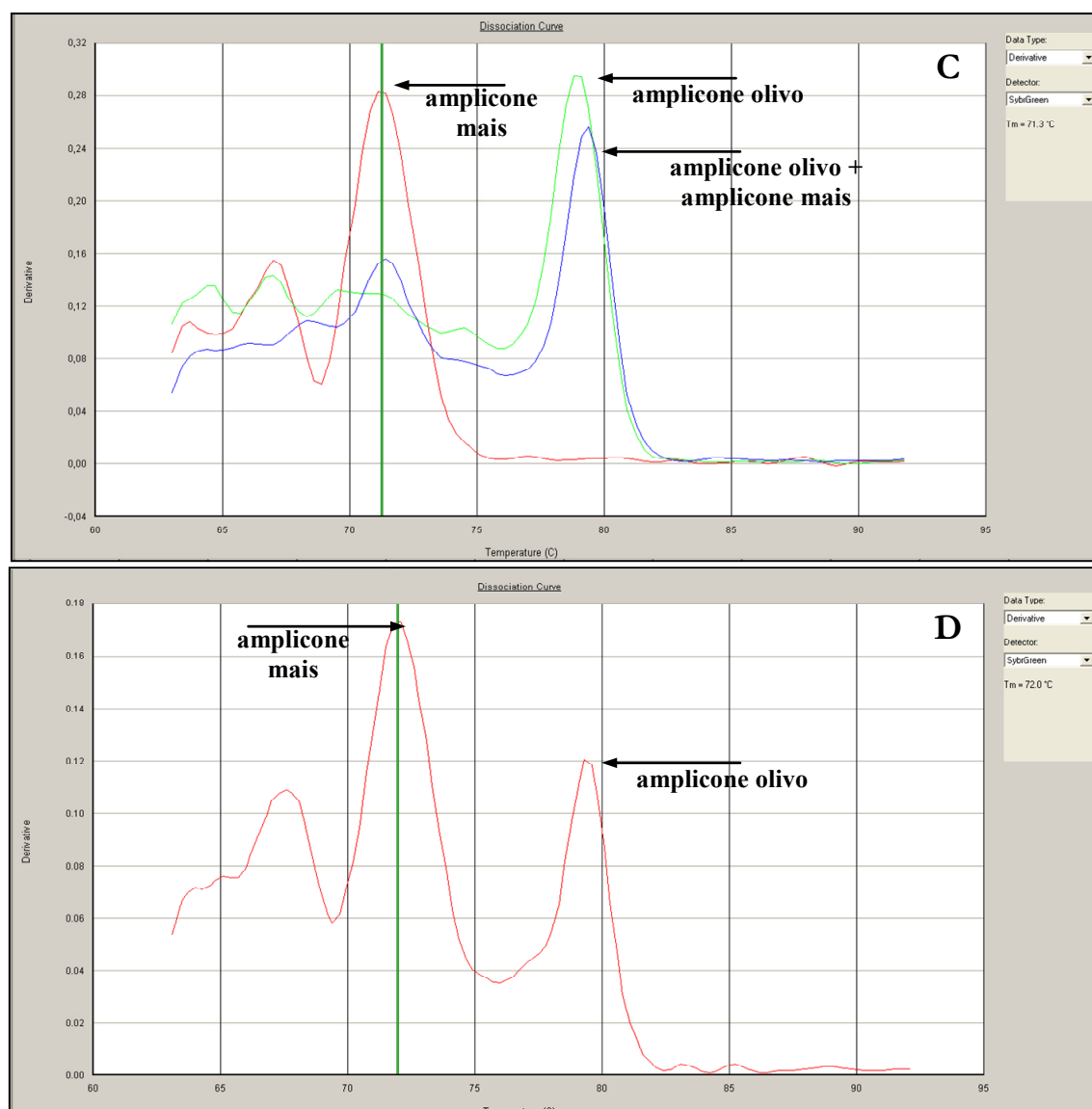
Le coppie di primer J18 e Noc54 sono state utilizzate per allestire una reazione di amplificazione duplex in Real-Time PCR con successiva analisi dei profili di dissociazione degli ampliconi al fine di valutare il corretto riconoscimento della sequenza bersaglio su DNA di olivo e nocciola.



**Figura 11:** derivate delle curve di dissociazione relative all'amplificazione in duplex Real-Time PCR di: (A) DNA estratto da foglia di nocciola e olivo, amplificati singolarmente e miscelati; (B) DNA estratto da miscele campione di olio di oliva e di nocciola, nei seguenti rapporti percentuali (1) 70%-30%, (2) 50%-50%, (3) 30%-70%.

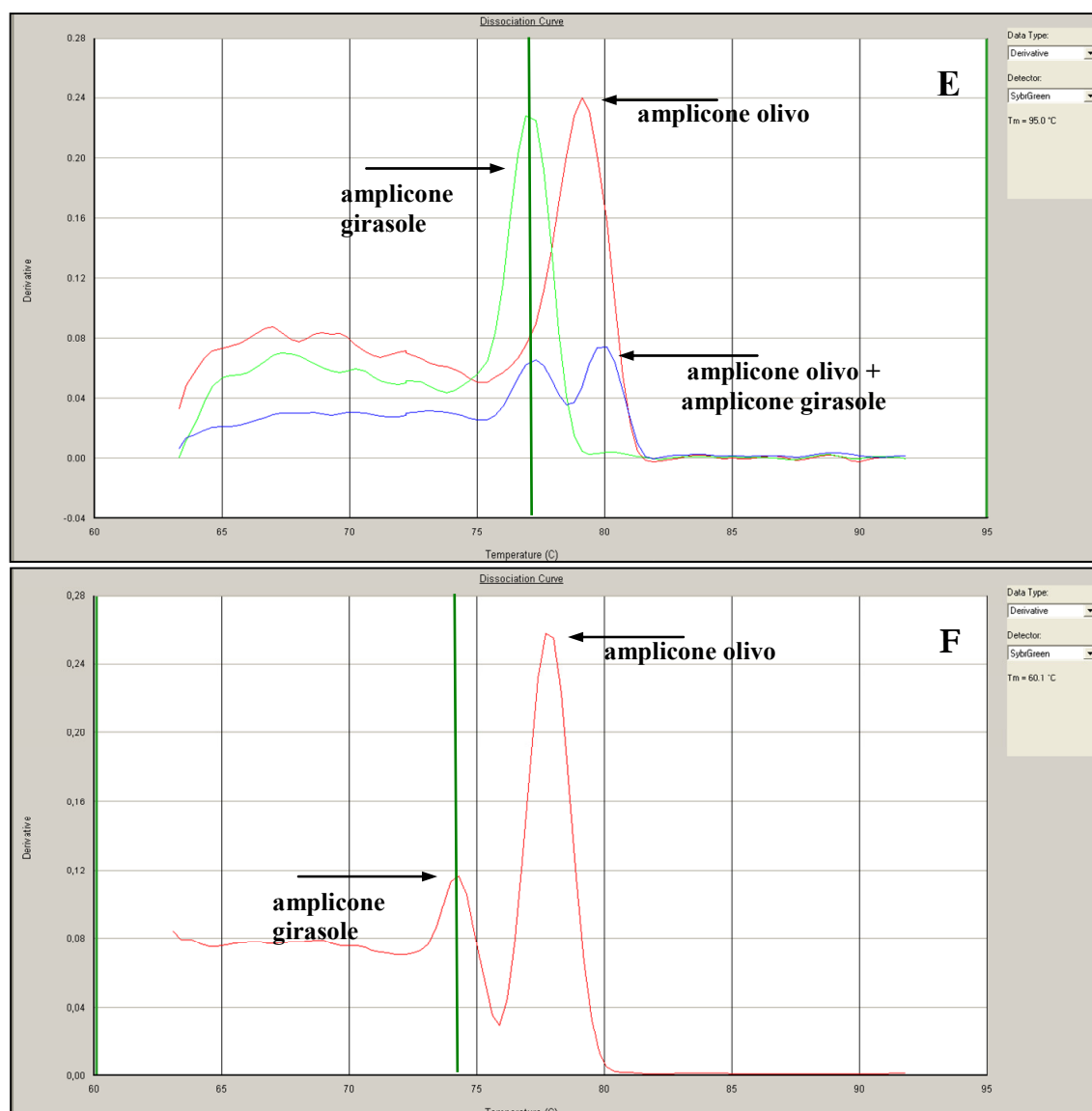
Nella figura 11-A è possibile osservare i profili di dissociazione degli ampliconi di nocciola e olivo in una amplificazione duplex effettuata sia sui singoli DNA che su una miscela dei due. Nella figura 11-B la stessa reazione è riportata l'amplificazione del DNA estratto da miscele dei due oli (oliva e nocciola) in diverse percentuali (Tabella 11).

In maniera analoga le coppie di primer J18-Hmg77 e Fad726-Sun66 sono state utilizzate rispettivamente per l'identificazione di DNA di olivo-mais e olivo-girasole. Le tre reazioni di duplex Real-Time PCR sono state ottimizzate sia sul DNA estratto dalle foglie sia singolarmente che miscelato, lo stesso procedimento è stato usato per analizzare le reazioni di amplificazione sul DNA estratto da miscele di olio di oliva e di semi (Figura 12C-12D e Figura 13E-13F).



**Figura 12:** derivate delle curve di dissociazione relative all'amplificazione in duplex Real-Time PCR di: (C) DNA estratto da foglia di mais e di olivo, amplificati singolarmente e miscelati; (D) DNA estratto da miscele campione di olio di oliva e di semi di mais in rapporto 70%-30%.





**Figura 13:** derivate delle curve di dissociazione relative all'amplificazione in duplex Real-Time PCR di: (E) DNA estratto da foglia di olivo e girasole, amplificati singolarmente e miscelati; (F) DNA estratto da miscele campione di olio di oliva e di semi di girasole in rapporto 70%-30%.

I profili di dissociazione delle amplificazioni sul DNA estratto dalle foglie e quello estratto dai rispettivi oli in miscela, presentano per le tre duplex sviluppate temperature di dissociazione corrispondenti.

Nella tabella seguente sono riportate le temperature di dissociazione degli ampliconi individuate sulle diverse matrici analizzate, amplificando sia DNA singolo che presente in miscele, ottenuto sia da singole matrici che da miscele. Questo tipo di analisi ha permesso di verificare eventuali variazioni nelle temperature di dissociazione degli ampliconi in funzione della diverse matrici su cui è stata realizzata l'amplificazione.

<b>1 Duplex nocciola-olivo</b>					
<b>T<sub>m</sub> media amplicone nocciola (°C) in una reazione duplex</b>					
<b>Tipo di DNA</b>	DNA da foglia di nocciola	Miscela di DNA da foglia di nocciola e olivo	DNA da olio di nocciola	Miscela di DNA da olio di nocciola e oliva pre-estratto	Miscela di DNA da olio di nocciola e oliva
	72.9 ± 0.6	73.1 ± 0.5	73.1 ± 0.5	73.3 ± 0.4	73.3 ± 0.4
<b>T<sub>m</sub> media amplicone olivo (°C) in una reazione duplex</b>					
<b>Tipo di DNA</b>	DNA da foglia di olivo	Miscela di DNA da foglia di nocciola e olivo	DNA da olio di oliva	Miscela di DNA da olio di nocciola e oliva pre-estratto	Miscela di DNA da olio di nocciola e oliva
	78.4 ± 0.6	78.4 ± 0.4	78.8 ± 0.4	78.8 ± 0.4	78.8 ± 0.4
<b>2 Duplex mais-olivo</b>					
<b>T<sub>m</sub> media amplicone mais (°C) in una reazione duplex</b>					
<b>Tipo di DNA</b>	DNA da foglia di mais	Miscela di DNA da foglia di mais e olivo	DNA da olio di mais	Miscela di DNA da olio di mais e oliva pre-estratto	Miscela di DNA da olio di mais e oliva
	71.6 ± 0.4	72.3 ± 0.2	72.3 ± 0.2	72.4 ± 0.3	72.4 ± 0.3
<b>T<sub>m</sub> media amplicone olivo (°C) in una reazione duplex</b>					
<b>Tipo di DNA</b>	DNA da foglia di olivo	Miscela di DNA da foglia di mais e olivo	DNA da olio di oliva	Miscela di DNA da olio di mais e oliva pre-estratto	Miscela di DNA da olio di mais e oliva
	78.8 ± 0.2	79.3 ± 0.2	78.8 ± 0.3	79.3 ± 0.2	79.3 ± 0.2
<b>3 Duplex girasole-olivo</b>					
<b>T<sub>m</sub> media amplicone girasole (°C) in una reazione duplex</b>					
<b>Tipo di DNA</b>	DNA da foglia di girasole	Miscela di DNA da foglia di girasole e olivo	DNA da olio di girasole	Miscela di DNA da olio di girasole e oliva pre-estratto	Miscela di DNA da olio di girasole e oliva
	77.3 ± 0.2	77.4 ± 0.4	72.3 ± 0.2	76.9 ± 0.1	77.1 ± 0.2
<b>T<sub>m</sub> media amplicone olivo (°C) in una reazione duplex</b>					
<b>Tipo di DNA</b>	DNA da foglia di olivo	Miscela di DNA da foglia di girasole e olivo	DNA da olio di oliva	Miscela di DNA da olio di girasole e oliva pre-estratto	Miscela di DNA da olio di girasole e oliva
	79.2 ± 0.1	79.3 ± 0.5	78.8 ± 0.3	78.8 ± 0.1	79.8 ± 0.2

**Tabella 26:** analisi delle temperature di dissociazione degli ampliconi J18 (olivo) e Noc54 (nocciola) (Tab. 26-1); J18 (olivo) e Hmg77 (mais) (Tab. 26-2) e Fad726 (olivo) e Sun66 (girasole) (Tab 26-3) nelle reazioni duplex Real-Time PCR sul DNA estratto da diverse matrici.

In base alle temperature di dissociazione identificate è stata realizzata un'analisi qualitativa su olio di oliva preparato aggiungendo diversi quantitativi dei tre differenti oli di semi.

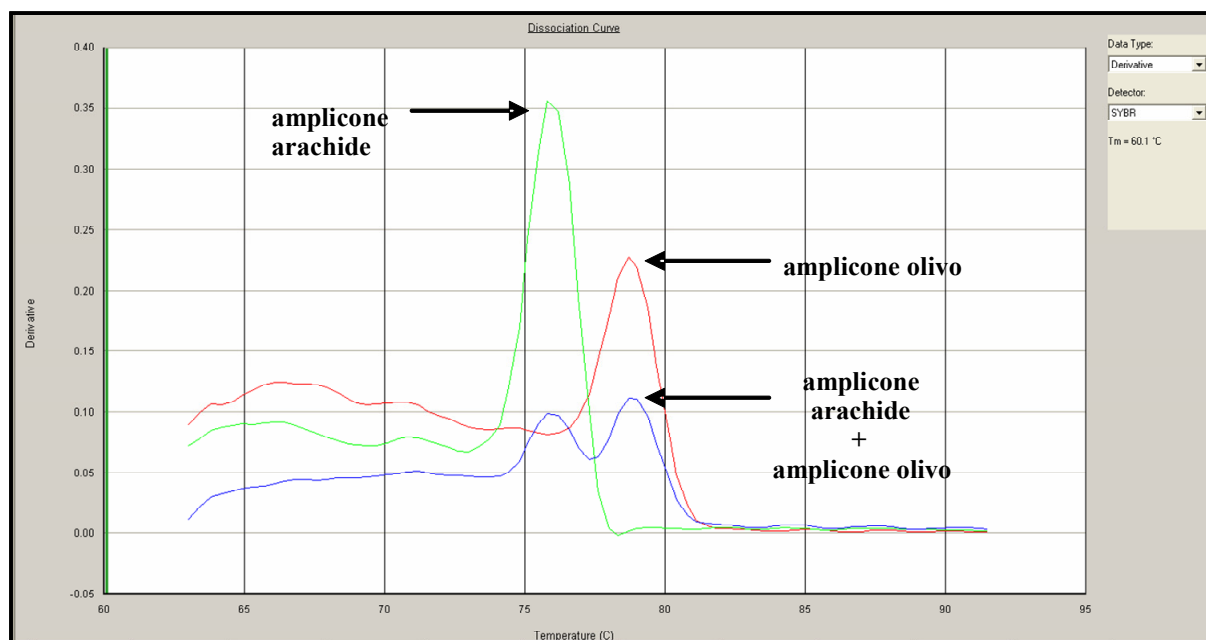
Nella tabella 27 è riportato il risultato di tale analisi in termini di corretta identificazione dell'amplicone atteso per le singole specie rilevate nelle miscele di olio a diverse percentuali.

Miscele di olio	Ampliconi individuati			
	Olivo	Nocciola	Mais	Girasole
70% olio di oliva - 30% olio di nocciola	+	+		
50% olio di oliva - 50% olio di nocciola	+	+		
30% olio di oliva - 70% olio di nocciola	-	+		
70% olio di oliva - 30% olio di mais	+		-	
50% olio di oliva - 50% olio di mais	+		+	
30% olio di oliva - 70% olio di mais	+		+	
70% olio di oliva - 30% olio di girasole	+			-
50% olio di oliva - 50% olio di girasole	+			+
30% olio di oliva - 70% olio di girasole	+			+

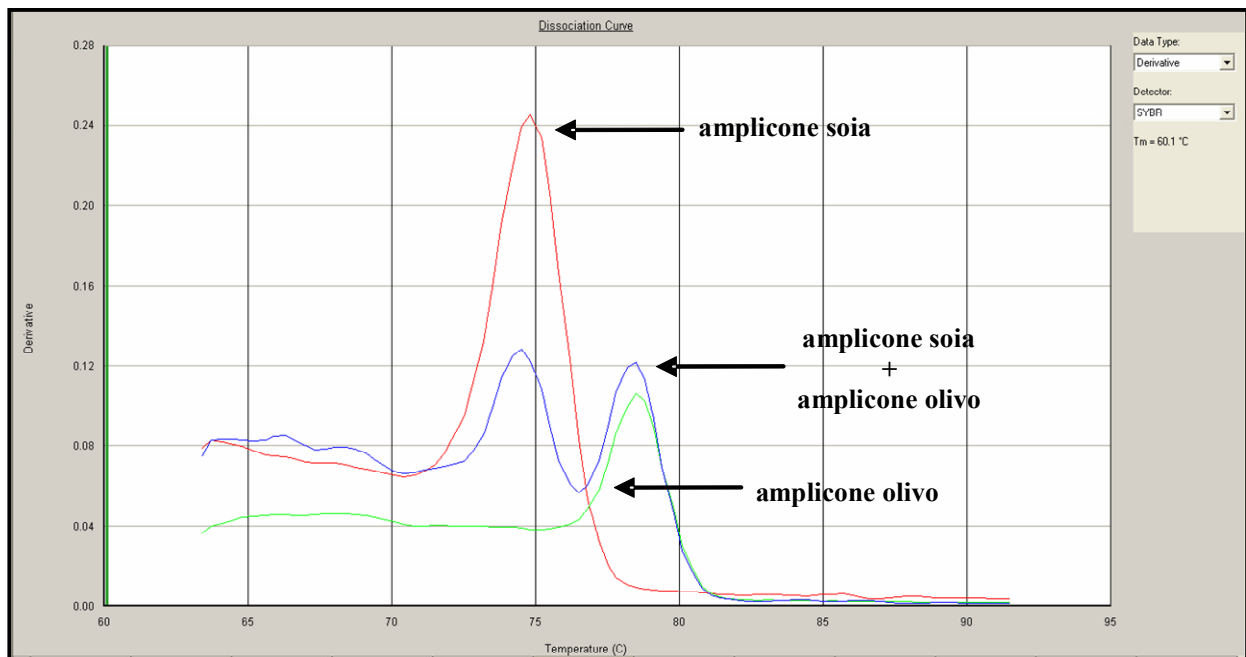
**Tabella 27:** correlazione tra percentuali di olio di oliva, di nocciola, di mais e di girasole, miscelate e poi estratte e l'identificazione qualitativa degli ampliconi in Real-Time duplex PCR (+ amplicone individuato, - amplicone non individuato).

Sono state inoltre sviluppate altre due reazioni di PCR duplex, per l'identificazione di DNA di olivo miscelato con DNA di soia e arachide.

Come si può osservare dalle figure 14 e 15, sia nella duplex olivo-arachide che in quella olivo-soia, i profili di dissociazione per gli ampliconi ottenuti amplificando il DNA miscelato di entrambe le specie corrispondono a quelli individuati nelle reazioni duplex con solo il DNA di interesse.



**Figura 14:** derivate delle curve di dissociazione relative all'amplificazione in duplex Real-Time PCR di DNA estratto da seme di arachide e foglia di olivo, amplificati singolarmente e miscelati.



**Figura 15:** derivate delle curve di dissociazione relative all'amplificazione in duplex Real-Time PCR DNA estratto da seme di arachide e foglia di olivo, amplificati singolarmente e miscelati.

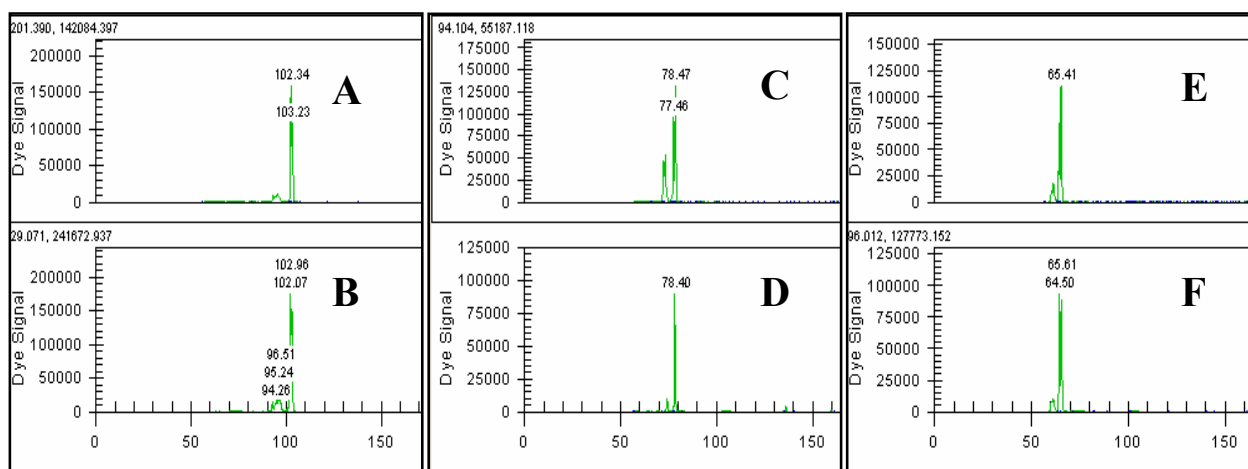
In entrambi i casi dopo aver verificato la fattibilità dell'analisi, il passaggio successivo sarà l'ottimizzazione della reazione su DNA estratto direttamente da olio in modo analogo ai precedenti esperimenti.

## PCR con primer marcati ed elettroforesi capillare (PCR-CGE)

I primer utilizzati in Real-Time PCR sono stati utilizzati per allestire una reazione di PCR abbinata all'identificazione degli ampliconi in elettroforesi capillare mediante fluorescenza.

Per ciascuna coppia di primer (Tabella 8) sono stati utilizzati primer forward marcati con una molecola fluorescente: il fluoroforo scelto è stato IRD700 (di colore verde), in figura 16 è possibile osservare i profili elettroforetici ottenuti.

I campioni A, C, E rappresentano rispettivamente gli ampliconi ottenuti amplificando il DNA estratto da foglie di olivo, mais e girasole, mentre i profili B, D, F dai rispettivi oli.



**Figura 16:** profili di elettroforesi capillare degli ampliconi marcati con molecole fluorescenti, analizzati al sequenziatore automatico. A-B amplicone ottenuto dalla amplificazione su DNA estratto rispettivamente da foglia e olio di olivo, C-D amplicone ottenuto dalla amplificazione su DNA estratto rispettivamente da foglia e olio di mais, E-F amplicone ottenuto dalla amplificazione su DNA estratto rispettivamente da foglia e olio di girasole. L'intensità del segnale è espressa in Relative Fluorescence Units (RFU).

Come si può osservare gli elettroferogrammi mostrano ampliconi delle medesime dimensioni sia nella amplificazione condotte sul DNA estratto dalle foglie di riferimento sia su quello isolato dai rispettivi oli.

Lo sviluppo di un approccio “multiplex” permetterà di aumentare il numero di ampliconi identificabili, permettendo di realizzare un'analisi più rapida e sensibile, attraverso la piattaforma analitica della elettroforesi capillare.

## Analisi di riconoscimento varietale con marcatori molecolari microsatelliti

L'analisi attraverso marcatori molecolari microsatelliti è stata condotta su ventuno campioni di olio di oliva monovarietale con nove marcatori nucleari e due cloroplastici.

L'obiettivo del lavoro è stato di valutare l'applicabilità di questo sistema analitico, valutando i diversi parametri che lo caratterizzano, dalla estrazione del DNA alla determinazione varietale delle cultivar di origine dell'olio.

### Microsatelliti nucleari

I marcatori nucleari (così come quelli cloroplastici) sono stati scelti tra quelli riportati in letteratura. Inizialmente è stata condotta la genotipizzazione delle varietà di olivo da cui erano stati prodotti gli oli analizzati. Il DNA estratto dalle cultivar di olivo è stato analizzato allestendo tre repliche di PCR. Allo stesso modo per ogni olio sono state eseguite tre estrazioni di DNA indipendenti e ognuna è stata analizzata attraverso tre repliche di PCR, per un totale di nove reazioni per ogni locus SSR analizzato.

Nelle tabelle seguenti vengono riportate le dimensioni degli alleli per i vari loci microsatelliti identificati all'interno della popolazione di cultivar di olivo analizzate.

Cultivar	DCA5		DCA8		DCA17		DCA18		EMO30	
Frantoio	198	205	142	142	116	140	174	176	185	192
Leccino	198	205	136	138	108	118	174	176	192	198
Tonda Iblea	198	205	136	138	111	111	172	180	185	192
Coratina	198	205	136	138	114	116	177	184	192	198
Moresca	198	205	136	138	112	114	172	180	188	190
Nocellara del Bellice	198	205	136	138	114	140	174	176	190	192
Taggiasca	198	205	129	152	116	140	174	176	192	194
Biancolilla	198	205	136	138	112	114	174	176	190	192
Nocellara Etnea	198	205	136	138	112	114	176	182	186	190
Moraiolo	198	205	136	138	111	111	177	184	185	192
Ogliarola	198	215	136	138	107	125	157	186	188	196
Itrana	198	205	136	138	108	118	172	180	190	192
Ogliarola Messinese	198	205	132	138	108	118	168	174	188	196
Giaraffa	198	205	129	152	112	114	177	184	190	192
Rosciola	198	205	129	152	108	118	170	184	190	192
Rappagliana	198	205	129	152	108	118	170	184	188	190

**Tabella 28:** dimensione degli alleli per i loci microsatelliti analizzati nelle cultivar di olivo.

Cultivar	EMO90		GAPU71B		GAPU89		UDO099-009		CCMP5	CCMP10
Frantoio	185	191	124	143	160	104	102	117	104	102
Leccino	185	191	124	144	162	104	102	100	104	102
Tonda Iblea	183	185	122	126	162	104	102	100	104	102
Coratina	185	191	124	144	162	104	102	100	104	102
Moresca	183	185	122	144	163	104	102	110	104	102
Nocellara del Bellice	183	185	144	144	162	104	102	100	104	102
Taggiasca	188	194	124	144	162	104	102	117	104	102
Biancolilla	183	185	122	126	163	104	102	100	104	102
Nocellara Etna	185	191	126	143	162	104	102	118	104	102
Moraiolo	185	191	124	144	162	104	102	100	104	102
Ogliarola	185	185	124	144	162	178	86	100	104	102
Itrana	187	187	126	144	162	203	87	99	104	102
Ogliarola Messinese	183	185	122	126	195	195	86	100	104	102
Giaraffa	185	185	122	144	177	177	86	100	104	102
Rosciola	183	192	124	130	162	162	105	118	104	102
Rappagliana	185	185	122	130	161	195	87	100	104	102

**Tabella 28A:** dimensione degli alleli per i loci microsatelliti analizzati nelle cultivar di olivo.

La genotipizzazione delle cultivar di olivo di riferimento, con cui sono stati prodotti gli oli, è fondamentale per avere dei riferimenti stabili per le analisi di “fingerprintig” molecolare. La genotipizzazione delle cultivar e dei rispettivi oli è stata condotta sul medesimo sequenziatore per avere conformità in termini di attribuzione delle dimensioni degli alleli tra campioni di DNA estratto da olio e dalla rispettiva cultivar di olivo.

Ogni marcatore applicato all’olio di oliva è quindi stato classificato in base a diversi parametri: *ii*) amplificabilità in PCR, *ii*) amplificabilità aspecifica, *iii*) assenza di amplificazione, *iv*) corrispondenza allelica totale e parziale con la cultivar di riferimento.

L’amplificabilità è espressa come la percentuale di repliche positive in cui l’amplicone è individuato all’interno dell’intervallo di dimensioni attese per ciascun microsatellite, l’amplificabilità aspecifica è riferita ad amplificazioni il cui l’elettroferogramma risulta di difficile interpretazione e gli alleli hanno dimensioni non concordanti con l’intervallo atteso.

La corrispondenza totale si ottiene quando entrambi gli alleli identificati nella foglia della cultivar di riferimento vengono ritrovati nell’olio, la corrispondenza parziale si ha invece quando viene identificato un solo allele. Nella tabella seguente i marcatori microsatelliti sono stati classificati in base all’efficienza di amplificazione: GAPU89 è il marcatore con la percentuale più alta di amplificazioni positive (49.32%), seguito dai loci DCA5, EMO30, GAPU71B, UDO099-09 e EMO90 con una percentuale compresa tra il 40.74% e il 30.98%; DCA18, DCA17, DCA8 sono stati i marcatori con una percentuale di amplificabilità al di sotto del 20%.

SSR	Amplificabilità	Amplificabilità aspecifica	Assenza di amplificazione
GAPU89	49.32%	21.09%	29.59%
DCA5	40.74%	37.04%	22.22%
EMO30	37.04%	50.79%	12.17%
GAPU71B	36.89%	33.84%	29.27%
UDO099-09	31.79%	12.14%	56.07%
EMO90	30.98%	37.50%	31.52%
DCA18	14.81%	26.54%	58.64%
DCA17	11.90%	28.04%	60.05%
DCA8	5.26%	61.40%	33.33%

**Tabella 29:** classificazione dei marcatori microsatelliti in base all'amplificabilità, specifica e aspecifica e alla assenza di amplificazione.

Per confermare la corrispondenza tra i prodotti di PCR ottenuti amplificando il DNA estratto dall'olio di oliva e quelli delle rispettive cultivar di riferimento diversi alleli del microsatellite EMO30 sono stati clonati e sequenziati. Il risultato positivo ha permesso di stabilire una perfetta corrispondenza in termini di sequenza tra il DNA estratto dall'olio e quello della rispettiva cultivar di olivo. L'analisi è stata svolta sui frammenti amplificati sul DNA estratto da diversi campioni di olio di oliva.

I valori di corrispondenza totale e parziale con la cultivar di olivo di riferimento sono riportati nella tabella 30. I marcatori testati mostrano un percentuale di corrispondenza totale che oscilla tra il 6.12% e il 18.52%. La corrispondenza parziale era invece compresa tra il 5.26% e il 43.20%. DCA5 and EMO30 avevano una percentuale di corrispondenza totale rispettivamente pari a 18.52% e 10.58%, seguiti da UDO099-09, GAPU71B, DCA17, DCA18 e GAPU89; DCA8 ha mostrato i valori più bassi sia di corrispondenza totale che parziale.

La riproducibilità è stata calcolata come la percentuale di profili identici nelle repliche di PCR di ciascun olio in cui gli ampliconi risultavano avere le dimensioni attese, successivamente è stata quindi calcolata come la media per ogni singolo campione e poi mediata su tutti i campioni, secondo la seguente formula:

$$\sum [(n^\circ \text{ profili identici}/n^\circ \text{ repliche di PCR})/n^\circ \text{ di oli analizzati}] \times 100.$$

Da quest'analisi sono stati esclusi i microsatelliti DCA8 e DCA18, in quanto presentavano un alto livello di amplificazione aspecifica che rendeva difficile l'interpretazione dei profili elettroforetici. Come evidenziato nella tabella 30 il microsatellite DCA5 ha dato il valore di riproducibilità più alta  $71.43\% \pm 21.82\%$ , mentre UDO099-09 il più basso pari a  $23.02\% \pm 16.54\%$ . Gli altri microsatelliti presentano valori di riproducibilità compresi tra  $57.67\% \pm 18.47\%$  (EMO30) e  $24.34\% \pm 20.00\%$  (GAPU89). I microsatelliti DCA8 e DCA18 presentando una



rispettivamente un elevato valore di assenza e di amplificazione aspecifica sono rimasti esclusi da questo tipo di valutazione

SSR	Corrispondenza totale con la cultivardi riferimento	Corrispondenza parziale con la cultivardi riferimento	Riproducibilità
DCA5	18.52%	22.22%	71.43% ± 21.82%
EMO30	10.58%	26.46%	57.67% ± 18.47%
UDO099-09	8.67%	23.12%	23.02% ± 16.54%
GAPU71B	7.93%	28.96%	31.75 %± 14.54%
DCA17	6.35%	5.56%	29.89% ± 14.10%
DCA18	6.17%	8.64%	n.d.
GAPU89	6.12%	43.20%	24.34% ± 20.00%
EMO90	0.00%	30.98%	46.30% ± 20.29%
DCA8	0.00%	5.26%	n.d.

**Tabella 30:** classificazione dei marcatori microsatelliti in base alla corrispondenza totale e parziale e alla loro riproducibilità su diverse repliche di estrazione.

I parametri in precedenza descritti sono stati analizzati anche in funzione dei diversi tipi di olio monovarietali, i risultati per le analisi di amplificabilità sono riportati nella seguente tabella.

Olio di oliva	Amplificabilità	Amplificabilità aspecifica	Assenza di amplificazione
Taggiasca	76.85%	12.04%	11.11%
Coratina denocciolato	44.44%	27.78%	27.78%
Coratina	36.46%	42.71%	20.83%
Biancolilla	36.11%	28.70%	35.19%
Moraiolo	35.42%	27.08%	37.50%
Nocellara del Bellice	35.19%	33.33%	31.48%
Nocellara Etna	35.19%	27.78%	37.04%
Ogliarola denocciolato	34.88%	30.23%	34.88%
Moresca	33.33%	20.37%	46.30%
Moraiolo denocciolato	32.29%	33.33%	34.38%
Frantoio denocciolato	31.11%	31.11%	37.78%
Frantoio	30.39%	28.43%	41.18%
Leccino denocciolato	28.43%	34.31%	37.25%
Leccino	28.00%	34.00%	38.00%
Itrana	27.17%	33.70%	39.13%
Tonda Iblea	25.47%	34.91%	39.62%
Ogliarola	24.44%	46.67%	28.89%
Rosciola	23.96%	26.04%	50.00%
Ogliarola Messinese	20.37%	38.89%	40.74%
Rappagliana	19.79%	19.79%	60.42%
Giaraffa	16.04%	44.34%	39.62%

**Tabella 31:** efficienza di amplificabilità in funzione delle diverse tipologie di olio analizzate.

Dalla analisi è emerso che in termini di amplificabilità del DNA estratto, l'olio che ha dato risultati maggiori del 50% è risultato l'olio Taggiasca, altri 11 oli hanno invece dato una amplificabilità compresa tra il 50% e il 30%, i rimanenti campioni analizzati presentavano valori inferiori al 30%.

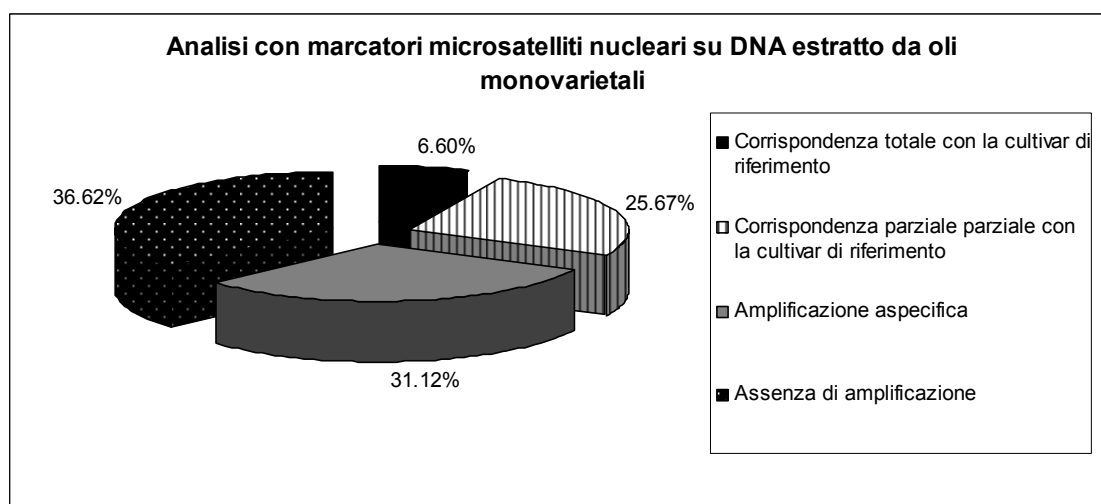
In termini di corrispondenza con la cultivar di riferimento, attraverso il confronto dei profili allelici in elettroforesi capillare, l'olio Taggiasca presentava il valore più alto (72.22%), Biancolilla, Itrana, Coratina, Nocellara del Bellice, Moresca, Nocellara Etnea, Leccino, Coratina denocciolato, Frantoio denocciolato avevano valori compresi tra il 12.96% e il 2.22%.

Olio di oliva	Corrispondenza totale con la cultivar di riferimento	Corrispondenza parziale con la cultivar di riferimento
Taggiasca	72.22%	4.63%
Biancolilla	12.96%	23.15%
Itrana	8.70%	18.48%
Coratina	8.33%	28.13%
Nocellara del Bellice	7.41%	27.78%
Moresca	7.41%	25.93%
Nocellara Etnea	5.56%	29.63%
Leccino	4.00%	24.00%
Coratina denocciolato	2.22%	42.22%
Frantoio denocciolato	2.22%	28.89%
Moraiolo	0.00%	35.42%
Ogliarola denocciolato	0.00%	34.88%
Moraiolo denocciolato	0.00%	32.29%
Frantoio	0.00%	30.39%
Leccino denocciolato	0.00%	28.43%
Tonda Iblea	0.00%	25.47%
Ogliarola	0.00%	24.44%
Rosciola	0.00%	23.96%
Ogliarola Messinese	0.00%	20.37%
Rappagliana	0.00%	19.79%
Giaraffa	0.00%	16.04%

**Tabella 32:** corrispondenza totale e parziale con la cultivar di riferimento in funzione delle diverse tipologie di olio analizzate.

Complessivamente i parametri analizzati possono essere visualizzati nella successiva rappresentazione grafica (Figura 17).

È possibile osservare come il parametro della corrispondenza, totale e parziale, per i loci microsatelliti nucleari analizzati, ha dato un valore del 32.27%, la valutazione di tale parametro risulta fondamentale per allestire successive analisi molecolari per la determinazione varietale degli oli di oliva con questa tipologia di marcatori molecolari.



**Figura 17:** rappresentazione grafica dell'analisi con marcatori microsatelliti nucleari. I valori ottenuti riflettono il risultato di 1701 repliche di PCR effettuate su 63 estrazioni indipendenti per 9 loci SSR analizzati.

### Analisi del contributo dell'impollinatore

Per verificare se nell'olio sono riscontrabili alleli provenienti dal seme e quindi dalla pianta impollinatrice, sono stati messi a confronto oli con il nocciolo e quindi il seme ed oli denocciolati. Attraverso l'analisi con marcatori microsatelliti si è verificata la possibile contaminazione da parte dell'impollinatore sul DNA estratto da olio denocciolato e non.

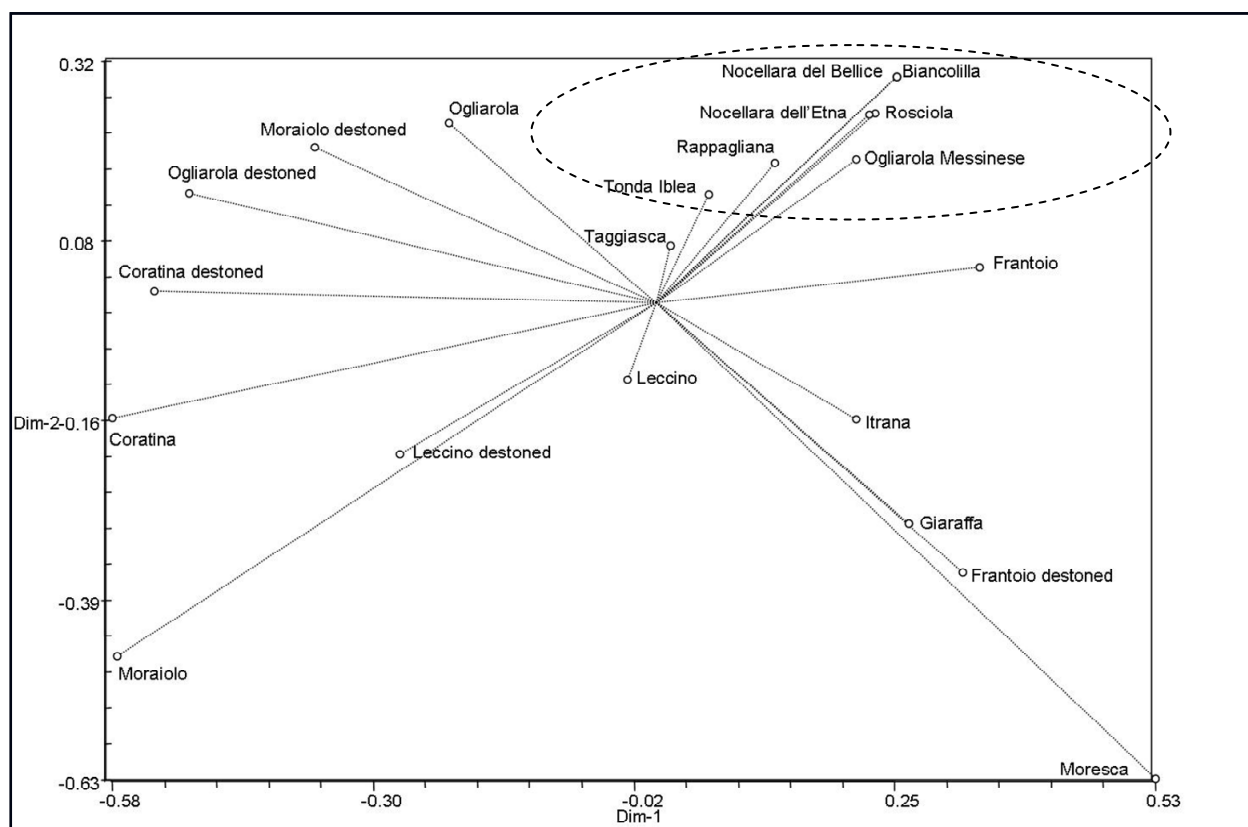
Dalle analisi effettuate è emerso che solo in un caso è stato possibile riscontrare un possibile contributo dell'impollinatore, sotto forma di un allele aggiuntivo individuato nel DNA estratto dall'olio Coratina (160-162) rispetto al suo omologo denocciolato (162). Negli altri casi non sono state notate differenze significative (Tabella 33).

Olio di oliva	EMO30	EMO90	DCA17	GAPU71B	GAPU89	UDO99-009	DCA5
Frantoio Frantoio denocciolato	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.
Coratina Coratina denocciolato	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	160-162 162	No Dif.	No Dif.
Moraiolo Moraiolo denocciolato	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.
Leccino Leccino denocciolato	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.
Ogliarola Ogliarola denocciolato	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.	No Dif.

**Tabella 33:** analisi comparativa per l'identificazione di differenze nei profili allelici tra olio denocciolato e non, per la valutazione del contributo dell'impollinatore. (No Dif: nessuna differenza nei profili allelici).

## Analisi statistiche

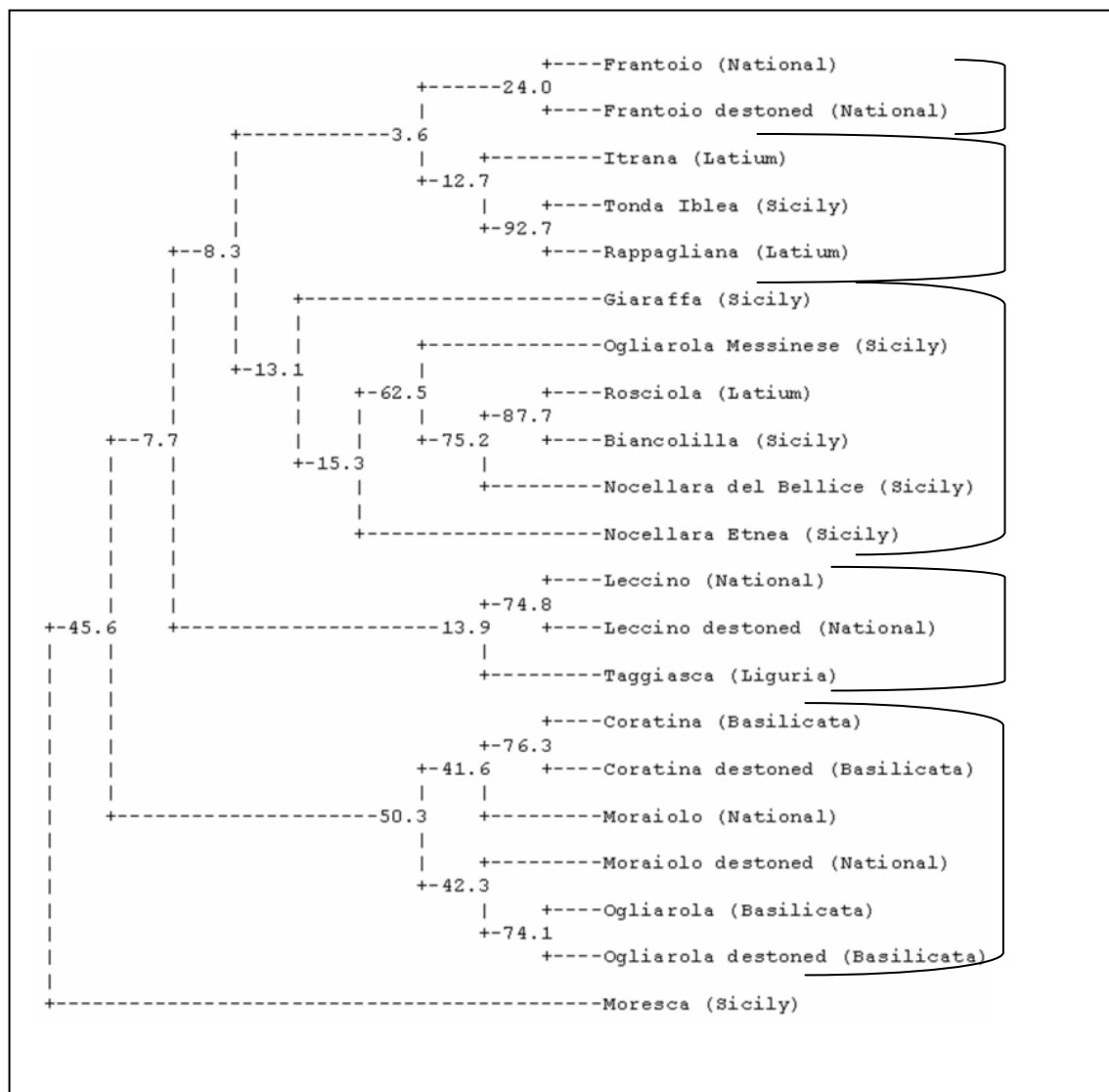
Gli alleli identificati nei diversi oli, sono stati analizzati attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA) per valutare una eventuale distribuzione geografica dei campioni analizzati partendo da una matrice di somiglianza ottenuta con il coefficiente DICE. Per la preparazione della matrice è stato utilizzato il software "NTedid v. 1.1" (Applied BioStatistics Inc.) mentre per l'analisi è stato impiegato il software "NTSYS v 2.02h" (Applied BioStatistics).



**Figura 18:** analisi delle componenti principali di tutti gli oli analizzati con il coefficiente DICE. La probabilità sommata delle due dimensioni è 64.45% che la distribuzione rappresenti la realtà. La zona all'interno dell'ovale rappresenta un possibile raggruppamento per i campioni di olio tipici della Sicilia.

L'analisi delle componenti principale ha messo in evidenza un possibile raggruppamento dei campioni di olio provenienti dalla Sicilia (ovale tratteggiato), questi formano infatti un gruppo distinto, indicando una possibile somiglianza a livello genetico (Figura 18).

Nell'albero filogenetico UPGMA successivo è possibile invece osservare, attraverso l'analisi bootstrap, come, anche in questo caso cinque oli di origine siciliana su sette formino un parziale raggruppamento (Winboot software, <http://www.irri.org>).



**Figura 19:** albero UPGMA con valori di bootstrap (1000 permutazioni) su campioni di olio monovarietale genotipizzati con marcatori microsatelliti nucleari utilizzando il software Winboot, per ogni campione è indicata la zoan di produzione.

### Microsatelliti cloroplastici

I microsatelliti cloroplastici presentano un solo allele (Tabella 28A) riflettendo una situazione di omoploidia, l'efficienza di questi marcatori sia in termini di amplificabilità che di corrispondenza con la cultivar di riferimento si presenta nettamente più alta rispetto a quella dei marcatori nucleari.

I valori percentuali sia di amplificabilità che di corrispondenza totale sono rispettivamente del 64.62% e del 69.12% per CCMP5 e CCMP10. La riproducibilità all'interno delle varie estrazioni analizzate è del  $61.90\% \pm 8.96$  per CCMP5 e  $68.12\% \pm 9.67$  per CCMP10. I valori descritti sono riportati nelle tabelle successive.

SSR	Amplificabilità	Amplificabilità aspecifica	Assenza di amplificazione
CCMP5	64.62%	16.92%	18.46%
CCMP10	69.12%	14.49%	16.39%

**Tabella 34:** analisi di amplificabilità realizzata microsattelliti cloroplastici.

SSR	Corrispondenza totale con la cultivardi riferimento	Corrispondenza parziale con la cultivardi riferimento	Riproducibilità
CCMP5	64.62%	0.00%	61.90% ± 8.96%
CCMP10	69.12%	0.00%	68.12% ± 9.67%

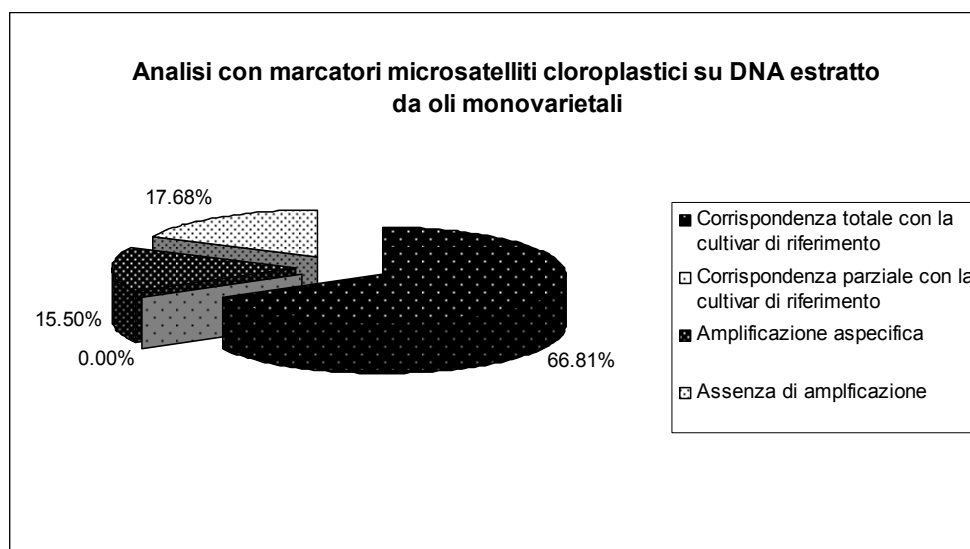
**Tabella 35:** valori percentuali di corrispondenza totale, parziale e riproducibilità dei microsattelliti cloroplastici.

Gli stessi parametri sono stati valutati per le diverse tipologie di oli monovarietali analizzati, 17 campioni mostrano una amplificabilità e una corrispondenza total superiore al 50% (Tabella 36).

Olio di oliva	Amplificabilità	Amplificazione aspecifica	Assenza di amplificazione	Corrispondenza Totale	Corrispondenza Parziale
Frantoio	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%
Frantoio denocciolato	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%
Leccino	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%
Tonda Iblea	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%
Leccino denocciolato	87.50%	12.50%	0.00%	87.50%	0.00%
Coratina	83.33%	16.67%	0.00%	83.33%	0.00%
Moresca	83.33%	16.67%	0.00%	83.33%	0.00%
Nocellara del Belice	80.00%	0.00%	20.00%	80.00%	0.00%
Taggiasca	80.00%	10.00%	10.00%	80.00%	0.00%
Moraiolo denocciolato	66.67%	33.33%	0.00%	66.67%	0.00%
Biancolilla	66.67%	33.33%	0.00%	66.67%	0.00%
Nocellara Etnea	66.67%	33.33%	0.00%	66.67%	0.00%
Coratina denocciolato	50.00%	50.00%	0.00%	50.00%	0.00%
Moraiolo	50.00%	50.00%	0.00%	50.00%	0.00%
Ogliarola	50.00%	0.00%	50.00%	50.00%	0.00%
Ogliarola denocciolato	50.00%	0.00%	50.00%	50.00%	0.00%
Itrana	50.00%	16.67%	33.33%	50.00%	0.00%
Ogliarola Messinese	33.33%	16.67%	50.00%	33.33%	0.00%
Giaraffa	33.33%	66.67%	0.00%	33.33%	0.00%
Rosciola	16.67%	0.00%	83.33%	16.67%	0.00%
Rappagliana	16.67%	0.00%	83.33%	16.67%	0.00%

**Tabella 36:** amplificabilità e corrispondenza in funzione delle diverse tipologie di olio analizzate con microsattelliti cloroplastici.

Nella figura 20 sono rappresentati graficamente i parametri valutati, sulle repliche di PCR condotte sulle tre estrazioni effettuate per i marcatori cloroplastici. Il valore di corrispondenza tra profilo allelico cultivar- olio è risultato del 66.81%.



**Figura 20:** rappresentazione grafica dei parametri analizzati per la genotipizzazione del DNA estratto dall'olio di oliva con marcatori molecolari microsatelliti cloroplastici. I valori riflettono l'analisi di 378 repliche di PCR su 63 estrazioni indipendenti.

### Approccio mini-SSR sul DNA degradato

Poiché il DNA estratto dall'olio è altamente degradato e presente in bassa quantità, la difficoltà maggiore è quella di ottimizzare le reazioni di amplificazioni in modo da ottenere un risultato positivo.

La dimensione degli ampliconi è un parametro fondamentale da prendere in considerazione, per ottenere PCR positive. I dati ottenuti dalle analisi di amplificabilità con marcatori microsatelliti sia nucleari che cloroplastici, hanno messo in evidenza che frammenti con una dimensione compresa tra 100 bp e 150 bp venivano amplificati nel 37% dei casi, mentre ampliconi con dimensioni tra 150 bp e 200 bp solo nel 34% dei casi. L'approccio utilizzato è stato quindi quello di ridurre le dimensioni degli ampliconi da amplificare. Si è cercato perciò di ridurre le dimensioni degli ampliconi, disegnando, su cinque microsatelliti nuovi primer più vicini alla sequenza ripetuta (Tabella 15).

Questi microsatelliti sono stati scelti in quanto erano i più difficili da amplificare nelle dimensioni originali, sono stati quindi testati su cinque oli monovarietali, anche questi altrettanto difficili da analizzare, più un olio che si era invece dimostrato di facile analizzabilità

(Taggiasca). Inizialmente sono stati individuati con questi nuovi primer gli alleli sulle cultivar di origine degli oli e successivamente si sono analizzati gli oli stessi.

Nella tabella successiva è possibile osservare un confronto tra l'intervallo di dimensione degli alleli individuati nei due tipi di loci microsatelliti, quelli individuati in letteratura e quelli mini.

Locus	Intervallo dimensioni alleli SSR (bp)	Intervallo dimensioni alleli mini-SSR (bp)
EMO30	183-196	60-64
EMO90	180-197	63-72
DCA8	123-139	69-103
DCA14	170-187	88-106
DCA18	168-184	90-124

**Tabella 37:** intervallo di dimensioni degli alleli individuate per i loci SSR e mini-SSR analizzati.

Nella tabella successiva sono invece riportate le dimensioni degli alleli identificati con i primer mini-SSR sulle cultivar di origine.

Cultivar	EMO30-mini		EMO90-mini		DCA8-mini		DCA14-mini		DCA18-mini	
Rappagliana	60	60	-	-	84	87	88	94	106	124
Taggiasca	62	62	64	68	76	76	88	106	90	100
Rosciola	60	62	64	66	83	89	95	105	94	103
Leccino	62	64	66	72	84	89	95	95	98	98
Tonda Iblea	60	64	64	66	69	103	95	106	92	103
Giaraffa	62	64	63	66	84	88	95	103	98	107

**Tabella 38:** dimensione degli alleli individuati nelle cultivar di olivo con i marcatori mini-SSR (-: non identificato).

Le tabelle successive riportano le percentuali dei parametri analizzati, sia in funzione del marcatori mini-SSR analizzato (Tabella 39) che dalla tipologia di olio utilizzato (Tabella 40).

SSR	Amplificabilità	Amplificabilità aspecifica	Assenza di amplificazione	Corrispondenza totale con la cultivar di riferimento	Corrispondenza parziale con la cultivar di riferimento
EMO30-mini	41.33%	8.00%	50.67%	33.33%	8.00%
EMO90-mini	41.67%	40.48%	17.86%	15.48%	26.19%
DCA14-mini	25.40%	22.22%	52.38%	7.94%	17.46%
DCA18-mini	15.94%	31.88%	52.17%	10.14%	5.80%
DCA8-mini	12.96%	20.37%	66.67%	0.00%	12.96%

**Tabella 39:** risultati ottenuti dall'analisi dei mini-microsatelliti su DNA estratto da sei oli di oliva monovarietali confrontando i risultati con le rispettive cultivar di olivo di riferimento in funzione del mini microsatellite testato.



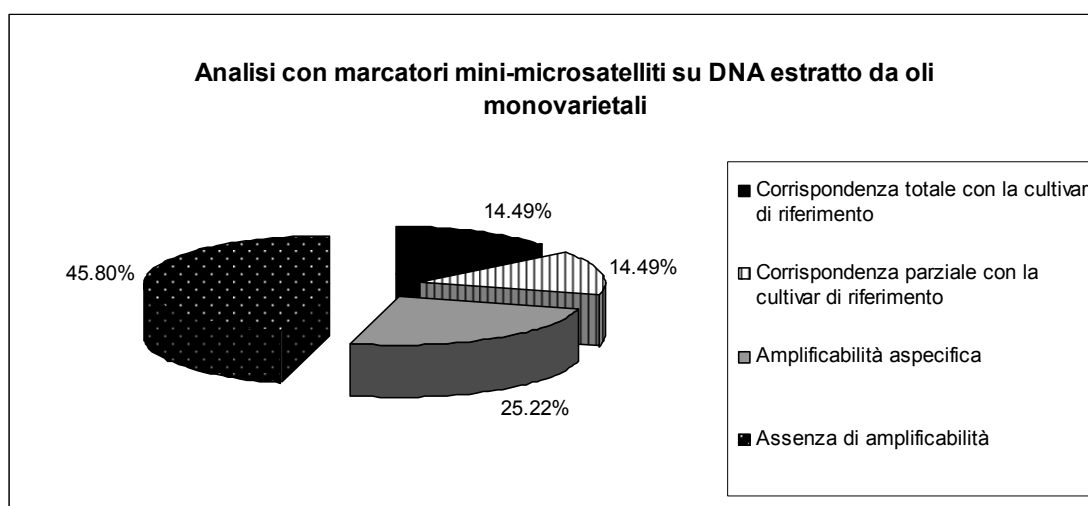
Il DNA anche in quest'analisi è stato estratto in triplicato da ogni olio e per ogni estrazione sono state allestite tre repliche di PCR per ogni marcatore mini-SSR. L'amplificabilità per i marcatori mini-SSR è compresa tra il 41.33% del locus EMO30-mini e il 12.96% del microsatellite DCA8-mini. Il parametro della corrispondenza totale è compreso invece tra il 33.33% e lo 0% dei loci -SSR EMO30-mini e DCA8-mini.

Olio di oliva	Amplificabilità	Amplificabilità aspecifica	Assenza di amplificazione	Corrispondenza totale con la cultivar di riferimento	Corrispondenza parziale con la cultivar di riferimento
Tonda Iblea	36.36%	27.27%	36.36%	15.15%	21.21%
Rosciola	36.47%	25.76%	37.88%	10.61%	25.76%
Leccino	33.33%	24.56%	42.11%	21.05%	12.28%
Giaraffa	31.11%	20.00%	48.89%	22.22%	8.89%
Taggiasca	22.73%	22.72%	54.55%	13.64%	9.09%
Rappagliana	8.88%	31.11%	60.00%	4.44%	4.44%

**Tabella 40:** risultati ottenuti dall'analisi dei mini-microsatelliti su DNA estratto da sei oli di oliva monovarietali confrontando i risultati con le rispettive cultivar di olivo di riferimento in funzione della varietà di olio analizzato.

L'analisi dei parametri di amplificabilità in funzione degli oli mostra valori compresi rispettivamente tra il 36.47% dell'olio Rosciola e il 8.88% dell'olio Rappagliana.

La corrispondenza totale oscilla invece tra il 22.22% (Giaraffa) e il 4.44% (Rappagliana). Nella figura 21 è possibile visualizzare i valori percentuali dei parametri analizzati per le analisi di "fingerprinting" molecolare condotte con i marcatori mini-SSR.



**Figura 21:** rappresentazione grafica dei parametri analizzati per la genotipizzazione del DNA estratto dall'olio di oliva con marcatori molecolari mini-SSR. I valori sono il risultato di 270 repliche di PCR condotte su 18 estrazioni indipendenti con 5 marcatori molecolari mini-SSR.

La somma della corrispondenza totale e parziale con le cultivar di riferimento è del 28.98%.

## Confronto tra l'analisi di riconoscimento varietale con marcatori mini-SSR e SSR

I parametri valutati per i marcatori microsatelliti, sia mini che da letteratura, sono stati confrontati per verificare se vi fosse un miglioramento associato alla dimensione dell'amplicone nella analisi di genotipizzazione sul DNA estratto dall'olio di oliva.

La tabella 41 evidenzia i valori di amplificabilità in relazione alla dimensione media dell'amplicone per i loci SSR e mini-SSR. Il microsatellite EMO30 nella versione mini presenta un valore di amplificabilità superiore a quello della versione normale, 41.33% contro il 37.04%; un notevole incremento nella efficienza di amplificazione è stata rilevata anche per il microsatellite DCA14, passando da una assenza totale di amplificazione ad un valore del 25.40%. Il microsatellite DCA18 non ha presentato un sostanziale miglioramento in termini di amplificabilità in seguito alla riduzione della dimensione dell'amplicone, come pure i microsatelliti EMO90 e DCA8.

SSR	Amplificabilità	Amplificabilità aspecifica	Assenza di amplificazione	Dimensione media amplicone (bp)
EMO30-mini	41.33%	8.00%	50.67%	62
EMO30	37.04%	50.79%	12.17%	190
DCA14-mini	25.40%	22.22%	52.38%	97
DCA14	0.00%	0.00%	0.00%	179
DCA18-mini	14.81%	26.54%	58.64%	108
DCA18	15.94%	31.88%	52.17%	176
EMO90-mini	30.98%	37.50%	31.52%	68
EMO90	41.67%	40.48%	17.86%	189
DCA8-mini	5.26%	61.40%	33.33%	86
DCA8	12.96%	20.37%	66.67%	133

**Tabella 41:** dimensione media dell'amplicone per i loci mini-microsatelliti e microsatelliti analizzati in funzione dell'amplificabilità, amplificabilità aspecifica e assenza di amplificazione.

Il mini microsatellite EMO30 presenta una corrispondenza totale, nettamente più alta rispetto all'originale (33.33% rispetto a 10.58%), anche il microsatellite DCA14-mini ha dato un incremento del valore di corrispondenza passando dalla assenza ad un valore pari a 7.94%.

Non è stato osservato un incremento significativo di questo parametro per gli altri mini-microsatelliti.

I valori di corrispondenza parziale sono risultati migliori per i mini-microsatelliti EMO90 e DCA18, presentando valori rispettivamente di 30.98% e di 8.64% rispetto al 26.98%. Il locus DCA8-mini non ha invece dato miglioramenti significativi (Tabella 42).

SSR	Corrispondenza totale con la cultivar di riferimento	Corrispondenza parziale con la cultivar di riferimento	Dimensione media amplicone (bp)
EMO30-mini	33.33%	8.00%	62
EMO30	10.58%	26.46%	190
EMO90-mini	0.00%	30.98%	68
EMO90	15.48%	26.19%	189
DCA8-mini	0.00%	5.26%	86
DCA8	0.00%	12.96%	133
DCA14-mini	7.94%	17.46%	97
DCA14	0.00%	0.00%	179
DCA18-mini	6.17%	8.64%	108
DCA18	10.14%	5.80%	176

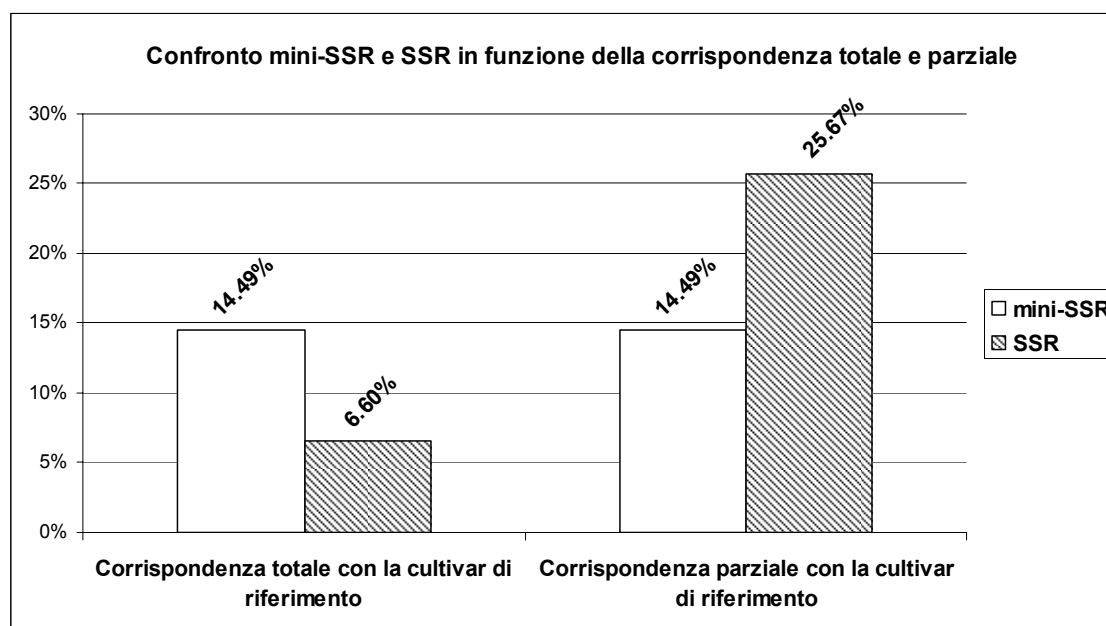
**Tabella 42:** confronto tra la corrispondenza totale e parziale con la cultivar di olivo di riferimento tra mini-microsatelliti e microsatelliti.

L'analisi dei parametri in funzione della tipologia di olio analizzato mette in evidenza come i mini-SSR presentano valori superiori nei parametri utilizzati ai rispettivi SSR (Tabella 43).

Microsatellite	Olio di oliva	Corrispondenza totale con la cultivar di riferimento	Corrispondenza parziale con la cultivar di riferimento
mini-SSR	Taggiasca	15.15%	21.21%
SSR	Taggiasca	72.22%	4.63%
mini-SSR	Rappagliana	4.44%	4.44%
SSR	Rappagliana	0.00%	19.79%
mini-SSR	Rosciola	10.61%	25.76%
SSR	Rosciola	0.00%	23.96%
mini-SSR	Leccino	21.05%	12.28%
SSR	Leccino	4.00%	24.00%
mini-SSR	Tonda Iblea	15.15%	21.21%
SSR	Tonda Iblea	0.00%	25.47%
mini-SSR	Giaraffa	22.22%	8.89%
SSR	Giaraffa	0.00%	16.04%

**Tabella 43:** risultati ottenuti dall'analisi dei mini-microsatelliti mini e normali sul DNA estratto da sei oli monovarietali confrontando i risultati con le rispettive cultivars di olivo di riferimento in funzione della varietà di olio analizzato.

Nella figura 22 sono riassunte le caratteristiche generali dei mini SSR rispetto ai microsatelliti originali. La riduzione porta ad un miglioramento, seppure non totale, della corrispondenza totale con la cultivar di riferimento, ma non di quella parziale, che risulta invece ridotta.



**Figura 22:** rappresentazione grafica del parametro della corrispondenza totale e parziale con la cultivar di olivo di riferimento tra marcatori molecolari mini-SSR e SSR applicati al DNA estratto da olio di oliva monovarietale.

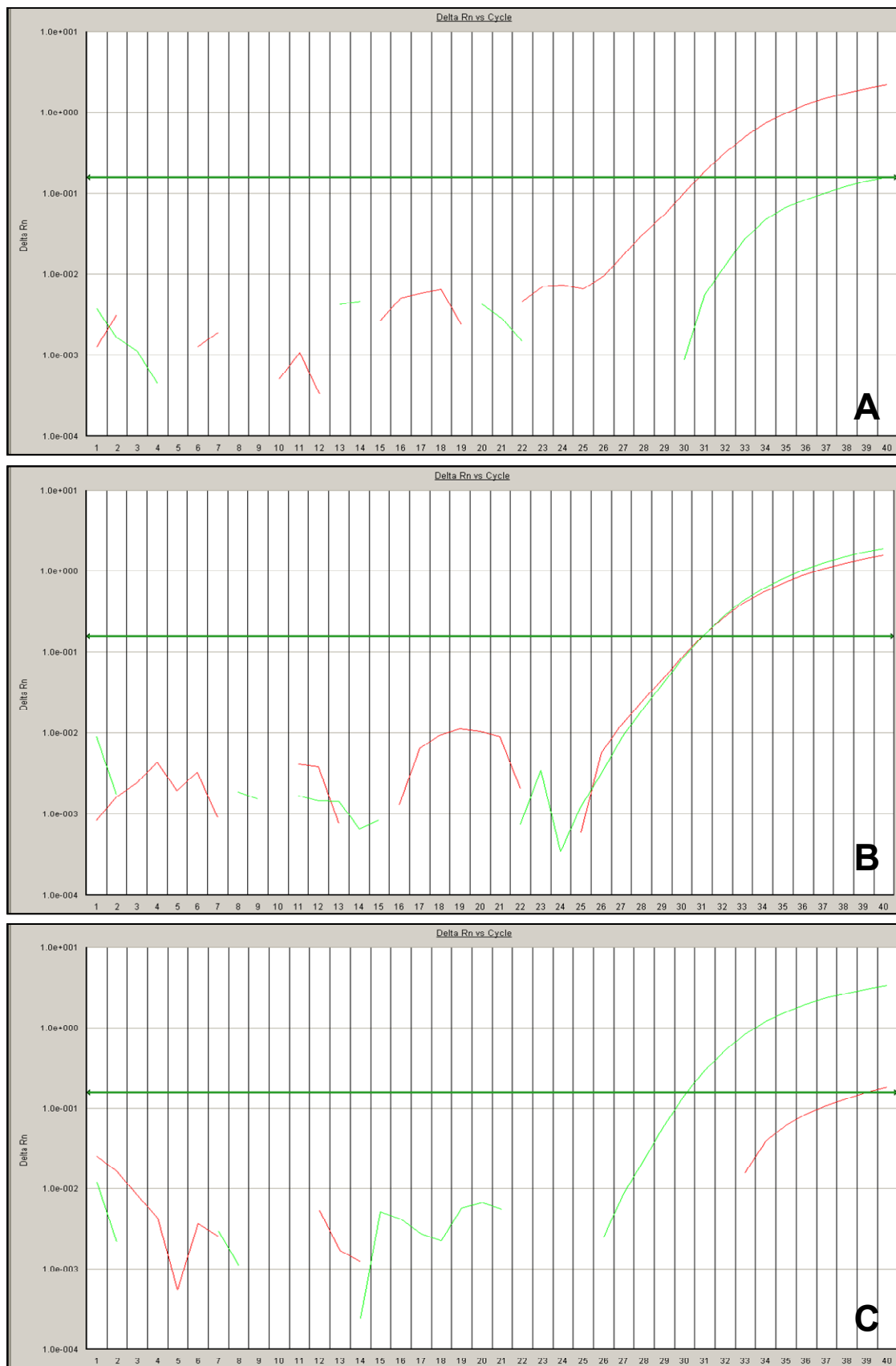
### Analisi quantitativa mediante marcatori molecolari SNP

In questa fase è stata valutata la possibilità di utilizzare la Real-Time quantitativa per determinare la quantità delle cultivar presenti in miscele di olio multivarietali. A questo scopo è stato preso in considerazione uno SNP (C/T) identificativo all'interno del gene oleosina su cui sono state disegnate due sonde TaqMan-MGB specifiche per le varianti alleliche di tale SNP.

#### Analisi di specificità

L'analisi è stata eseguita su DNA estratto dalle foglie delle cultivar Leccino, Tonda Iblea e Biancollila che presentavano rispettivamente i seguenti genotipi CC, CT e TT.

Nella figura 23-A si può osservare come il profilo di amplificazione ottenuto per l'omozigote CC, è solo quello determinato dalla specifica sonda, nel caso dell'eterozigote CT si possono osservare entrambi i profili di amplificazione (Figura 23-B), mentre per l'omozigote TT si può osservare come l'amplificazione prevalente sia quella determinata dalla sonda specifica per il genotipo TT (Figura 23-C).



**Figura 23:** profili di amplificazione per la verifica della specificità delle sonde disegnate per identificare i tre genotipi. (A) amplificazione condotta sul DNA estratto dalla cultivar Leccino (genotipo CC); (B) amplificazione condotta sul DNA estratto della cultivar Tonda Iblea (genotipo CT); (C) amplificazione condotta sul DNA estratto della cultivar Biancollila (genotipo TT).

Nella seguente tabella sono riportati i cicli soglia medi delle amplificazioni condotte con le sonde sulle cultivar di riferimento per verificarne la specificità e la selettività.

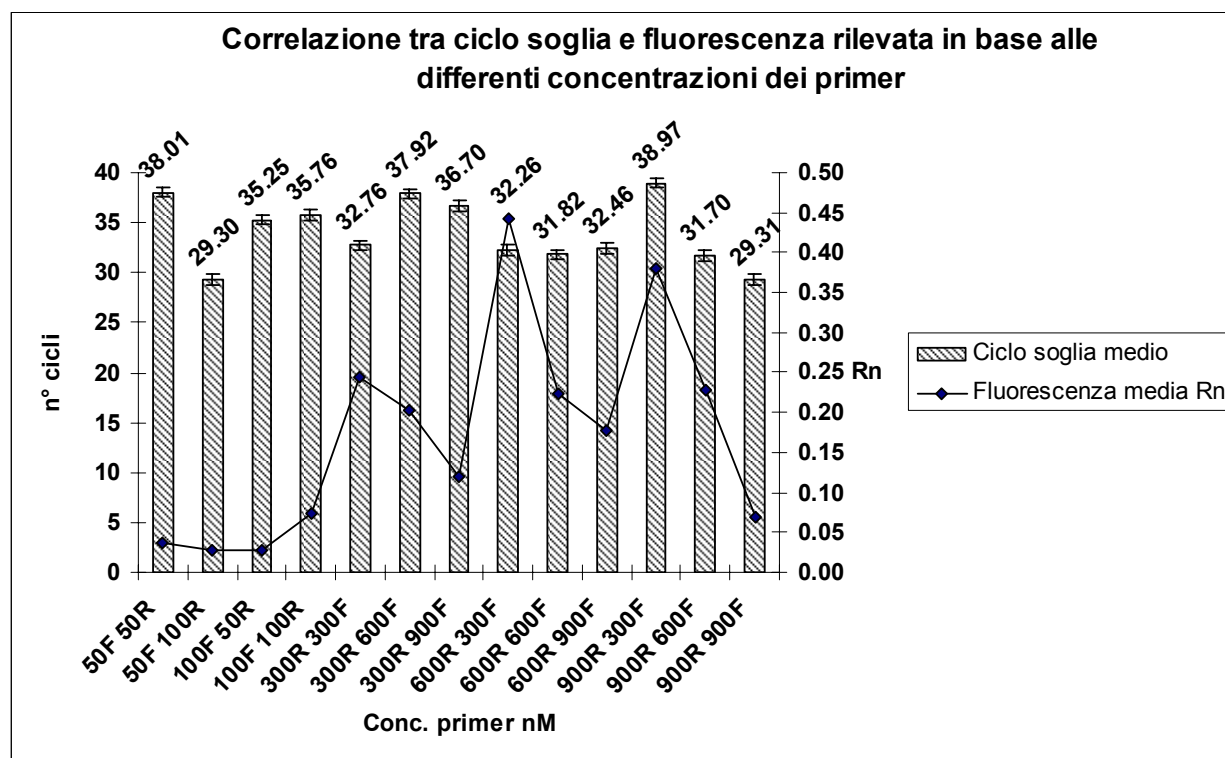
Genotipo cultivar	Sonda	Ciclo soglia medio
Leccino CC (60 ng)	Oleo CC	30.33 ± 0.3
Leccino CC (60 ng)	Oleo TT	n.d.
Nocellara del Bellice (CT 60 ng)	Oleo TT	31.23 ± 0.3
Nocellara del Bellice (CT 60 ng)	Oleo CC	30.89 ± 0.3
Tonda Iblea (TT 60ng)	Oleo TT	30.85 ± 0.4
Tonda Iblea (TT 60ng)	Oleo CC	37.00 ± 0.4

**Tabella 44:** analisi di specificità delle sonde verso i rispettivi genotipi attraverso la valutazione del ciclo soglia medio in Real-Time PCR.

Come si può osservare le amplificazioni possono considerarsi specifiche per i rispettivi genotipi.

### Ottimizzazione della concentrazione dei primer e delle sonde

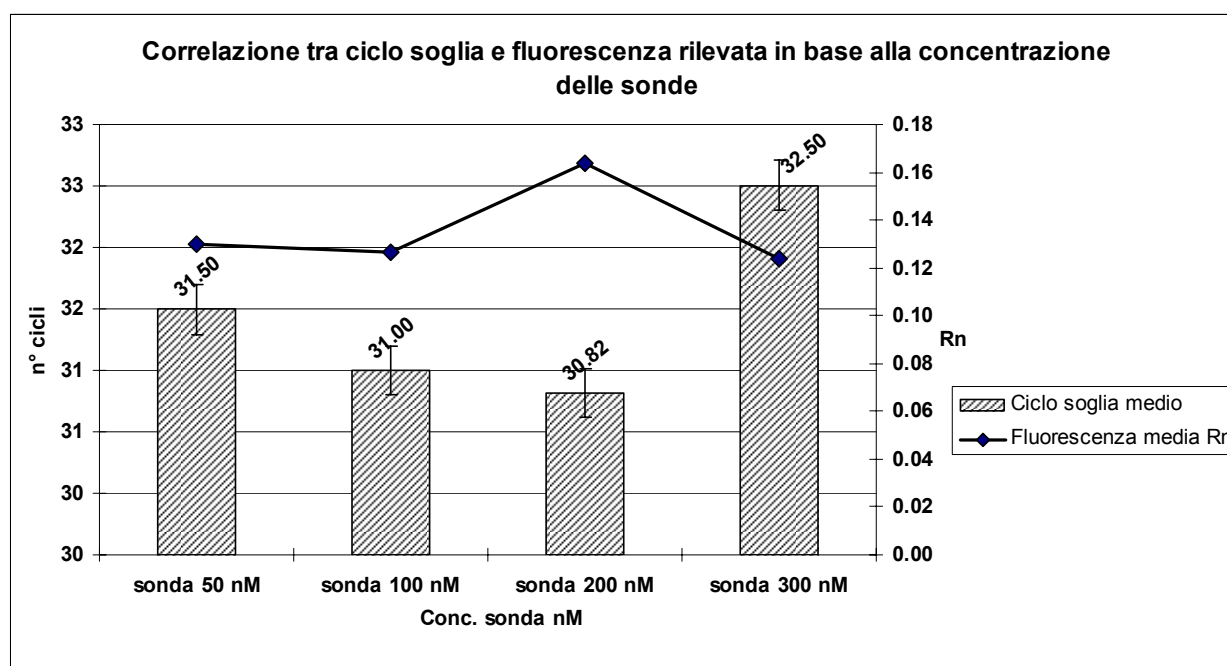
I parametri presi in considerazione per determinare la concentrazione ideale dei primer forward e reverse disegnati sulla sequenza esaminata, sono stati il ciclo soglia e il livello di fluorescenza a tale ciclo. Tali dati sono stati messi in correlazione nel grafico riportato di seguito.



**Figura 24:** correlazione tra il ciclo soglia medio e la fluorescenza rilevata a tale ciclo per le differenti concentrazioni dei primer utilizzate in Real-Time PCR.

Come si può osservare dalla precedente figura la concentrazione ideale per quanto riguarda l'amplificazione della sequenza bersaglio corrisponde al valore di 600 nM per il primer reverse e di 300 nM per il primer forward. Solo per tali concentrazioni si riesce ad abbinare a un basso ciclo soglia un segnale di fluorescenza elevato; questa infatti è la condizione ideale per avere una buona reazione di amplificazione in Real-Time PCR.

Analoghe considerazioni possono essere fatte per quanto riguarda la concentrazione delle sonde utilizzate per amplificare il genotipo CC e il genotipo TT, individuando un valore ottimale per entrambe le sonde di 200 nM. Nella figura 25 è riportata l'analisi descritta per una reazione in cui sono presenti entrambe le sonde.



**Figura 25:** correlazione tra il ciclo soglia medio e la fluorescenza rilevata a tale ciclo per le differenti concentrazioni delle sonde utilizzate in Real-Time PCR.

### Valutazione dell'efficienza della reazione di amplificazione e costruzione di una retta di taratura

Per potere effettuare un'analisi quantitativa è necessario definire l'intervallo di linearità delle quantità di DNA in cui l'analisi risulta affidabile. Poiché un obiettivo del lavoro svolto è stato quello di quantificare il DNA estratto da olio e quindi presente in piccole quantità, è stata costruita una retta di taratura amplificando quantità note di DNA estratto da foglia e testando l'efficienza della reazione su DNA estratto da olio allo scopo di poter determinare la possibilità di svolgere una futura analisi quantitativa su questa matrice.

L'analisi è stata eseguita utilizzando le concentrazioni precedentemente identificate per i primer e per le sonde. Come si vede nella figura 26 la retta presenta un coefficiente di correlazione pari a 0.98, il coefficiente angolare, pari a 3.11, l'intercetta pari a 38.50, tenendo conto che questi valori approssimano quelli standard di una reazione di Real-Time PCR, si può affermare che le diluizioni analizzate risultano ottimali per il loro utilizzo come standard in una successiva analisi quantitativa fino ad un valore pari a 3.12 ng. L'efficienza della reazione di amplificazione presentava un valore del 91.45%.

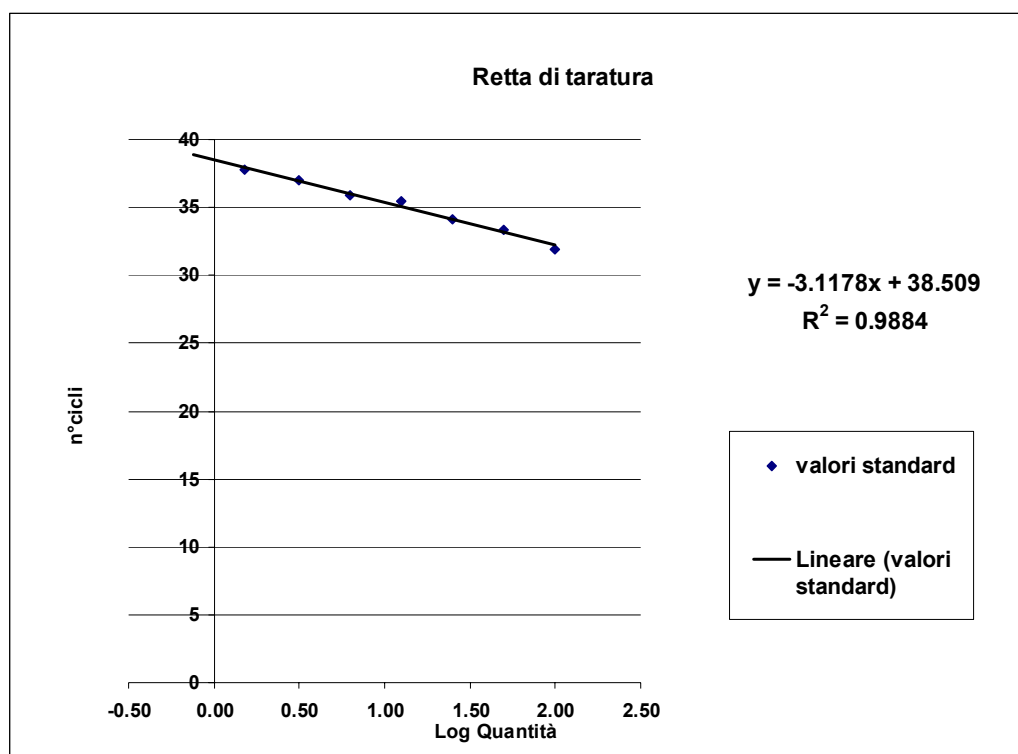


Figura 26: retta di regressione ottenuta da diluizioni seriali di DNA estratto da foglia di olivo a quantità note.

### Analisi quantitativa sul DNA estratto dalle foglie

L'analisi quantitativa è stata ottimizzata sul DNA estratto dalle foglie delle cultivar dei due differenti genotipi secondo la seguente tabella.

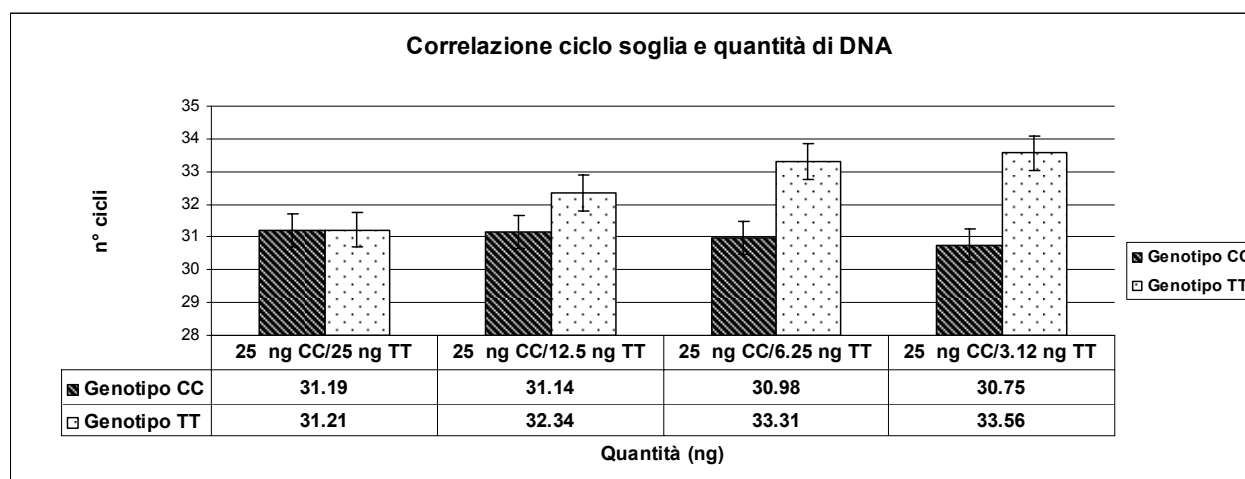
CC \ TT	25 ng	12.5 ng	6.25 ng	3.12 ng
25 ng	25 ng/25 ng	25 ng/12.5 ng	25 ng/6.25 ng	25 ng/3.12 ng
12.5 ng	12.5 ng/25 ng	12.5 ng/12.5 ng	12.5 ng/6.25 ng	12.5 ng/3.12 ng
6.25 ng	6.25 ng/25 ng	6.25 ng/12.5 ng	6.25 ng/6.25 ng	6.25 ng/3.12 ng
3.12 ng	3.12 ng/25 ng	3.12 ng/12.5 ng	3.12 ng/6.25 ng	3.12 ng/3.12 ng

Tabella 45: matrice delle quantità di DNA estratto dalle foglie delle cultivar Leccino (genotipo CC) e Biancollila (genotipo TT) aggiunto nella miscela di amplificazione in Real-Time PCR.



L'obiettivo era quello di verificare il funzionamento dei primer e delle sonde a basse concentrazioni di DNA. Attraverso l'andamento delle reazioni di amplificazione è stata verificata la linearità tra ciclo soglia e quantità di DNA aggiunto nelle miscele di amplificazione. L'andamento della reazione di amplificazione mostra come, grazie alla specificità e alla selettività delle sonde per lo specifico genotipo, sia possibile distinguere all'interno di differenti miscele di DNA, a quantità note, la presenza di una specifica cultivar di olivo rispetto all'altra. Nella figura 27 è riportato l'esempio del DNA di Leccino (CC) mantenuto in quantità fissa e quello estratto dal campione Biancollila (TT) aggiunto in quantità scalari.

È possibile osservare che mentre il ciclo soglia per il campione Leccino rimane costante, quello per il campione Biancollila aumenta in modo inversamente proporzionale alla quantità di DNA aggiunta alla miscela di amplificazione.



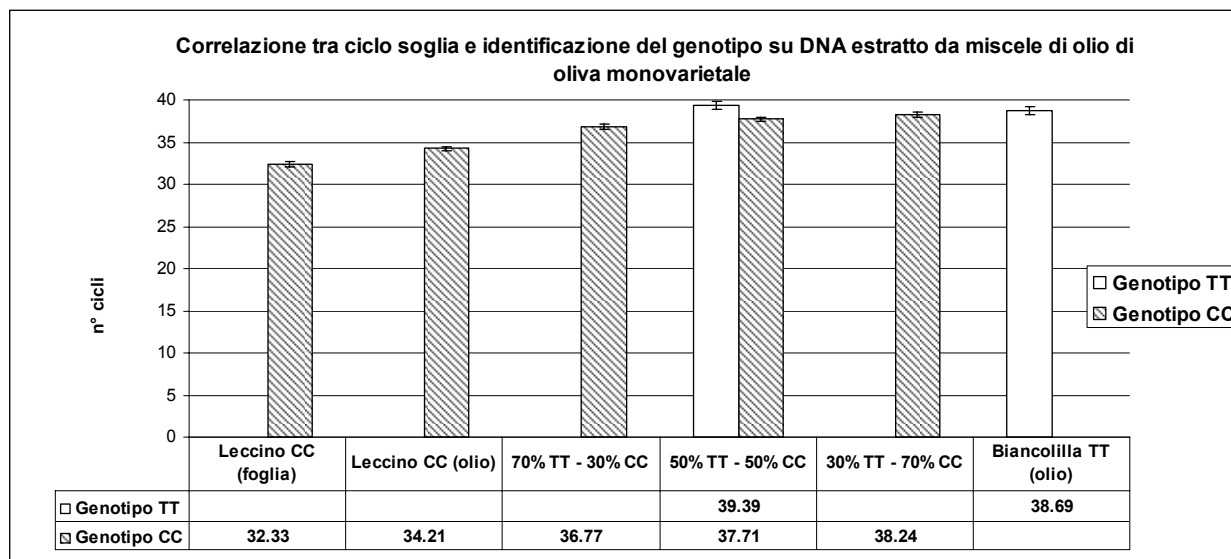
**Figura 27:** correlazione tra ciclo soglia medio e quantità di DNA all'interno di una miscela a quantitativi noti in una reazione Real-Time PCR con sonde TaqMan-MGB per la discriminazione allelica. Il grafico riporta l'andamento dei cicli soglia delle miscele di DNA descritte nella seconda riga della matrice in tabella 45.

### Analisi quantitativa sul DNA estratto dal olio di oliva

Dopo le prove su miscele di DNA estratto da foglia, le analisi sono state condotte su miscele di oli ottenuti dalle cultivar di riferimento Leccino e Biancollila mescolati in proporzioni diverse. Le reazioni condotte in duplex, hanno mostrato che le amplificazioni sono specifiche per i singoli genotipi (il DNA estratto dal singolo olio vengono identificati correttamente) tuttavia l'amplificazione del DNA estratto dall'olio Leccino risulta predominante rispetto al DNA estratto dall'olio Biancollila.

Infatti come si osserva nella figura 28, con il diminuire della percentuale di olio Leccino, si ha un aumento del ciclo soglia a cui compare l'amplicone specifico. Non è stata tuttavia osservata

alcuna comparsa dell'amplicone specifico per il campione Biancollila con l'aumentare della sua percentuale nella miscela di estrazione.



**Figura 28:** analisi Real-Time PCR di miscele di olio prodotti con cultivar aventi differenti genotipi.

## Discussione

### Valutazione delle metodiche estrattive dalla matrice olio

#### Olio di oliva

Per poter analizzare la natura del DNA contenuto in un determinato alimento, è indispensabile estrarlo dalle matrici alimentari di interesse, cercando di ottenere una buona resa e un campione di DNA di buona qualità, che possa poi essere facilmente utilizzato in reazioni di PCR.

L'estrazione da una matrice come l'olio, presenta notevoli inconvenienti, che risiedono sia nella composizione chimica dell'olio stesso sia nella natura del DNA presente: quest'ultimo tende infatti a presentarsi altamente degradato sia in seguito a processi chimici di ossidazione che a trattamenti meccanici come il processo di molitura delle olive. La matrice olio risulta, ricca in acidi grassi saturi e polinsaturi e le profonde modificazioni che subisce durante i processi di lavorazione costituiscono i principali fattori limitanti per l'estrazione del DNA.

Disporre di un appropriato metodo di estrazione del DNA è quindi un passaggio critico per il successo e la validazione di eventuali studi molecolari (Giacomazzi *et al.*, 2005); Muzzalupo e Perri nel 2002 e poi Busconi nel 2003 hanno dimostrato come sia possibile recuperare e caratterizzare dal punto di vista molecolare il DNA estratto da olio vergine d'oliva. Altri autori hanno evidenziato in seguito la possibilità di estrarre il DNA dall'olio di oliva e amplificarlo mediante PCR per successive analisi con marcatori molecolari (Pasqualone *et al.*, 2004; Pafundo *et al.*, 2005; Pafundo *et al.*, 2007, Pasqualone *et al.*, 2007).

Durante questo lavoro di ricerca sono stati analizzati e valutati due metodi di estrazione: uno sperimentale basato sulla estrazione attraverso un solvente organico e l'altro commerciale basato sull'interazione con una membrana in polipropilene contenente silicio attivato in grado di trattenere il DNA. In entrambe le metodiche estrattive, il problema principale è rappresentato dal recupero del DNA dalla fase oleosa e da eventuali residui vegetali della molitura presenti in soluzione.

Tutti e due i metodi analizzati operavano direttamente sulla fase liquida dell'olio, permettendo quindi di applicare, riducendo i volumi iniziali, queste metodiche direttamente all'olio, senza bisogno di fasi iniziali di centrifugazione per il recupero di possibili residui cellulari della molitura, difficilmente isolabili in campioni commerciali sottoposti a intensi processi di filtrazione.

I controlli di estrazione per entrambi i metodi hanno permesso di valutare, attraverso un approccio quantitativo in Real-Time PCR, la resa estrattiva dei singoli metodi e analizzare la resa media percentuale di campioni di olio addizionati con quantitativi noti di DNA estratto dalle

foglie, per valutare in che modo la matrice olio interagisse con il processo estrattivo.

Da questa prima analisi è risultato che il metodo commerciale presentava una resa di estrazione media maggiore rispetto al metodo sperimentale. È stato rilevato che le quantità di DNA estratto sono dell'ordine dei nanogrammi. La valutazione di altri parametri quali il volume di partenza necessario, la quantità di DNA estratto, il tempo di estrazione e il costo per campione ha permesso di individuare nel kit commerciale Nucleo Spin Plant il metodo d'elezione per estrarre il DNA da olio di oliva.

Attraverso l'analisi dei profili di amplificazione dei campioni addizionati con DNA vegetale è stato possibile verificare una perdita di linearità tra le diluizioni effettuate e i rispettivi cicli soglia per i campioni in esame. Questo risultato concorda sia con le basse rese estrattive sia con la presenza di inibitori della reazione di amplificazione presenti negli estratti. A parità anche di questa condizione il metodo di estrazione Nucleo Spin Plant si presenta comunque maggiormente applicabile all'olio di oliva. Il problema della inibizione della reazione di amplificazione è tipica dei campioni estratti da matrici alimentari ed è spesso causa di mancate amplificazioni.

### **Olio di semi**

La possibilità di poter estrarre il DNA da olio di semi è un altro presupposto basilare per poter poi sviluppare metodiche molecolari per l'identificazione di eventuali adulterazioni dell'olio di oliva con oli non di oliva. Così come per l'olio di oliva sono stati esaminati due metodi estrattivi per verificare la loro adattabilità alla matrice in esame. Il metodo commerciale Nucleo Spin Plant è stato, anche in questo caso, comparato con un protocollo sperimentale modificato a base di CTAB. L'analisi fluorimetrica degli estratti ha permesso di stabilire come il metodo commerciale presentasse, anche in questo caso, rese estrattive più elevate rispetto al metodo sperimentale.

La qualità e l'amplificabilità in PCR del DNA estratto da matrici alimentari può essere influenzata da tre fattori principali: (i) la presenza di inibitori della PCR nell'alimento stesso; (ii) il livello di degradazione del DNA, causato ad esempio dai meccanismi di depurinazione; (iii) la lunghezza media dei frammenti di DNA che è possibile estrarre e amplificare. Questi fattori dipendono strettamente dalle caratteristiche di composizione del campione stesso e dalla lavorazione che l'alimento subisce in fase di produzione, nonché dai parametri chimici e fisici del metodo di estrazione utilizzato. I trattamenti termici sono ritenuti i responsabili principali della degradazione e della frammentazione di DNA ad elevato peso molecolare (Rooney *et al.*, 1987), mentre i trattamenti fisici o chimici causano rotture casuali nella doppia elica del DNA,

riducendo in questo modo la lunghezza media dei frammenti che è possibile estrarre da un campione alimentare.

Per valutare il livello di degradazione del DNA estratto sono state disegnate quattro coppie di primer sulla sequenza del gene dell'oleosina, che permettevano l'amplificazione di frammenti di DNA compresi tra 157 bp e 57 bp. Tutte queste coppie di primer sono state utilizzate per amplificare il DNA estratto dall'olio di oliva e di semi con entrambi i metodi estrattivi: il metodo Nucleo Spin Plant ha dato anche in questo caso i risultati migliori in termini di amplificabilità.

Dai profili elettroforetici risulta evidente come la dimensione degli ampliconi sia fondamentale per il successo della amplificazione stessa. Il DNA estratto dall'olio di oliva è stato amplificato con successo dando ampliconi fino a 106 bp. Per il DNA estratto da olio di semi si ottengono amplificazioni con ampliconi di 61 bp e 57 bp; per entrambe le matrici è difficile ottenere ampliconi superiori alle 150 bp. Diventa quindi fondamentale, non solo avere primer efficienti a basse concentrazioni di DNA, ma capaci anche di generare ampliconi facilmente identificabili.

### **Metodologie molecolari per l'identificazione di adulterazioni**

La frode più usuale nel settore oleario è quella di miscelare olio di semi, di basso valore economico, con olio di oliva (*Olea europea* L.) per poi commercializzarlo come olio extravergine d'oliva. In alcuni casi è stato accertato che l'olio di semi veniva colorato artificialmente con clorofilla e tramite aggiunta di  $\beta$ -carotene era venduto come olio extravergine. Un'altra tipologia di frode è realizzata commercializzando come olio extra vergine d'oliva, oli che all'origine erano stati qualificati come lampanti. Questi, opportunamente trattati e con l'aggiunta di modeste quantità di oli vergini di oliva, diventano simili chimicamente all'olio di oliva extravergine. In aggiunta alla frode economica, le adulterazioni possono avere dei risvolti di carattere sanitario, come è avvenuto in Spagna nel 1981 dove 17.000 persone sono rimaste intossicate per aver consumato olio adulterato (Capote *et al.*, 2007).

Le tecniche analitiche principali per l'identificazione di oli alieni sono basate principalmente sull'uso di tecniche cromatografiche, come HPLC e HRGC, per l'analisi degli acidi grassi, dei trigliceridi e degli steroli (Aparicio and Aparicio., 2000). Altri metodi si basano sulla fluorescenza (Pouilly *et al.*, 2006), l'infrarosso (Vlachos *et al.*, 2006), la risonanza magnetica nucleare (Fragaki *et al.*, 2006) e la spettrometria di massa (Gómenez-Ariza *et al.*, 2006).

Lo sviluppo di analisi molecolari rapide e sensibili per l'identificazione di tracce di DNA diverse da quelle dell'olivo è sicuramente un approccio innovativo rispetto alle tradizionali analisi chimiche, che può fornire un ulteriore supporto alle metodiche analitiche classiche.

Nel lavoro svolto è stato dimostrato come si è possibile estrarre il DNA da olio di semi: di nocciola, di mais, di girasole, di sesamo, di zucca e di riso, verificando la possibilità di amplificarlo con primer specifici sia “end point” che Real-Time PCR. Le analisi qualitative sia in singolo che in duplex PCR hanno dimostrato come sia possibile attraverso lo studio dei profili di dissociazione individuare gli ampliconi specifici per l’identificazione in miscele standard di olio di oliva e di olio di nocciola, mais e girasole preparate in diverse percentuali.

I primer specifici per nocciola, girasole e sesamo sono stati disegnati sulle sequenze geniche degli allergeni principali delle tre specie esaminate. In questo modo si è cercato anche di sviluppare una metodica per l’identificazione di allergeni nascosti in matrici alimentari. I metodi basati sulla PCR per la rilevazione indiretta di allergeni offrono un alto grado di specificità e sensibilità. Inoltre sono immuni alle variazioni stagionali e geografiche, cosa che li rende uno strumento potenziale per lo screening di residui allergenici in alcune tipologie di alimenti, in particolare quelli in cui l’analisi delle proteine è difettosa a causa di problemi di solubilità e degradazione delle proteine o della variabilità biologica dei materiali di origine.

Ad ogni modo, le analisi del DNA sono influenzate dall’effetto della matrice, quindi la possibilità di avere un metodo di estrazione ottimizzato per operare con successo sull’olio, sia di semi che di oliva, rimane un requisito fondamentale.

### **Determinazione varietale mediante marcatori microsatelliti**

I marcatori molecolari microsatelliti sono tra i più diffusi nell’analisi genetica: presentano infatti un elevato livello di polimorfismo, un’ampia distribuzione nel genoma, sono codominanti, facili da analizzare e caratterizzati da una elevata riproducibilità.

L’applicazione dell’analisi a livello del DNA per tracciare prodotti di origine animale e vegetale rappresenta un sistema di controllo che integrato con i metodi tradizionali di identificazione delle materie prime può diventare un valido strumento per le analisi di tracciabilità. Il DNA infatti è una molecola altamente stabile ed offre la possibilità di identificazione sia a livello individuale che di specie.

La possibilità di poter determinare il contributo della pianta di origine analizzando il DNA estratto dall’olio attraverso la genotipizzazione con marcatori molecolari è stato discusso da molti autori (Busconi *et al.*, 2003; Breton *et al.*, 2004; Pafundo *et al.*, 2005; Testolin *et al.*, 2005; Pafundo *et al.*, 2007; Pasqualone *et al.*, 2007; Consolandi *et al.*, 2008).

Nel lavoro svolto è stata presentata un’analisi di applicabilità dell’intero processo analitico con marcatori molecolari microsatelliti sul DNA dell’olio di oliva, dalla estrazione alla sua genotipizzazione. L’analisi di genotipizzazione con marcatori molecolari risente di diversi fattori

*i)* il basso livello del DNA nell'olio *ii)* la presenza di inibitori di PCR *iii)* la presenza di bande di "stutter" e di "bande fantasma" che possono rendere l'interpretazione degli elettroferogrammi e la successiva individuazione e corretta interpretazione degli alleli molto difficoltosa.

Alla luce di queste considerazioni sono stati valutati numerosi parametri per verificare la metodica e le sue potenzialità per la tracciabilità dell'olio di oliva. L'approccio usato è stato quello di analizzare un numero eterogeneo di campioni di olio di oliva monovarietales con una particolare attenzione al risvolto applicativo, cercando di ottimizzare le fasi estrattive del DNA in modo da poter operare direttamente sulla fase liquida dei campioni di olio.

Per poter quindi realizzare una corretta genotipizzazione si sono rese necessarie diverse repliche, sia per le estrazioni che per le amplificazioni in PCR, infatti la probabilità di estrarre e amplificare lo specifico frammento diminuisce drasticamente in condizioni di basse quantità di DNA e aumentano invece le possibilità di ottenere prodotti aspecifici e falsi positivi. I microsatelliti utilizzati sono stati selezionati tra quelli presenti in letteratura e normalmente impiegati per le analisi varietali su olivo, non tutti questi microsatelliti vengono però amplificati efficacemente sul DNA estratto dall'olio di oliva. Per questo è stata valutata l'efficienza di ogni marcatore microsatellite sia nella genotipizzazione delle cultivar di olivo di riferimento che parallelamente anche sui rispettivi oli al fine di poter selezionare i marcatori migliori.

I risultati hanno evidenziato che esistono differenze significative nell'amplificabilità dei microsatelliti. Queste differenze esistono anche a livello di oli analizzati, ad esempio dall'olio Taggiasca è risultato relativamente facile estrarre il DNA in buone quantità e amplificarlo in PCR, mentre da altri campioni di olio risulta molto più difficile. Questo problema è da individuare in una possibile inibizione della reazione di amplificazione dovuta al contenuto in polifenoli dell'olio. Anche la corrispondenza allelica tra olio e foglia di riferimento varia notevolmente sia in funzione del marcatore microsatellite che del tipo di olio di oliva analizzato. Generalmente quando la cultivar di origine presenta due alleli, un solo allele viene recuperato e individuato nell'olio, solo in rari casi vengono identificati entrambi.

### **Analisi del contributo dell'impollinatore**

La possibilità di determinare l'origine varietale di un olio di oliva deriva dal fatto che viene prodotto dal pericarpo della drupa, che origina dai tessuti della pianta madre ed è quindi geneticamente uguale ad essa. Tuttavia, durante la spremitura delle olive è possibile che il materiale genetico paterno contenuto nel seme vada a contaminare l'olio proveniente dal frutto.

Questo può complicare notevolmente le analisi, in quanto nell'olivo il seme deriva da fecondazione incrociata, in cui il polline viene fornito da una varietà diversa da quella della pianta madre, che deriva invece dall'impollinatore (contributo paterno). Questo aspetto è stato

discusso da vari autori: Doveri *et al.*, (2006) riportano una nota cautelativa nell'uso dei marcatori microsatelliti, sottolineando la possibilità di avere un evidente contributo allelico dell'impollinatore, mentre Mazzalupo *et al.*, (2007) riportano come attraverso l'analisi degli elettroferogrammi non risultino differenze tra i profili microsatelliti tra oli denocciolati e non con le rispettive cultivar di riferimento.

In questo lavoro sono stati confrontati i profili allelici ottenuti con marcatori microsatelliti su DNA estratto sia da oli denocciolati che non denocciolati. Non sono state riscontrate differenze significative tra i profili allelici dei due tipi di oli, ad eccezione del campione di olio Coratina, in cui è stato evidenziato un allele additivo tra olio denocciolato e non. In accordo con quanto riportato da Mazzalupo *et al.*, (2007) anche nello studio realizzato in questa ricerca il contributo degli alleli dell'impollinatore risulta piuttosto modesto.

### **Risultati dell'analisi con marcatori mini-microsatelliti**

In condizioni di DNA presente in basse quantità e altamente degradato, la dimensione dell'amplificato ottenibile attraverso PCR può essere un fattore determinante per il successo della stessa (Butler *et al.*, 2003). La correlazione tra la dimensione dell'amplicone e il successo della amplificazione su campioni di DNA altamente degradato è stata evidenziata in molte pubblicazioni (Whitaker *et al.*, 1995; Sparkers *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 2004). Anche in questo lavoro, come riportato nel rispettivo paragrafo, abbiamo evidenziato che negli oli adulteranti, solo frammenti di DNA con dimensioni inferiori ad una certa soglia sono amplificati con successo. I marcatori microsatelliti attualmente disponibili in letteratura presentano dimensioni variabili e non sempre si sono rilevati ottimali per l'analisi in PCR su DNA altamente processato.

L'approccio mini-SSR si basa sulla possibilità, avendo a disposizione la sequenza di interesse, di poter ridisegnare i primer in modo da avvicinarli alla regione ripetuta del microsatellite, mantenendo il suo carattere informativo ma allo stesso tempo riducendo la dimensione dell'amplicone atteso in PCR. Nel lavoro svolto cinque marcatori mini-SSR sono stati confrontati con i rispettivi marcatori delle dimensioni originali per valutare la loro applicabilità al DNA estratto dall'olio. Dall'analisi dei parametri valutati è emerso un miglioramento, seppur non totale, dell'efficienza di amplificazione e della corrispondenza allelica con la cultivar di riferimento dell'olio, sia in funzione del marcatore microsatellite utilizzato che dell'olio di oliva. L'approccio con mini-SSR, abbinato all'utilizzo di marcatori microsatelliti tri, tetra e penta-nucleotidici, in grado di dare un segnale di "stutter" minore rispetto ai marcatori dinucleotidici usati in questo studio, potrà portare ad un incremento nella tecnica di identificazione varietale in olio di oliva.



## **Analisi varietale in Real-Time PCR con marcatori molecolari SNP**

I marcatori SNP presentano il vantaggio di richiedere l'amplificazione di frammenti di DNA di basso peso molecolare e questo li rende particolarmente efficaci per genotipizzare campioni di DNA anche altamente degradato. Gli SNP trovano anche vaste applicazioni in analisi di genetica di popolazioni o genetica funzionale su differenti tipi di piante.

L'analisi di Real-Time PCR ha confermato la validità del metodo di estrazione selezionato per l'olio di oliva. Lo sviluppo di un pannello di più sonde e il parallelo aumento del numero di polimorfismi genotipizzati porterà ad uno sviluppo maggiore delle applicazioni di questa metodologia per scopi di tracciabilità molecolare.

In questo lavoro abbiamo valutato in Real-Time PCR la possibilità di utilizzare i marcatori molecolari SNP per quantificare le cultivar presenti in un olio di oliva. Poiché gli SNP sono mutazioni puntiformi, inizialmente è necessario valutare se è possibile disegnare sonde specifiche in grado di distinguere le due mutazioni. Sono state disegnate due sonde su uno SNP identificato nella sequenza genica dell'oleosina e polimorfico nelle cultivar di olivo Leccino (CC), Nocellara del Bellice (CT) e Biancollila (TT).

L'analisi condotta inizialmente sul DNA estratto da foglie di queste cultivar ha evidenziato come queste sonde fossero specifiche e selettive, quindi in grado di distinguere le cultivar di olivo in una miscela del loro DNA. La valutazione è stata poi estesa a miscele di olio di oliva preparate con olio prodotto da olive della cultivar Leccino (CC) e Biancolilla (TT), mescolate in varie percentuali. L'andamento dei cicli soglia per le varie cultivar, rispecchiava la relativa quantità nelle miscele anche se in modo non perfettamente lineare. È stato evidenziato anche come il genotipo CC, venisse amplificato, nelle reazioni duplex preferenzialmente, probabilmente per una stabilità maggiore del legame tra sonda e DNA bersaglio.

Queste analisi preliminari, hanno evidenziato la possibilità di poter individuare e quantificare, mediante Real-Time PCR le cultivar di olio presenti in una miscela di olio multivarietale, tuttavia l'analisi deve essere ancora ulteriormente implementata e ottimizzata.

## **Conclusioni e prospettive future**

La sicurezza alimentare, è un pre-requisito che da sempre interessa ogni categoria e tipo di alimento, senza nessuna deroga o eccezione. Le aziende dal 2005, secondo il regolamento CE n. 178/2002 devono essere dotate di sistemi atti a consentire la tracciabilità dei beni agroalimentari prodotti e immessi sul mercato; l'obiettivo ultimo è la possibilità di localizzare il prodotto in qualsiasi punto della catena di distribuzione e di individuare l'origine della materia prima utilizzata. Il mercato sempre più in espansione 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 quindi il consumatore da possibili frodi.

Nasce quindi 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.

In un olio tipico il disciplinare identifica con chiarezza la cultivar di origine del prodotto, e per questo esiste un Elenco Ufficiale delle Cultivar Italiane (D.M. n. 573 del 4-11-1973; Tabella I, e successive integrazioni, "Elenco delle varietà di olive ufficialmente iscritte nello schedario oleicolo italiano"). L'analisi del DNA delle cultivar di olivo, diverrebbe quindi un elemento di valutazione inoppugnabile finalizzato alla classificazione degli oli in base alla cultivar di appartenenza.

Le analisi di tipo chimico sono ormai in grado di caratterizzare tutti i parametri qualitativi dell'olio, dalla composizione in acidi grassi alla composizione in triacilgliceroli, dalla presenza di steroli alla identificazione chimica generale di tutte le frazioni. Tali metodiche analitiche si rivelano non del tutto utili ai fini della determinazione varietale; una identificazione delle varietà attraverso le loro caratteristiche morfologiche può essere soggetta ad errore in quanto le caratteristiche fenotipiche sono influenzate a diversi livelli dall'ambiente.

L'uso di marcatori molecolari, basati sull'analisi del DNA, sia per il loro notevole potenziale di discriminazione fra genotipi, sia per la loro "neutralità" rispetto alle condizioni ambientali, si delinea come l'unica metodologia che permetta una'analisi attendibile.

Tracciando un bilancio del lavoro svolto in questa tesi di ricerca, possiamo definire un percorso che ha permesso di sviluppare e convalidare un metodo di estrazione del DNA sia dall'olio che dall'olio di semi. Il metodo selezionato è stato quindi valutato in termini di resa di estrazione, di costi e tempi e di applicabilità. L'approccio molecolare è stato applicato con successo nella identificazione qualitativa di tracce di olio di nocciola, mais e girasole in miscele di olio di oliva a diverse percentuali. L'individuazione di ampliconi specifici per le diverse specie si è rivelato un utile approccio per sviluppare una analisi Real-Time PCR veloce e di facile applicazione.

Questa metodica è stata trasferita con successo in elettroforesi capillare abbinando alla rivelazione in fluorescenza la dimensione dell'amplicone prodotto, questo ha permesso di avere la conferma della corrispondenza tra l'amplicone ottenuto amplificando il DNA estratto dall'olio e quello dei rispettivi controlli positivi. Un ulteriore sviluppo di questa metodologia consentirà di aumentare il livello di "multiplexing" della reazione di PCR e quindi dell'analisi per l'identificazione di eventuali adulterazioni.

L'approccio basato sui marcatori molecolari per la determinazione qualitativa e quantitativa delle cultivar di origine con cui è stato prodotto un olio, è stato analizzato utilizzando marcatori molecolari microsatelliti, sia nucleari che cloroplastici e SNP.

I marcatori microsatelliti sono stati testati su un elevato numero di campioni di olio monovarietali, valutando l'efficienza di amplificazione, il livello di corrispondenza con gli alleli trovati nelle rispettive cultivar di riferimento, la riproducibilità su diverse estrazioni. Questa analisi ha permesso di classificare i microsatelliti in modo da poter identificare quelli più adatti alle analisi molecolari del DNA estratto dall'olio di oliva. È stata valutata la possibilità di implementare la metodica di genotipizzazione con marcatori mini microsatelliti, utilizzando primer disegnati sulle sequenze di cinque microsatelliti riducendo le dimensioni degli ampliconi, ampliando quindi le possibilità di identificare la varietà di olivo impiegata per produrre un olio di oliva e ottimizzandola per operare su un DNA altamente degradato, processato e presente in basse quantità.

I marcatori SNP sono stati impiegati per allestire e ottimizzare una analisi quantitativa in Real-Time PCR che ha permesso, grazie allo sviluppo di sonde specifiche per sequenze peculiari di olivo di individuare e discriminare una cultivar rispetto ad un'altra. La tecnica è stata applicata a DNA estratto da olio ed è emerso che la reazione di amplificazione è possibile e risulta essere selettiva, anche se su miscele di olio di oliva l'identificazione dei singoli genotipi delle cultivar di origine è ancora difficoltosa, a causa anche della mancata proporzionalità tra percentuale di olio presente nella miscela e la sua relativa identificazione con la specifica sonda.

In conclusione, l'approccio molecolare per identificare specie adulteranti e distinguere le varietà di olivo presenti in un olio potrà offrire un mezzo pratico e veloce da applicare nella vigilanza contro possibili frodi riguardanti l'adulterazione dell'olio di oliva o l'etichettatura ingannevole, nel pieno rispetto delle norme nazionali ed europee.

## **Sigle e abbreviazioni**

AFLP: amplified fragments length polymorphisms

BSA: Bovine serum albumin

CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

C<sub>T</sub>: Treshold Cycle (ciclo soglia)

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

HRGC High Resolution Gas Chromatography.

IGP: Indicazione Geografica Protetta

NFQ-MGB: Non Fluorescence Quencher-Minor Group Binding

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

U: Unità

## **Ringraziamenti**

Vorrei ringraziare il Professore Nelson Marmioli, coordinatore del mio Dottorato di Ricerca e mio docente guida, per l'opportunità che mi ha offerto e per avermi indirizzato e sostenuto durante questi anni. Vorrei inoltre ringraziare la Dott.ssa Caterina Agrimonti per la pazienza, la costanza e la dedizione con cui ha seguito il mio lavoro, Urbana Bonas per l'insostituibile aiuto e la Professoressa Elena Maestri per la disponibilità.

Il mio lavoro è stato realizzato grazie al contributo dei seguenti progetti di ricerca:

- Traceability of origin and authenticity of olive oil by combined genomic and metabolomic approaches (OLIV-TRACK)", QLK1-CT-2002-02386, progetto della Comunità Europea, programma specifico RTD "Quality of Life and Management of Living Resources", coordinato dal Prof. Marmioli;
- Programma speciale del Ministero Italiano dell'Università e della Ricerca PRIN "Rintracciabilità della composizione e dell'origine di oli d'oliva DOP, IGP e 100% Italiani attraverso metodiche genomiche, proteomiche e metabolomiche", coordinato dal Prof. Marmioli;
- Progetto SIQUAL all'interno del research framework PRRIITT, Misura 3.4.A della Region Emilia Romagna (IT);
- FIL 2005, 2006, 2007 Contributo dell'Università di Parma, Prof. Nelson Marmioli;
- CE Framework VI, Food Quality and Safety: dal 2007 "Integrated System for a Reliable Traceability of Food Supply Chains" (TRACEBACK);
- CE Framework VI, Food Quality and Safety: dal 2005 "GM and non-GM supply chains: their CO-Existence and TRAcability" (CO-EXTRA);
- CE Framework VI, Food Quality and Safety: dal 2006 "Developing and integrating novel technologies to improve safety, transparency and quality assurance of the chilled/frozen food supply chain– test case fish and poultry " (CHILL-ON).

Un particolare grazie al Prof. Tiziano Caruso (Department of Arboreal Culture, University of Palermo, Italy), alla Dott.ssa Luciana Baldoni (Institute of Plant Genetics, CNR Perugia, Italy) e al Prof. Maurizio Servili (Department of Food Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy), per il loro supporto critico e scientifico. Un sentito ringraziamento va anche al Sig. Bazzà Giuseppe (Azienda Agricola *Il Posticcio*, Lusuolo di Mulazzo, Massa-Carrara) e al Sig. Stefano Leoni (Azienda Agricola *Colle Morgante*, San Gregorio da Sassola, Roma) per aver fornito campioni di olio di oliva monovarietale.

Desidero inoltre ringraziare tutte le persone che lavorano e che hanno lavorato nei laboratori in cui ho svolto il mio dottorato: Mariolina Gullì, Marta Marmioli, Aliosha Malcevski, Giovanna

Visioli, Chiara Rustichelli, Manuela Turci, Cristina Samson, Claudia Pellacani, Daniel Campioli, Irene Della Ghezza, Francesca Merangolo, Maria Luisa Savosardaro, Davide Imperiale, Valerio dell'Orletta, Giovanna Palumbo, Sara Graziano, Davide Tondini, Hannah Bauer e Maria Tausenfreud. Uno speciale grazie per gli anni passati assieme a: Andrea Pirondini, Simona Pafundo, Elisa Trivelloni e Damiano Loi.

Ringrazio infine la mia famiglia per il grande sostegno, in ogni senso, che mi ha dato in questi anni per arrivare alla fine di questo percorso.

*... " Non maledire il buio... piuttosto accendi una candela" ...*

---

**Bibliografía**

**Abravaya K., Huff J., Marshall R., Merchant B., Mullen C., Schneider G., Robinson J.** (2003) Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**: 468-474.

**Adler M., Wacker R., Niemeyer C.M.** (2003) A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 240-250.

**Aguado V., Vitas A.I., García-Jalon' I.** (2001) Random amplified polymorphic DNA typing applied to the study of crosscontamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. *J Food Prot.* **64**: 716-720.

**Aida Azmi A., Man Yaakob B., Che R., Abdul R., Son Radu.** (2007) Detection of pig derivatives in food products for halal authentication by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 569-572.

**Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L.** (1999) Olive genetic assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 411-421.

**Arora A., Kaur H., Wengel J., Maiti S.** (2008) Effect of locked nucleic acid (LNA) modification on hybridization kinetics of DNA duplex. *Nucleic Acids* **52**: 417-418.

**Asensio L., González I., Fernández A., Céspedes A., Rodríguez M.A., Hernández P.E., García T., Martín R.** (2001) Identification of Nile perch (*Lates niloticus*) grouper (*Epinephelus guaza*) and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *JAOAC Int.* **84**: 777-781.

**Asensio L., González I., Fernández A., Rodríguez M.A., Lobo E., Hernández P.E., García T., Martín R.** (2002) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for identification of grouper (*Epinephelus guaza*) wreck fish (*Polyprion americanus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *J Food Prot.* **65**: 432-435.

**Asensio L., González I., Rodríguez M.A., Mayoral B., López-Calleja I., Hernández P.E., García T., Martín R.** (2003) Identification of grouper (*Epinephelus guaza*) wreck fish (*Polyprion americanus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets by polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent *J Agric Food Chem.* **25**: 1169-1172.

**Bania J., Ugorski M., Polanowski A., Adamczyk E.** (2001) Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *J Dairy Res.* **68**: 333-336.

**Barletta J.M., Edelman D.C., Constantine N.T.** (2004) Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol* **122**: 20-27.

**Bauer T., Weller P., Hammes W.P., Hertel C.** (2003) The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Res. and Tech.* **217**: 338-343.

**Bautista R., Crespillo F., Cánovas M., Claros G.** (2002) Identification of olive tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica* **129**: 33-41.

- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R Rallo L., Trujillo I.** (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor Appl Genet.* **4**: 736-44.
- Bennett C.D., Campbell M.N., Cook C.J., Eyre D.J., Nay L.M., Nielsen D.R., Rasmussen R.P., Bernard P.S.** (2003) The LightTyper: high-throughput genotyping using fluorescent melting curve analysis. *Biotechniques* **34**: 1288-1292.
- Besnard G., Bervillè A.** (2000) Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Life Sciences* **323**: 173-181.
- Besnard G., Breton C., Baradat P., Khadari B., Bervillè A.** (2000) Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* **100**: 1018-1024.
- Bille R., Wingrove M., Holland C., Holland C., Cave J., Schumm J. and The Staff of The Bode Technology Group** (2001) Novel method of DNA extraction from bones assisted DNA identification of World Trade Center victims. *Progress in Forensic Genetics* **1261**: 553-555
- Björklund M.** (2005) A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop-out. *Molecular Ecology Notes* **3**: 676-679.
- Bottero M. T., Civera T. D., Nucera S., Rosati P., Sacchi R. M., Turia A.** (2003) multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows' goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* **13**: 277-282.
- Branciari R., Nijman I.J., Plas M.E., Di Antonio E., Lenstra J.A.** (2000) Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *J. Food Prot.* **63**: 408-411.
- Brennan R.,E., Samuel J.,E.,** (2003) Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* **41**: 1869-1874.
- Breton C., Calux D., Metton I., Skorski G., Bervillè A.** (2004) Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil sample to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 531-537.
- Burger H., Foekens J.,A., Look M.,P., Meijer-van Gelder M.,E., Klijn J.,G., Wiemer E.,A., Stoter G., Nooter K.** (2003) RNA expression of breast cancer resistance protein lung resistance-related protein multidrug resistance-associated proteins 1 and 2 and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* **9**: 827-836.
- 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.
- Butler J.M., Shen Y., McCord B.R.** (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* **48**: 1054-1064.
- Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Fernández A., Hernández P.E., Martín R.** (1999) Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem.* **47**: 1046-1050.



- Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Fernández A., Hernández P.E., Martín R.** (1999) Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem.* **47**: 1046-1050.
- Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Sanz B., Hernández P.E., Martín R.** (1998) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a short fragment of the cytochrome b gene for identification of flatfish species. *J Food Prot.* **12**: 1684-1685.
- Chapela M. J., Carmen G., Ricardo I., Pérez-Martín R.** (2003) Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment. *European Food Research and Technology* **217**: 524-529.
- Che Man Y.B., Aida A.A., Raha A.R., Son R.** (2007)
- Chiapparono E., Lee D., Donini P.** (2004) Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* **47**: 414-420.
- Christensen N.K., Bryld T., Sørensen M.D., Arar K., Wengel J., Nielsen P.** (2004) Parallel nucleic acid recognition by the LNA (locked nucleic acid) stereoisomers beta-L-LNA and alpha-D-LNA studies in the mirror image world. *Chem Commun* **3**: 282-283.
- Clark A.G.** (1990) Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Molecular Biology and Evolution* **7**: 111-122.
- Codex Alimentarius Commission** (2006) Draft revised standard for gluten-free foods. Report of the 28th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses (ALINORM 07/30/26). Joint FAO/WHO Food Standards Programme Rome.
- Consiglio oleicolo internazionale** (1987) *Olio di oliva e salute atti del congresso.*
- Consolandi C., Palmieri L., Doveri S., Maestri E., Marmiroli N., Reale S., Lee D., Baldoni L., Tosti N., Severgnini M., De Bellis G., Castiglioni B.** (2007) Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format. *J. Biotechnol.* **129**: 565-574.
- Consolandi C., Palmieri L., Severgnini M., Maestri E., Marmiroli N., Baldoni L., Donini P., De Bellis G., Castiglioni B.** (2008) A procedure for Olive Oil Traceability and Authenticity: DNA extraction Multiplex PCR and LDR-Universal Array Analysis. *Eur. Food Res. Technol.* DOI 10.1007.
- Cooper A., Poinar H.N.** (2000) Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science* **289**: 1139.
- Dahinden I., Büren M., Lüthy J.** (2001) A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *Eur Food Res Technol* **212**: 228-233.
- De La Rosa R., James C.M., Tobutt K.R.** (2002) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Mol. Ecol. Notes* **2**: 265-267.

**Donohoe G., Laaksonen M., Pulkki K., Ronnema T., Kairisto V.** (2000) Rapid single-tube screening of the C282Y hemochromatosis mutation by real-time multiplex allele-specific PCR without fluorescent probes. *Clin Chem* **46**: 1540-1547.

**Dooley J.J., Helen D., Sage Marie-Anne L., Clarke Helen M., Stephen D.** (2005) 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. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3348-3357.

**Doyle J.J., and Doyle J.L.** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12** 13-15.

**Fabbri A., Hormaza J., Polito V.** (1995). Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europea*) Cultivars. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* **120**: 538-542.

**Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martínez M., Rojas T., García P., Hernández P. E. and Martínez R.** (2007) 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. *Meat Science* **76**: 644-652.

**Federazione Italiana dell'Industria Alimentare** Posizioni dell'industria Alimentare Italiana (2004). *Federalimentare*.

**Fernández A., García T., Asensio L., Rodríguez M.A., González I., Céspedes A., Hernández P.E., Martín R.** (2000) Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (Grooved carpet shell) *Venerupis pullastra* (Pullet carpet shell) and *Ruditapes philippinarum* (Japanese carpet shell) by PCR-RFLP. *J Agric Food Chem.* **48**: 3336-3341.

**Fernandez A., García T., Gonzalez I., Asensio L., Rodriguez M.A., Hernández P.E., Martín R.** (2002) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment for authentication of four clam species. *J Food Prot.* **65**: 692-695.

**Ferreira I.M., Caçote H.** (2003) 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. *J Chromatogr A.* **1015**: 111-118.

**Fukushima H., Tsunomori Y., Seki R.** (2003) Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays For Detection Of 17 Species Of Food Or Waterborne Pathogens in Stools. *J of Clin Microb.* **9**: 5134-5146.

**Geese W.J., Achanzar W., Rubin C., Hariharan N., Cheng P., Tomlinson L., Ordway N., Dracopoli N.C., Delmonte T., Hui L., Krishnan B., Cosma G., Ranade K.** (2008) Genetic and gene expression studies implicate renin and endothelin-1 in edema caused by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Pharmacogenet Genomics.* **18**: 903-910.

**Gentile A., Quarta R.** (2003) Miglioramento genetico del pesce mediante biotecnologie e biologia molecolare: stato dell'arte. *Atti IV Convegno Nazionale sulla Peschicoltura Meridionale*.

**Germini A., Scaravelli E., Lesignoli F., Sforza S., Corradini R., Marchelli R.** (2005) Polymerase chain reaction coupled with peptide nucleic acid high-performance liquid chromatography for the sensitive detection of traces of potentially allergenic hazelnut in foodstuffs. *Eur Food Res Technol.* **220**: 619-624.

- Gibson G., Spencer V.** (2002) *Introduzione alla genomica Cap., 5* pp. 223-271 Zanichelli.
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., & Mathieu C.** (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods Mol Biol.* **25**: 386-401.
- Guerin M., Sedgley J.** Cross-pollination in Olive Cultivars (2007) Rural Industries Research and Development Corporation. *RIRDC Publication No 07/169 RIRDC Project No UA-65A.*
- Hartshorn C., Rice J.E., Wangh L.J.** (2002) Developmentally-regulated changes of Xist RNA levels in single preimplantation mouse embryos as revealed by quantitative real-time PCR. *Mol Reprod Dev* **61**: 425-436.
- Hayashi N., Imamura Y., Hiyoshi Y., Takamori H., Beppu T., Hirota M., Baba H.** (2008) Rapid genotyping of tumor necrosis factor alpha with fluorogenic hybridization probes on the LightCyclertrade mark. *Clin Exp Med.* PMID: 18815866.
- Haza Ana I., Morales P., Martín R., García T., Anguita G., Sanz B., Hernández P.E.** (1999) Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**: 1043-1047.
- Hellebrand M., Nagy M., Mörsel J.T.** (1998) Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Z. Lebensm. Unters. Forsh. A.* **206**: 237-242.
- Holland M.M., Parsons T.J.** (1999) Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev.* **11**: 21-50.
- Hoffman J.I., Amos W.** (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches common sources and consequences for paternal exclusion. *Mol Ecol.* **14**: 599-612.
- Hold GL., Russell VJ., Pryde SE., Rehbein H., Quinteiro J., Vidal R., Rey-Mendez M., Sotelo CG., Pérez-Martin RI., Santos AT., Rosa C.** (2001) Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *J Agric Food Chem.* **49**: 1175-1179.
- Hold G.L.** (2001) Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *J. Agric. Food. Chem.* **49**: 1175-1179.
- Holzhauser T., Stephan O., Vieths S.** (2002) Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *J Agric Food Chem.* **50**: 5808-5815.
- Holzhauser T., Stephan O., Vieths S.** (2002) Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *J Agric Food Chem.* **50**: 5808-5815.
- Irina A., Afonina S., Walburger D. and Belousov Y. S.** (2002). Accurate SNP Typing by Real-Time PCR. A Comparison of Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes. *Pharma Genomics.*

- Jin Q., Waters D., Cordeiro G.M., Henry R.J., Reinke R.F.** (2003) A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Sci.* **165**: 395-364.
- Katoh H., Ohya K., Fukushi H.** (2008) Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds. *J Virol Methods.* PMID: 18824037
- Kaur H., Arora A., Wengel J., Maiti S.** (2008) Thermodynamic counterion and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid (LNA) nucleotides in duplex. *Nucleic Acids Symp* **52**: 425-426.
- Kaw C.H., Hefle S.L., Taylor S.L.** (2008) Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Lupine Residues in Foods. *J Food Sci.* **73**: 135-140.
- Kibbe WA.** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. (2007) *Nucleic Acids Res.* **25**: 35.
- Kobayashi N., Horikoshi T., Katsuyama H., Handa T., and Takayamahi K. A.** (1998) Simple and efficient DNA extraction method for plants especially woody plants *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* **4**: 76-80.
- Lahiff S., Glennon M. O., Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M., Shilton N.** (2001) Species-specific PCR for the identification of ovine porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM). *Mol Cell Probes.* **15**: 27-35.
- Lasagna E., Sarti F., Sorbolini S., De Martino F., Panella F.** (2005) Estrazione di DNA genomico da differenti fonti tissutali animali per la costituzione di una banca del genoma della razza chinina. *4th World Italian Beef Cattle Congress, Italy.*
- Latorra D., Arar K., Hurley J.M.** (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes.* **17**: 253-259.
- Laube I.A., Spiegelberg A., Butschke J., Zagon M., Schauzu L., Kroh H., Broll I.** (2003) Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction *International Journal of Food Science & Technology* **38**: 111-118.
- Lee L.G., Connell C.R., Bloch W.** (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **16**: 3761-3766.
- Leruez-Ville M., Minard V., Lacaille F., Buzyn A., Abachin E., Blanche S., Freymuth F., Rouzioux C.** (2004). Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis.* **38**: 45-52.
- Lipkin E., Shalom A., Khatib H., Soller M., Friedmann A.** (1993) Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *J Dairy Sci.* **76**: 2025-2032.
- Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K.** (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Mol Biol.* **4**: 357-362.

**Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W. and Deetz K.** (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Mol Biol.* **4**: 357-362.

**Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J. and Mullah K.B.** (1999) Hybridization assay using self-quenching fluorescence probe. *Applied Biosystems United States patent* 5 876 930.

**Livak K.J., Marmaro J. and Todd J.A.** (1995) Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat. Genet.* **9**: 341-342.

**Lockeley A.K., Bardsley R.G.** (2000) DNA based methods for food authentication. *Trends in Food Science & technology* **11**: 67-77.

**López-Andreo M., Garrido-Pertierra A., Puyet A.** (2006) Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples *J Agric Food Chem.* **54**: 7973-7978.

**López-Andreo M., Lugo L., Garrido-Pertierra A., Prieto M.I., Puyet A.** (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **339**: 73-82.

**López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández PE., García T., Martín R.** (2005) Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. *J Dairy Sci.* **9**: 3115-31120.

**Lopparelli RM., Cardazzo B., Balzan S., Giaccone V., Novelli E.** (2007) 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. *J Agric Food Chem.* **55**: 3429-3434.

**Lyon E.** (2001). Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Expert Rev Mol Diagn* **1**: 92-101.

**Mackay I.M.** (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* **10**: 190-212.

**Mafra I., Roxo A., Ferreira I. M. P. L. V. O., Beatriz M., Oliveira P. P.** (2004) A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal* **17**: 1132-1138.

**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.,** (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping and cloning. **21**: 700-709.

**Manzelli Paolo** (2004). Sicurezza Alimentare Relazioni tra nuove professioni ed antica cultura.

**Marmioli N., Peano C., Maestri E.** (2003). Advanced PCR techniques in identifying food components. In: Lees M (ed.) *Food authenticity and traceability*. Woodhead Publishing 3-33.

**Marmioli N., Maestri E., Pafundo S., Vietina M.** (2009) Molecular traceability of olive oil: from plant genomics to food genomics. *Advances in Olive Resources* ISBN: 978-81-7895-388-5.

- Martín I., García T., Fajardo V., López-Calleja I., Rojas M., Pavón M.A., Hernández P.E., González I., Martín R.** (2007) Technical note: detection of chicken turkey duck and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J Anim Sci.* 2007 **85**: 452-458.
- Maudet C., Taberlet P.** (2001) Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *J Dairy Res.* **68**: 229-235.
- Mayer H.K.** (2005) Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic chromatographic and PCR techniques *International Dairy Journal* **15**: 595-604.
- Mengelle C., Pasquier C., Rostaing L., Sandres-Saune K., Puel J., Berges L., Righi L., Bouquies C. & Izopet J.** (2003) Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol* **69**: 225-231.
- Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U.** (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J AOAC Int.* **78**: 1542-1551.
- Mhlanga M.M., Malmberg L.** (2001) Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods Mol Biol* **25**: 463-471.
- 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.** (1996) Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. *J Forensic Sci.* **41**: 582-590.
- Montemurro C., Pasqualone A., Simeone R., Sabetta W., Blanco A.** (2008) AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *Eur.Food Res. Technol.* **226**: 1439-1444.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Siaki R., Horn G. and Erlich H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Murray V., Monchawin C., England P.R.** (1993) The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2395-2398.
- Muzzalupo I., Perri E.** (2002) Recovery and characterisation of DNA from virgin olive.
- Nadal A., Coll A., La Paz J.L., Esteve T., Pla M.** (2006) A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events. *Electrophoresis.* **27**: 3879-3888.
- Naqvi N.I., Chatto B.B.** (1996) Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. *Genome* **39**: 26-30.
- Nielsen P.E., Egholm M.** (1999) An introduction to peptide nucleic acid. *Current Issues in Molecular Biology* **1**: 89-104.

- Niesters H.,G.** (2001). Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods Mol Biol* **25**: 419-429.
- Opel K.L., Chung D.T., Drábek J., Butler J.M., McCord B.R.** (2007) Developmental validation of reduced-size STR Miniplex primer sets. *J Forensic Sci.* **52**: 1263-1271.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Deprés V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M.** (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 645-679.
- Pafundo S., Agrimonti C., Maestri E., Marmioli N.** (2007) Applicability of SCAR markers to Food Genomics: olive oil traceability. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 6052-6059.
- Pafundo S., Agrimonti C., Marmioli N.** (2005) Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 6995-7002.
- Pafundo S., Busconi M., Agrimonti C., Fogher C., Marmioli N.** Storage-time effects on olive oil DNA assessed by Amplified Length Polymorphisms. Submitted.
- Pascoal A., Barros-Velázquez J., Cepeda A., Gallardo J.M., Calo-Mata P.** (2008) 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. *Electrophoresis.* **15**: 3220-3228.
- Pasqualone A., Montemurro C., Caponio F., Blanco A.** (2004) Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 1068-1071.
- Pasqualone A., Montemurro C., Summo C., Sabetta W., Caponio F., Blanco A.** (2007) Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of protected designation of origin extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 463-474.
- Pauli U., Liniger M., Zimmermann A.** (1998) Detection of DNA in soybean oil *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **207**: 264-267.
- Perandin F., Manca N., Calderaro A., Piccolo G., Galati L., Ricci L., Medici M.C., Arcangeletti M.C., Snounou G., Dettori G. & Chezzi C.** (2004) Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum Plasmodium vivax and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* **42**: 1214-1219.
- Perlin D.S., Zhao Y.** (2008) Molecular diagnostic platforms for detecting Aspergillus. *Med Mycol.* **12**: 1-10.
- Piknová L., Pangallo D., Kuchta T.** (2007) *Eur Food Res Technol* (in press).
- Pirisi F.M., Angioni P., Cabras V., Garau L.** (1997). Phenolic compounds in virgin olive oils olive and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry* **83**: 127-134.
- Plath A., Krause I., Einspanier R.** (1997) Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **205**: 437-441.

- Poms R.E., Anklam E., Kuhn M.** (2004) Polymerase Chain Reaction Techniques for Food Allergen Detection. *J AOAC Int.* **87**: 1391-1397
- Rafalski A.** (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology.* **5**: 94-100.
- Rafalski J.A., Vogel J.M., Morgante M., Powell W., Andre C., Tingey S.V.** (1996) Generating and using DNA markers in plants in: Biren B. Lai E. (Eds.) Nonmammalian genomic analysis. A practical guide *Academic Press* San Diego pp.75-134.
- Reale S., Campanella A., Merigioli A., Pilla F.** (2008) A novel method for species identification in milk and milk-based products. *J Dairy Res.* **75**: 107-112.
- Rego I., Martínez A., González-Tizón A., Vieites J., Leira F., Méndez J.** (2002) PCR technique for identification of mussel species. *J Agric Food Chem.* **50**: 1780-1784.
- Rehbein H., Mackie IM., Pryde S., Gonzales-Sotelo C., Perez-Martin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M.** (1998) Comparison of different methods to produce single-strand DNA for identification of canned tuna by single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis.* **19**: 1381-1384.
- Richter W., Krause I., Graf C., Sperrer I., Schwarzer C., Klostermeyer H.** (1999) 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. *Journal Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **204**: 21-26.
- Rossi S., Scaravelli E., Gremini A., Corradini R., Fogher C., Marchelli A.** (2006) A PNA-array platform for the detection of hidden allergens in foodstuffs. *Eur Food Res Technol.* **223**: 1-6.
- Russell V.J., Georgina L., Hold Susan E., Pryde., Hartmut Rehbein Javier., Quinteiro Manuel., Rey-Mendez Carmen G., Sotelo Ricardo I., Pérez-Martin Ana T., Santos and Carla Rosa.** (2000) Use of Restriction Fragment Length Polymorphism To Distinguish between Salmon Species. *J. Agric. Food Chem* **48**: 2184–2188.
- Saha B.K., Tian B., Bucy R.P.** (2001) Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe. *J Virol Methods* **93**: 33-42.
- Salvi S., D'Orso F., Morelli G.** (2008) Detection and quantification of genetically modified organisms using very short locked nucleic acid TaqMan probes. *J Agric Food Chem.* **56**: 4320-4327.
- Sandberg M., Lundberg L., Fermi M. and Malmheden Yman I.,** (2003) Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods *European Food Research and Technology* **217**: 344-349.
- Santaclara FJ., Espiñeira M., Cabado AG., Aldasoro A., Gonzalez-Lavín N., Vieites JM.** (2006) Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus Perna Aulacomya* and other genera. *J Agric Food Chem* **54**: 8461-8470.
- Scholz M.** (1998) A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extract is determined as human collagen type I. *Anal. Biochem.* **259**: 283–286.



Schneider PM., Bender K., Mayr WR., Parson W., Hoste B., Decorte R., Cordonnier J., Vanek D., Morling N., Karjalainen M., Marie-Paule Carlotti C., Sabatier M., Hohoff C., Schmitter H., Pflug W., Wenzel R., Patzelt D., Lessig R., Dobrowolski P., O'Donnell G., Garafano L., Dobosz M., De Knijff P., Mevag B., Pawlowski R., Gusmão L., Conceicao Vide M., Alonso A., García Fernández O., Sanz Nicolás P., Kihlgreen A., Bär W Meier V., Teyssier A., Coquoz R., Brandt C., Germann U., Gill P., Hallett J., Greenhalgh M. (2004) *Forensic Sci Int.* STR analysis of artificially degraded DNA-results of a collaborative European exercise. **139**: 123-34.

Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues Dos., Santos M., Laimer Da Câmara Machado M., Da Câmara Machado A. (2000) Identification of microsatellites loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and iberian olive trees. *Mol. Ecol.* **9**: 1171-1173.

Signorini G., Biagi G., Nannipieri S. (2001) Tre risposte alle sfide della sicurezza alimentare: principio di precauzione qualità rintracciabilità. *Ann. Fac. Med. Vet. Univ. Parma* **21**: 407-412.

Skurikhina L.A., Oleňnik A.G., Kovpak N.E. (2008) Mitochondrial DNA variation in Pacific capelin (*Mallotus villosus catervarius*) from the Sea of Okhotsk inferred from PCR-RFLP analysis. *Genetika.* **44**: 929-937.

Solinas A., Brown L.J., McKeen C., Mellor J.M., Nicol J., Thelwell N., Brown T. (2001) Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res.* **29**: 96-100.

Stephan O., Vieths S. (2004) Development of a Real-Time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogea*) in processed foods. *J Agric Food Chem.* **52**: 3754-3760.

Rozen S. and Skaletsky H. J. (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press Totowa NJ 365-386.

Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3189-3194.

Tan W., Wang K. and Drake T.J. (2004). Molecular beacons. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 547-553.

Teletchea F., Maudet C., Hänni C. (2005) Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* **23** (7) :359-66.

Terry C.F., Shanahan D.J., Ballam L.D., Harris N., McDowell D.G., Parkes H.C. (2002) Real-time detection of genetically modified soya using Lightcycler and ABI 7700 platforms with TaqMan Scorpion and SYBR Green I chemistries. *AOAC Int.* **85**: 938-944.

Terzi V., Morcia C., Gorrini A., Stanca M., Shewryb P.R. and Faccioli P. (2005) DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties. *Journal of Cereal Science* **41**: 213-220.

- Testolin R., Lain O.** (2005) DNA Extraction from Olive Oil and PCR Amplification of Microsatellite Markers. *J. Food Sci.* **70**: 108-112.
- Tsukada K., Takayanagi K., Asamura H., Ota M., Fukushima H.** (2002) Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01 TPOX CSF1PO and vWA loci. *Legal Med.* **2002** **4**: 239-245.
- Uhl J.R., Bell C.A., Sloan L.M., Espy M.J., Smith T.F., Rosenblatt J.E. and Cockerill. E.** (2002) Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for the detection of microbial pathogens: the Mayo-Roche Rapid Anthrax Test. *Mayo Clin Proc* **77**: 673-680.
- Unione Italiana Delle Camere Di Commercio Industria Artigianato E Agricoltura** (2003) Tracciabilità di filiera a garanzia delle produzioni agroalimentari.
- Van Bragt P.H.** Molecular Biological Techniques in vitro DNA manipulation including PCR and in situ hybridization. International Post Graduate Course. Porto 5-12 July 1996.
- Van Dijk J.P., Heuver L.H., van der Reijden B.A., Raymakers R.A., de Witte T. and Jansen J.H.** (2002) A novel essential control for clonality analysis with human androgen receptor genepolymerase chain reaction. *Am J Pathol* **161**: 807-812.
- Veloso A.C., Teixeira N., Ferreira I.M.** (2003) Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *J Chromatogr A.* **23**: 209-218.
- Vet J.A. and Marras S.A.** (2005) Design and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays. *Methods Mol Biol* **288**: 273-290.
- Vietina M., Agrimonti C., Bonas U., Marmioli N.** (2008) Application of SSR markers to the traceability of monovarietal olive oils. *Submitted* .
- Vietina M.** (2005) Tracciabilità della autenticità e della composizione varietale in olio di oliva mediante l'impiego di metodologie molecolari basate sulla Real-Time PCR. *Tesi di Laurea Specialistica in Biotecnologie Industriali. Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Parma.*
- 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.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid. Res.* **23**: 4407-4414.
- Waterfall C.M. and Cobb B.D.** (2002) SNP genotyping using single-tube fluorescent bidirectional PCR. *Biotechniques* **33**: 80-86.
- Watzinger F., Suda M., Preuner S., Baumgartinger R., Ebner K., Baskova L., Niesters H.G., Lawitschka A. and Lion T.** (2004) Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5189-5198.
- Weder JK.** (2002) Identification of plant food raw material by RAPD-PCR: legumes. *J Agric Food Chem.* **50**: 4456-4463.

**Whitaker J.P.T.M., Clayton A.J. Urquhart E.S., Millican T.J., Downes C., Kimpton. P., Gill P.** (1995) Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples *BioTechniques* **18**: 670-677.

**Wiegand P. and Kleiber M.** (2001) Less is more-length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int. J. Legal Med.* **114**: 285–287.

**Wiesman Z., Avidan N., Lavee S., Quebedeaux B.** (1998) Molecular characterization of common olive varieties in Israel and West Bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **123**: 837-841.

**Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.* **18**: 6531-6535.

**Wilson I.G.** (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3741–375.

**Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G. and Pryor R.J.** (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* **49**: 853-860.

**Woolfe M., Promise W.** Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. (2004) *Trends in biotechnology* **22**: 123-127.

**Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum J.** (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acid Res.* **31**: e103.