

Innovazioni genetiche per l'identificazione e la protezione di prodotti tipici italiani

Rosa Rao^{*1}, Martina Caramante¹, Antonio Blanco², Sergio Lanteri³,
Margherita Lucchin⁴, Andrea Mazzucato⁵

¹Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali,
Università di Napoli 'Federico II', Via Università 100, 80055 Portici (NA)

²Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-forestale ed Ambientale, Università di Bari,
Via Amendola 165/A, 70126 Bari

³Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali – Settore di Genetica Agraria,
Università di Torino, Via L. Da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO)

⁴Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali, Università di Padova, Agripolis,
Viale Università 16, 35020 Legnaro (PD)

⁵Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo

Società Italiana di Genetica Agraria

Riassunto

Le produzioni agricole tradizionali italiane, caratterizzate da una ricca diversità genetica, possono incrementare la competitività del comparto agricolo mediante l'ottenimento di marchi di qualità da parte della Unione Europea. La protezione dei marchi di qualità richiede strumenti appropriati per l'accertamento dell'identità genetica dei materiali vegetali pregiati sia in campo che nelle rispettive filiere agro-alimentari. Il *fingerprinting* del DNA rappresenta un eccellente metodo di identificazione di cultivars ed accessioni di specie erbacee ed arboree e, quando basato su profili allelici di specifici marcatori quali gli SSR, può tracciare ed autenticare le materie prime nelle filiere agroalimentari. Vengono descritti esempi di caratterizzazione della diversità molecolare ed identificazione varietale di specie erbacee ed arboree mediante i profili SSR, AFLP e (GATA)₄. Vengono, inoltre, descritti esempi di tracciabilità genetica dei materiali vegetali delle filiere olivo, melo, frumento duro e pomodoro.

Parole chiave: diversità molecolare, filiere agro-alimentari, identificazione varietale, SSRs, tracciabilità.

Summary

NEW GENETIC TOOLS TO IDENTIFY AND PROTECT TYPICAL ITALIAN PRODUCTS

During last decades the use of local varieties was strongly reduced due to introduction of modern cultivars characterized by higher yield, and breed for different traits of agronomic value. However, these cultivars not always have the quality aspects that was found in old traditional and typical crops also depending from the know-how of traditional cultivation. Nowadays the practise of intensive agriculture select only a small number of species and varieties with a consequent reduction of the diversity in agro-ecosystems and risk of loss of important alleles characterizing genetic materials adapted to specific environments. The creation of quality marks of the European Union proved to be a successful system to protect typical products through the Denomination of Origins (PDO- Protected Denomination of Origin and PGI- Protected Geographical Indication). However, the protection of quality needs efficient instruments to discriminate DOP or IGP varieties in the field and to trace them along the agro-food chain. DNA fingerprinting represents an excellent system to discriminate herbaceous and tree species as well as to quantify the amount of genetic variability present in germplasm collections. The paper describes several examples in which AFLPs, SSRs and minisatellite markers were successfully used to identify tomato, artichoke, grape, apple and walnut varieties proving to be effective in discriminating also closely related genetic material. DNA fingerprinting based on SSR is also a powerful tool to trace and authenticate row plant materials in agro-food chains. The paper describes examples of varieties traceability in the food chains durum wheat, olive, apple and tomato pursued through the identification of SSR allelic profiles obtained from DNA isolated from complex highly processed food, such as bread, olive oil, apple pureè and nectar and peeled tomato.

Key-words: agro-food chains, molecular diversity, SSRs, traceability, variety identification.

* Autore corrispondente: tel.: +39 081 2539204; fax: +39 081 2539481. Indirizzo e-mail: rao@unina.it

Introduzione

Numerose sono le specie orto-frutticole di pregio coltivate in Italia ed esse rappresentano una importante risorsa dell'industria agro-alimentare. Le produzioni tradizionali italiane sono caratterizzate da una ricca diversità genetica talora di pregio e la competitività del comparto agricolo italiano può essere notevolmente incrementata dalla utilizzazione di queste risorse. Negli ultimi decenni, l'utilizzo di varietà locali ha sofferto un declino dovuto alla diffusione di cultivar più produttive, omogenee e migliorate per vari caratteri agronomici importanti, ma non sempre caratterizzate da pregi di qualità tipici delle varietà locali, determinati anche dal *know-how* tradizionale dei sistemi di coltivazione. L'agricoltura intensiva attualmente praticata utilizza un limitato numero di specie e varietà, con conseguente diminuzione della diversità negli agro-ecosistemi e rischio di perdita di alleli importanti presenti in materiali genetici adattati a specifiche condizioni ambientali. La creazione di marchi di qualità da parte dell'Unione Europea si è rivelata un utile strumento per proteggere la tipicità dei prodotti alimentari e rivitalizzare alcuni comparti produttivi che includono produzioni tradizionali di pregio. La Denominazione di origine protetta (DOP) estende la tutela del marchio nazionale DOC (Denominazione di origine controllata) a tutto il territorio europeo. Il marchio si riferisce ad un prodotto originario di un paese e di una regione caratterizzato da una qualità essenzialmente o esclusivamente dovuta all'areale geografico, inclusi i fattori naturali e umani che lo caratterizzano. Il marchio IGP (Indicazione geografica protetta) introduce nella tutela della qualità l'aspetto industriale della sua produzione, dando maggiore rilevanza alle tecniche di produzione rispetto al vincolo territoriale.

La tracciabilità, divenuta dal gennaio 2005 obbligatoria per tutte le aziende agro-alimentari, è definita come "la capacità di rintracciare e seguire un alimento, un mangime, un animale produttore di alimenti o una sostanza attraverso tutti gli stadi della produzione e della distribuzione" (Reg. CE 178/2002). Il perseguimento della tracciabilità così definita può essere facilitato dalla tracciabilità genetica dei materiali vegetali che sono utilizzati nelle filiere DOP o IGP. Da qui nasce l'esigenza di avvalersi di stru-

menti di valutazione sicuri, basati su approcci inter-disciplinari che includono le scienze agro-alimentari e le biotecnologie vegetali. L'analisi del DNA mediante i marcatori molecolari rappresenta un efficiente strumento di identificazione varietale che offre una maggiore affidabilità rispetto ai metodi tradizionali basati sulla valutazione di caratteri morfologici, soggetti all'influenza delle condizioni ambientali, ed utilizzabili solo sui materiali non processati. I marcatori molecolari, invece, non subiscono interferenze da parte dell'ambiente, forniscono una misura oggettiva della variabilità essendo direttamente correlati alla molecola di DNA, e sono praticamente illimitati oltre che rilevabili con sistemi automatizzati. Inoltre, il loro polimorfismo può spesso essere rilevato sul DNA estratto da matrici alimentari complesse consentendo l'identificazione genetica delle materie prime utilizzate nelle filiere agro-alimentari (Martinez et al., 2003).

Numerosi sono i marcatori utilizzati per la caratterizzazione della diversità molecolare di specie erbacee ed arboree, mentre per la tracciabilità genetica dei materiali vegetali nelle filiere agro-alimentari i marcatori che meglio si prestano allo scopo sono gli SSR (Sequenze semplici ripetute) e gli SNP (Polimorfismi a singolo nucleotide). Entrambe queste tipologie di marcatori consentono di rilevare i polimorfismi presenti anche a partire da un DNA templatato frammentato o danneggiato come spesso accade al DNA delle matrici alimentari soggette ai processi produttivi industriali. Gli SSR, marcatori di elezione per i test di paternità e studi forensi, sono tra i più utili ed affidabili marcatori molecolari del DNA in quanto possiedono elevati livelli di polimorfismo, dovuto alle variazioni del numero delle ripetizioni, sono codominanti e dispersi nel genoma; hanno il vantaggio di essere specie-specifici, essendo quindi altamente informativi e richiedono un corto DNA-stampo per l'amplificazione, un requisito cruciale per l'analisi del DNA estratto da matrici alimentari. Gli SNP, polimorfismi a singolo nucleotide generati da mutazioni puntiformi, rappresentano la forma più comune di variazioni molecolari segreganti nelle popolazioni naturali. Uno dei principali vantaggi dei marcatori SNP è che essi consentono l'analisi delle variazioni di sequenza originatesi da sostituzioni di un singolo nucleotide. Lo svantaggio di que-

sti marcatori risiede nel fatto che spesso richiedono l'utilizzo di speciali sistemi di rilevazione.

Applicazione di tecniche di analisi molecolare per la quantificazione della variabilità genetica e la discriminazione di varietà ed ecotipi

Le applicazioni della genetica molecolare avanzata trovano utilizzo nella costituzione varietale (miglioramento genetico e caratterizzazione varietale), nella produzione di sementi (controllo purezza varietale e genetica della produzione sementiera), nella valutazione della novità varietale (esame DUS per il registro e/o un titolo di tutela), nella difesa della tutela varietale (identificazione delle varietà). Di seguito vengono descritti alcuni esempi di discriminazione varietale e tracciabilità in filiere agro-alimentari mediante l'uso di differenti tipologie di marcatori del DNA .

AFLP e microsatelliti per la caratterizzazione di Cynara cardunculus L.

La specie *Cynara cardunculus* L. include il carciofo (var. *scolymus* L.), il cardo coltivato (var. *altilis* D.C.) ed il cardo selvatico [var. *sylvestris* (Lamk) Fiori]. Quest'ultimo è considerato il progenitore di entrambe le forme coltivate, che sono il risultato dell'applicazione di criteri di selezione volti ad incrementare la dimensione e produzione di capolini (carciofo) o di steli carnosì (cardo coltivato). Il carciofo rappresenta un'importante componente dell'economia agricola del Sud Europa, ma la sua coltivazione è diffusa anche in nord Africa, sud America, USA e Cina; viceversa, il cardo coltivato ha una più limitata diffusione regionale. La caratterizzazione di *landraces* reperite in orti siciliani, mediante marcatori AFLP e microsatelliti, ha evidenziato che questi materiali rappresentano forme di transizione nel processo di domesticazione della specie (Mauro et al., 2009), presumibilmente avvenuto in Sicilia. Marcatori AFLP e microsatelliti sono stati applicati per la genotipizzazione di una collezione di germoplasma di carciofo rappresentativa del materiale coltivato a livello mondiale (Lanteri et al., 2004a) e di una di collezione di cardo coltivato che include le varietà più diffuse in Italia e Spagna (Portis et al., 2005a). Mediante tali marcatori, inoltre, è stata evidenziata l'ampia variabilità genetica

presente nei tipi varietali attualmente in coltivazione (Portis et al., 2005b) ed è stato effettuato il *fingerprinting* del DNA di materiali selezionati a seguito di un programma di selezione clonale (Lanteri et al., 2004b).

Microsatelliti per la caratterizzazione del noce di Sorrento

La produzione italiana di noci si basa in buona parte sulla cultivar "Sorrento" varietà italiana di noce pregiata, diffusa soprattutto nell'areale campano, considerato "la terra italiana del noce" in quanto particolarmente idoneo alla coltivazione per condizioni climatiche e pedologiche. Storicamente il noce in Campania è stato allevato con duplice attitudine: produzione del legno e dei frutti. Nel corso degli anni, spesso piante con buone caratteristiche del legno sono state innestate con genotipi caratterizzati da elevata produzione e qualità dei frutti. Ciò ha determinato la coesistenza di entità genetiche differenti ed una marcata disomogeneità dei frutti e delle rese ottenute da piante diverse, ascritte alla stessa cultivar. Questo aspetto ha contribuito al forte decremento della produzione di noci registrato a partire dalla metà del secolo scorso. Allo scopo di contribuire ad una più corretta classificazione delle piante di noce diffuse sul territorio campano, è stata monitorata la diversità genetica di 42 piante assegnate alla cultivar "Sorrento" mediante l'analisi di 12 loci SSR (Foroni et al., 2005, 2007). I profili SSR analizzati identificano due distinte popolazioni "Sorrento" distribuite in due differenti areali Campani, penisola Sorrentina e areale Casertano, indicando una probabile differente origine dei materiali in propagazione. L'analisi SSR ha, inoltre, escluso l'appartenenza di alcune piante alla cultivar "Sorrento" rivelandosi un efficiente strumento per la discriminazione varietale in noce.

Caratterizzazione genetica di una collezione di vitigni dell'area Euganea

I vitigni autoctoni dell'area Euganea sono stati caratterizzati con lo scopo di chiarire la presenza di omonimie e sinonimie e di stabilire eventuali relazioni di parentela tra essi. La caratterizzazione varietale è stata effettuata utilizzando 30 marcatori SSR che hanno permesso di costruire le relazioni filogenetiche esistenti tra i 19 vitigni in esame (Salmaso et al., 2008).

La definizione dei profili SSR ha integrato i dati ampelografici consentendo la discriminazione di tipologie affini presenti nella collezione di germoplasma del comprensorio. La maggior parte delle cultivars considerate è risultata costituire una risorsa indipendente di variabilità genetica, anche se alcune sinonimie non sono ancora definitivamente risolte.

Marcatori molecolari per la caratterizzazione di ecotipi e varietà di S. lycopersicum

La variabilità genetica delle specie vegetali è fortemente dipendente dal sistema di riproduzione della specie, dalla sua storia di domesticazione e dalle dimensioni della collezione disponibile. Nel pomodoro, sin dai primi studi effettuati mediante marcatori molecolari, fu chiaro che il livello di variabilità genetica era significativamente inferiore a quello riscontrato in altre specie ad auto-impollinazione e ciò è la conseguenza della stretta autogamia della specie oltre che della diffusa utilizzazione di materiali comuni in programmi di incrocio e selezione. Un marcatore dall'elevato potere discriminante è confermato essere il minisatellite (GATA)₄, (Rao et al., 2006; Andreakis et al., 2004), marcatore altamente informativo, che evidenzia un profilo genetico identificativo di ogni varietà o accessione analizzata ed individua contaminazioni genetiche presenti in una stessa accessione (Caramante et al., 2009). Tra le altre classi di marcatori molecolari, gli SSR hanno mostrato elevati livelli di polimorfismo nella specie coltivata *S. lycopersicum* (Bredemeijer et al., 2002). Questi marcatori hanno inoltre il vantaggio di avere tempi di analisi inferiori a quelli richiesti dal minisatellite e di essere estendibili anche all'analisi di matrici complesse. Allo scopo di effettuare il *fingerprinting* del DNA di ecotipi e varietà tradizionali campane moltiplicate da una ditta sementiera che opera in Campania e di varietà commerciali incluse nel disciplinare di produzione integrata pomodoro da industria, anno 2007, in uso presso una ditta di trasformazione campana, sono stati selezionati 14 loci SSR particolarmente informativi della diversità intra-specifica. La discriminazione allelica è stata effettuata mediante elettroforesi capillare automatizzata su ABI Prism 3100- AVANT (Applied Biosystem). I dati ottenuti hanno mostrato che gli SSR utilizzati identificano tutti gli ecotipi e le varietà all'a-

nalisi (Rao et al., manoscritto in preparazione). Risultati simili sono stati ottenuti con il marcatore (GATA)₄. Il potere discriminante degli SSR si è rivelato simile a quello del (GATA)₄ anche per discriminare genotipi morfologicamente simili e per individuare genotipi contaminanti presenti in alcuni materiali sementieri (Caramante et al., 2009). Questi risultati indicano che, nonostante la limitata diversità genetica presente in pomodoro, il *fingerprinting* del DNA basato sugli SSR, discrimina non solo varietà differenti ma anche tipi morfologicamente simili e può quindi essere utilizzato per la protezione di materiali geneticamente pregiati.

I marcatori SSR, inoltre, offrono un importante contributo per la quantificazione della variabilità genetica in germoplasma di pomodoro. L'analisi SSR associata alla valutazione morfologica di varietà locali di pomodoro provenienti principalmente dall'Italia centrale e di varietà moderne, ha rivelato, nelle prime, una maggiore variabilità genetica rispetto a quella presente nelle cultivar moderne (Mazzucato et al., 2008).

Applicazione di biotecnologie genetiche per la tracciabilità e la rintracciabilità di materie prime in filiere agro-alimentari

Tracciabilità della filiera pomodoro

L'utilizzo dei marcatori molecolari del DNA per il controllo della filiera agro-alimentare del pomodoro ha la potenzialità di offrire una metodica sicura e rapida per l'accertamento dell'identità genetica dei materiali presenti nei vari segmenti della filiera agro-alimentare: dal prodotto fresco al prodotto finito. A tale scopo particolarmente idonei risultano quei loci SSR che, pur mantenendo un elevato potere discriminante, siano caratterizzati da alleli di dimensioni intorno a 100 bp. Infatti, prove di amplificazione di alleli SSR a partire da DNA estratto da lavorati di pomodoro (pelati, polpa, ecc.) hanno evidenziato buoni risultati solo nel caso di alleli di piccole dimensioni. Questa è la probabile conseguenza dell'elevato grado di degradazione del DNA che si estrae dal prodotto lavorato, danneggiato dai processi produttivi. I profili allelici dei loci SSR selezionati, ottenuti mediante elettroforesi capillare degli amplificati prodotti a partire da DNA estratto da foglia,

bacca e prodotto processato di una filiera mono-varietale di pomodoro pelato, hanno mostrato completa corrispondenza (Rao et al., manoscritto in preparazione) confermando che i marcatori SSR rappresentano un potente strumento per la tracciabilità genetica dei materiali nella filiera pomodoro.

Attualmente è in corso di sperimentazione l'uso di marcatori SNP per la produzione di un microarray che utilizza sonde PNA (Peptide Nucleic Acid) finalizzato alla tracciabilità nella filiera pomodoro (Marchelli et al., dati non pubblicati).

Autenticazione dell'IGP "Melannurca Campana" nella filiera melicola

L'Annurca" è una tipologia di mela popolare e diffusa nel sud Italia che possiede caratteristiche organolettiche superiori e riconosciute. Per difendere la produzione locale di questo prodotto e per sostenerne il valore di mercato, la "Melannurca Campana" ha ricevuto il marchio IGP ed è stata definita come la "regina delle mele". Nel lavoro di Melchiade et al., 2007 è descritta la caratterizzazione SSR di 14 varietà locali campane e 3 accessioni di "Annurca" mediante il *fingerprinting* del DNA basato su 4 loci SSR. Il prodotto IGP è identificato dal profilo allelico di un singolo locus, mentre la combinazione dei profili allelici di due loci è sufficiente per discriminare tutte le varietà all'analisi. Lo stesso locus è stato utilizzato per l'autenticazione genetica delle mele IGP in prodotti finiti differenti ed altamente processati, il nettare e la purea. La corrispondenza dei profili allelici, evidenziata mediante elettroforesi capillare degli amplificati SSR, nel DNA estratto dai materiali dei differenti segmenti della filiera indica che è possibile tracciare geneticamente la presenza della "Melannurca Campana" nei prodotti della filiera melicola confermando il marcatore SSR essere uno strumento di elezione per l'autenticazione alimentare.

Olio di Collina di Brindisi: un olio extravergine d'oliva DOP

La Puglia è la regione italiana con la più elevata produzione di olio di oliva e parte di questa produzione è rappresentata da oli che per la loro tipicità hanno ottenuto marchi di qualità DOP a livello europeo. "Collina di Brindisi" è un olio extravergine di oliva salentino che ha

ottenuto questo marchio, e il requisito varietale del disciplinare di produzione prevede l'utilizzazione della cultivar "Ogliarola" (70% minimo) e di altre cultivar diffuse nell'area di produzione (MIPAF, DM 29/9/1998). Recentemente è stata individuata la presenza di tre differenti tipi di "Ogliarola" provenienti da tre differenti territori della regione pugliese (salentina, barese e garganica) ma, considerando l'area di produzione di quest'olio DOP, la presenza della cultivar "Ogliarola salentina" è fortemente prevalente. L'identificazione della cultivar utilizzata nella produzione dell'olio DOP è stata effettuata mediante l'uso di sette marcatori SSR caratterizzati da ampliconi di piccole dimensioni, comprese tra 80 e 205 bp e, pertanto, particolarmente idonei per analizzare DNA in parte degradato come quello estratto dall'olio. Il pattern elettroforetico del DNA dell'olio DOP "Collina di Brindisi" ha evidenziato il prevalere della varietà "Ogliarola salentina" presente in quantità superiore al 70% (Pasqualone et al., 2007a). I risultati ottenuti suggeriscono che il disciplinare di produzione dell'olio DOP dovrebbe fare riferimento alla cultivar "Ogliarola salentina" e non indicare la cultivar con il nome generico di "Ogliarola". Tale indicazione è rilevante ai fini della tracciabilità delle materie prime in filiere agro-alimentari dal momento che esistono omonimi della cultivar "Ogliarola" che dovrebbero essere meglio definiti.

Rintracciabilità nella filiera del grano duro e rilevazione di frumento tenero nei prodotti finiti

La presenza di grano tenero (*Triticum aestivum* L.) nelle semole di grano duro (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) è sempre stata oggetto di particolare interesse nella preparazione di alcuni prodotti tipici, come il "Pane di Altamura" e il "Pane di Matera" che devono essere preparati utilizzando esclusivamente semola di grano duro (European Commission L. 181 del 19/3/2003; MIPAF, DM 28/09/2004). La tipicità di questi prodotti è legata all'esclusivo uso della semola derivata da determinate cultivar di grano duro coltivate in un ben definito e ristretto areale geografico, e solo con il rispetto di tali requisiti si può accedere ai marchi europei DOP e IGP.

L'identificazione di specifiche frazioni proteiche di grano tenero ha sempre incontrato non poche difficoltà a causa della significativa denaturazione delle proteine alle alte temperatu-

re di preparazione di questi prodotti tipici. L'analisi di semole e pane con marcatori molecolari che amplificano sequenze di DNA specifiche del genoma D ha permesso di rilevare la presenza di quantità di frumento tenero del 3-5% e persino del 2,5% con la tecnica RT-PCR. Il DNA estratto con kit commerciali è stato amplificato con marcatori SSR che hanno generato un polimorfismo idoneo per discriminare il grano tenero dal grano duro; in particolare un marcatore SSR ha evidenziato la presenza di un allele tipico del genoma D ed è risultato ideale per la messa a punto di un metodo routinario di identificazione del grano tenero (Pasqualone et al., 2007b). I risultati ottenuti rappresentano una importante applicazione diretta dell'uso degli SSR per la protezione di un marchio Europeo DOP come il "Pane di Altamura" che non deve contenere farina di grano tenero.

Conclusioni

Il *fingerprinting* del DNA basato su marcatori molecolari rappresenta un valido strumento per l'identificazione di cultivar e accessioni di specie diverse, per la quantificazione della diversità genetica di collezioni di varietà ed ecotipi e per la tracciabilità genetica delle materie prime nelle filiere agro-alimentari fornendo un eccellente ausilio per la protezione di prodotti tipici italiani.

Questa applicazione delle moderne tecnologie genetico-molecolari rappresenta, inoltre, un importante contributo alla tutela del consumatore che, in molte parti del mondo, dispone di un reddito crescente ed è alla ricerca di cibi saporiti, tradizionali e genuini, e alla tutela del produttore attraverso la differenziazione del prodotto che può conseguire maggiore potere di mercato. D'altra parte, gli agricoltori sono costantemente alla ricerca di opportunità originali ed inesplorate per creare nuovi sbocchi di mercato. Certamente tra queste, un ruolo chiave è occupato dalla tutela delle denominazioni dei prodotti alimentari mediante marchi di qualità, opportunamente difesi nell'ambito di consorzi ed associazioni di produttori. Le continue innovazioni tecnologiche che scaturiscono dalla ricerca in genetica e genomica vegetale forniscono un contributo molto importante che, in un futuro non lontano, potrà evolversi verso la

diretta identificazione, nei segmenti della filiera, dei geni che determinano la qualità di un prodotto, ad esempio di quei geni responsabili delle qualità organolettiche o della produzione di metaboliti benefici per l'uomo.

Ringraziamenti

Lavoro parzialmente svolto nell'ambito del progetto finanziato dal MIUR – Laboratorio pubblico privato per la genomica del pomodoro, GenoPOM, DM17732.

Bibliografia

- Andreakis N., Giordano I., Pentangelo A., Fogliano V., Graziani G., Monti L. M., Rao R. 2004. DNA fingerprinting and quality traits of corbarino cherry-like tomato landraces. *J. Agric. Food Chem.*, 52:3366- 3371.
- Bredemeijer G.M.M., Cooke R.J., Ganal M.W., Peeters R., Isaac P., Noordijk Y., Rendel S., Jackson J., Roder M. S., Wendehake K., Dijcks M., Amelaine M., Wickert V., Bertrand L., Vosman B. 2002. Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 105:1019-1026.
- Caramante M., Rao R., Monti L.M., Corrado G. 2009. Discrimination of 'San Marzano' accessions: A comparison of minisatellite, CAPS and SSR markers in relation to morphological traits. *Scientia Horticulturae*, 120:560-564.
- Foroni I., Rao R., Woeste K. 2005. Characterization of *Juglans regia* L through SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento landrace'. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 80:49-53.
- Foroni I., Woeste K., Monti L.M., Rao R. 2007. Identification of 'Sorrento' Walnut Using Simple Sequence Repeats (SSRs). *Genetic. Resour. Crop Evol.*, 54:1081-1094.
- Lanteri S., Saba E., Cadinu M., Mallica G., Baghino L., Portis E. 2004a. Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke. *Theor. Appl. Genet.*, 108:1534-1544.
- Lanteri S., Acquadro A., Saba E., Portis E. 2004b. Molecular fingerprinting and evaluation of genetic distances among selected clones of globe artichoke (*Cynara scolymus* var. *cardunculus* L.) 'Spinoso sardo'. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 79,6:863-870.
- Martinez I., Aursand M., Erikson U., Singstad T.E., Vellyulin E., van der Zwaag C. 2003. Destructive and non destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends Food Sci. Technol.*, 14:489-498.

- Mauro R., Portis E., Acquadro A., Lombardo S., Mauromicale G., Lanteri S. 2009. Genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian small-holdings: implications for evolution and domestication of the species. *Conserv. Genet.*, 10:431-440.
- Mazzucato A, Papa R., Bitocchi E., Mosconi P, Nanni L., Negri V., Picarella M.E., Siligato F., Soressi G.P., Tiranti B., Veronesi F. 2008. Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theor. Appl. Genet.*, 116:657-669.
- Melchiade D., Foroni I., Corrado G., Rao R. 2007. Authentication of the 'Annurca' apple in agro-food chain by amplification of microsatellite loci. *Food Biotechnol.*, 21:33-43.
- Pasqualone A., Montemurro C., Summo C., Sabetta W., Caponio F., Blanco A. 2007a. Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of protected designation of origin extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 55:3857-3862.
- Pasqualone A., Montemurro C., Grinn-Gofron A., Sonnante G., Blanco A. 2007b. Detection of soft wheat in semolina and durum wheat bread by analysis of DNA microsatellites. *J. Agric. Food Chem.*, 55:3312-3318.
- Portis E., Barchi L., Acquadro A., Macua J.I., Lanteri S. 2005a. Genetic diversity assessment in cultivated cardoon by AFLP (amplified fragment length polymorphism) and microsatellite markers. *Plant Breed.*, 124:299-304.
- Portis E., Mauromicale G., Barchi L., Mauro R., Lanteri S. 2005b. Population structure and genetic variation in autochthonous globe artichoke germplasm from Sicily Island. *Plant Sci.* 168:1591-1598.
- Rao R., Corrado G., Bianchi M., Di Mauro A. 2006. (GATA)(4) DNA fingerprinting identifies morphologically characterized 'San Marzano' tomato plants. *Plant Breed.*, 125:173-176.
- Salmaso M., Valle R.D., Lucchin M. 2008. Genepool variation and phylogenetic relationships of an indigenous north-east Italian grapevine collection revealed by nuclear and chloroplast SSRs. *Genome*, 51, 10:838-855, doi:10.1139/G08-064.