

Un approccio innovativo per l'identificazione di geni coinvolti nella sintesi della vitamina C nel frutto di pomodoro

INTRODUZIONE

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle tre colture più importanti al mondo, con una produzione di 126 milioni di tonnellate nel 2007 (FAO-STAT - <http://faostat.fao.org/>). Sebbene sia una pianta tropicale, il pomodoro è coltivato in quasi ogni angolo del pianeta, dai tropici al Circolo Polare Artico. Spesso è cresciuto in serra, laddove la produzione esterna è limitata a causa delle basse temperature. I maggiori paesi produttori in ordine decrescente sono Cina, Usa, India, Turchia, Egitto e Italia. Negli ultimi anni, la sua produzione globale è aumentata di circa il 10%.

Il pomodoro rappresenta un'importante fonte di antiossidanti, vitamine e minerali (Frusciante et al., 2007), e ciò è di notevole interesse per la salute umana. Infatti, recentemente è stato dimostrato che metaboliti secondari quali composti fenolici, acido ascorbico (AsA o vitamina C) e altre molecole antiossidanti appartengono a un importante gruppo di fitonutrienti responsabili, in parte, dell'effetto protettivo contro alcune malattie croniche e degenerative (Demming-Adams e Adams 2002). In particolare, frutta fresca e verdura, come arance e pomodori, sono la principale fonte di vitamina C per uomo, primati, mammiferi e pochi altri passeriformi, che non sono in grado di sintetizzare questa vitamina a causa di mutazioni nel gene che controlla l'ultimo step della via biosintetica.

In generale, le proprietà benefiche per la salute umana di molti metaboliti secondari delle piante hanno fatto sì che, negli ultimi anni, l'attenzione del

* Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II

miglioramento genetico vegetale si focalizzasse sul controllo della loro biosintesi e del loro accumulo nelle diverse specie vegetali (Raskin et al., 2002). Per il pomodoro la conseguenza di tale interesse è stata che, sebbene in Europa il miglioramento genetico di tale specie sia iniziato più di 200 anni fa, avendo obiettivi diversi in accordo con le differenti tipologie del prodotto (da mensa o da industria) e con i diversi sistemi di coltivazione, oggi l'attenzione dei breeder è maggiormente rivolta al miglioramento delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali del frutto. Tale interesse è particolarmente vivo poiché un aumento del contenuto di vitamina C in pomodoro può anche contribuire a migliorare la tolleranza a stress, sia biotici sia abiotici (Davey et al., 2000; Muckenschnabel et al., 2002; Kuzniak e Sklodowska, 2005) e la qualità del frutto in post-raccolta (Davey e Keulemans, 2004; Malacrida et al., 2006).

Il lavoro di "breeding" mirato all'ottenimento di varietà con migliori caratteristiche qualitative è tuttavia complicato dalla complessità genetica dei caratteri oggetto di studio. Infatti, la maggior parte dei parametri di qualità del frutto ha eredità quantitativa mostrando una variazione continua, fortemente influenzata dalle condizioni ambientali. La variazione genetica di tali caratteri è dovuta all'azione congiunta di molti geni (QTL, Quantitative Trait Loci), i quali possono essere mappati sul genoma con l'ausilio di marcatori molecolari (Tanksley, 1993). Un approccio di analisi QTL è già stato utilizzato per localizzare regioni genomiche che controllano tratti quantitativi del pomodoro trasformato (Barone et al., 2008). Alcuni QTL per peso del frutto, contenuto di solidi solubili, pH, colore e consistenza del frutto sono stati individuati in diverse popolazioni segreganti provenienti da incroci interspecifici.

Oggi, per il pomodoro sono disponibili numerose risorse genetiche e genomiche che possono facilitare il lavoro d'identificazione di QTL e dei geni candidati al controllo di caratteri quantitativi (Barone et al., 2009). Tra le prime, un notevole contributo all'identificazione di QTL in pomodoro è stato fornito dalle linee di introgressione (Eshed e Zamir, 1994), linee che consentono di avere una collezione permanente di segmenti cromosomici omozigoti di una specie selvatica nel background genetico della specie coltivata (fig. 1). Tali linee consentono, perciò, di ripetere le prove più volte sia nel tempo sia nello spazio, presupposto fondamentale per lo studio dei caratteri quantitativi.

Tra le risorse genomiche disponibili, esistono diverse piattaforme per l'analisi trascrittomica che consente di evidenziare il livello di espressione degli RNA messaggeri su scala genomica in determinati tessuti o stadi di svilup-

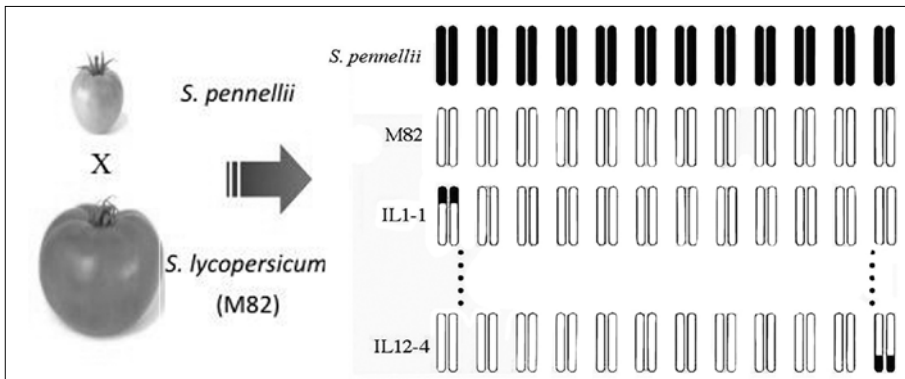


Fig. 1 Rappresentazione schematica delle linee di introgressione ottenute dall'incrocio tra *S. pennellii* e *S. lycopersicum* (in nero è rappresentato il genoma della specie selvatica, in bianco quello della specie coltivata)

po della pianta, e quindi di individuare potenziali geni coinvolti nel controllo dei caratteri oggetto di studio (Minic et al., 2009). Tali piattaforme, infatti, permettono di fotografare l'insieme di trascritti in una determinata condizione fisiologica, e tra questi di identificare quelli il cui livello di espressione è associato al fenotipo d'interesse.

Scopo del presente lavoro è l'identificazione di potenziali QTL coinvolti nel controllo del contenuto di acido ascorbico (AsA) nel frutto di pomodoro, mediante un approccio di genomica che combina l'uso di risorse genetiche, quali le linee di introgressione, con l'uso di risorse genomiche, quali un chip per l'analisi trascrittomico di geni differenzialmente espressi nel frutto allo stadio di completa maturazione.

MATERIALI & METODI

Materiale vegetale

Una popolazione di circa 50 linee d'introgressione *S. lycopersicum* (var. M82) x *S. pennellii* è stata coltivata in vaso in serra fredda, per tre anni consecutivi. Per ogni linea d'introgressione sono state coltivate da tre a cinque repliche in blocchi randomizzati. I frutti sono stati raccolti da ciascuna pianta allo stadio di rosso maturo e successivamente utilizzati per l'estrazione e la quantificazione dell'AsA.

Estrazione e quantificazione dell'Ascorbato (AsA)

La polpa delle bacche è stata introdotta in tubi Eppendorf da 2 ml con una biglia di acciaio e subito congelata in azoto liquido. Quindi i tubi sono stati sottoposti a omogeneizzazione simultanea in Tissue Lyzer (Retsch QIAGEN) attraverso 2 cicli consecutivi da 1 min a 50 Hz seguiti da altri due cicli della stessa durata e frequenza dopo aver aggiunto ai tubi il tampone di estrazione. I detriti cellulari sono stati separati per centrifugazione e l'estratto è stato utilizzato per il saggio successivo. L'estrazione e la quantificazione dell'AsA è stata condotta secondo il protocollo riportato da Kampfenkel et al. (1995). Il metodo si basa sulla riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} da parte dell'AsA e sulla determinazione spettrofotometrica a 525 nm del Fe^{2+} complessato con il 2,2'-dipiridilio. L'assorbanza misurata allo spettrofotometro è stata convertita in quantità di AsA attraverso le equazioni di rette di taratura realizzate allo scopo. Tali rette di taratura sono state ottenute misurando l'assorbanza a 525 nm in reazioni contenenti quantità note (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8 μmol) di AsA.

Analisi statistica della popolazione

L'analisi statistica per il contenuto di AsA dell'intera popolazione di linee d'introgresione è stata condotta utilizzando il software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versione 15.0. La significatività dei QTL è stata determinata paragonando il valore medio di ogni singola IL al controllo M82 attraverso l'analisi One-way-ANOVA con un LSD post-hoc test a 0.05 di significatività. La presenza di un QTL è stata ipotizzata quando l'introgresione ha mostrato un effetto significativo almeno su tre anni.

Estrazione RNA

L'RNA totale è stato isolato dagli stessi frutti utilizzati per l'analisi del contenuto di AsA secondo il protocollo di Griffiths et al. (1999). Successivamente, l'RNA antisenso (aRNA) è stato sintetizzato con l'uso del SuperScript™ Indirect RNA Amplification System Kit (Invitrogen Catalog no. L1016-02) e marcato con il fluoroforo Alexa Fluor 647 Reactive Dye. L'RNA così ottenuto è stato ibridato sul chip per l'analisi trascrittomica. Sono state effettuate 3 repliche per ciascun genotipo con RNA estratto da frutti di 2 anni (2007 e 2008).

Disegno del chip

L'analisi trascrittomiche è stata condotta sul chip 90K TomatoArray1.0 sintetizzato su piattaforma COMBIMATRIX alla Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali dell'Università di Verona, nell'ambito di una collaborazione con il prof. Mario Pezzotti e il prof. Massimo Delledonne. Il chip contiene 90.000 elettrodi di silicio su cui sono sintetizzate in situ 20200 sonde di DNA, ciascuna replicata 4 volte. Ogni sonda è stata disegnata da un diverso Tentative Consensus (TC) estratto dal Database TIGR *Lycopersicon esculentum* Gene Index Release 11.0 (21 giugno, 2006). Sul chip sono state inserite anche nove sequenze batteriche utilizzate come controllo negativo, fornite dalla piattaforma COMBIMATRIX. L'analisi statistica dei dati ottenuti dalle ibridazioni è stata eseguita utilizzando il software TIGR Multiple Experiment Viewer versione 4.0 (<http://www.tigr.org/software/tm4/> - Saeed et al., 2003). In seguito, grazie al software Blast2GO (<http://blast2go.bioinfo.cipf.es/> - Conesa et al., 2005) è stata ottenuta l'annotazione automatica, la Gene Ontology (GO) e la categorizzazione di tutti i TC differenzialmente espressi.

RISULTATI E DISCUSSIONI

L'approccio proposto nel presente lavoro si basa sull'uso integrato di specifiche risorse genetiche e genomiche disponibili per il pomodoro, allo scopo di identificare regioni cromosomiche (QTL) e geni candidati per il controllo del contenuto di AsA nei frutti di pomodoro. L'uso di risorse genetiche quali le linee di introgressione (IL) è stato già descritto per l'analisi di diversi caratteri quantitativi in pomodoro, e ha consentito l'identificazione di molti QTL per caratteristiche legate alla produzione e alla qualità dei frutti (Lippman et al., 2007). La novità del lavoro risiede nel combinare l'uso di tali linee con una nuova piattaforma di trascrittomica, per poter definire quali sono i potenziali geni candidati. In particolare, l'analisi trascrittomiche è stata condotta mediante uso di un chip microarray realizzato con tecnologia Combimatrix. Su tale chip, sono stati sintetizzati piccoli frammenti di sequenze geniche (sonde di circa 35 paia di basi), che rappresentano una collezione dei geni o sequenze EST già noti per il pomodoro, e che pertanto consentono un'analisi completa del trascrittoma di pomodoro, sicuramente paragonabile con quella di altre piattaforme di trascrittomica oggi disponibili per tale specie, quali i chip Tom1 e Tom2 (Alba et al., 2005). Inoltre, sul chip utilizzato ciascuna sonda

è stata replicata 3-4 volte e, dato che la tecnologia Combimatrix consente di riutilizzare 4-5 volte lo stesso chip per ibridazioni consecutive, la scelta di tale piattaforma trascrittomica aggiunge il vantaggio della riduzione dei costi dell'analisi.

In particolare, la strategia proposta nel presente lavoro ha visto coinvolte due fasi successive: l'analisi fenotipica volta alla identificazione di regioni cromosomiche (QTL) che regolano il contenuto dell'AsA, e quindi l'analisi trascrittomica per l'identificazione dei geni candidati che risiedono nelle regioni QTL individuate o che sono a esse correlate. Per l'analisi fenotipica si è proceduto alla determinazione del contenuto di AsA nel frutto delle linee di introgressione, mentre per l'analisi trascrittomica si è ricorso all'ibridazione dell'RNA dei frutti di pomodoro sul chip TomatArray1.0.

Contenuto di ascorbato (AsA) nella popolazione IL di S. pennellii

Allo scopo di identificare QTL coinvolti nel controllo della biosintesi e dell'accumulo di AsA, è stata effettuata la misurazione del contenuto di AsA in frutti raccolti allo stadio di rosso maturo provenienti dalle singole linee d'introgressione per tre anni consecutivi (2006-2007-2008). In figura 2 sono riportati i risultati medi dei tre anni del contenuto di AsA per le tre linee IL 7-3, IL 10-1 e IL 12-4. In particolare, queste linee hanno mostrato una variazione significativa del contenuto di AsA rispetto al controllo M82 in ognuna delle tre annate di prova, consentendo di identificare tre QTL per tale carattere. Come riportato in figura 2, due di queste IL (IL 7-3 e IL 12-4) presentano un QTL positivo, cioè corrispondente a un aumento del contenuto di AsA, mentre la linea IL 10-1 mostra un QTL negativo corrispondente a una diminuzione dell'AsA. In precedenti studi effettuati sulla stessa popolazione di linee di introgressione alcuni QTL per il contenuto di AsA sono stati identificati anche in differenti linee IL. Comuni ad altri esperimenti sono, invece, sia il QTL della IL 12-4 che quello della IL 10-1 (Rousseaux et al., 2005; Schauer et al., 2006), mentre è la prima volta che è stato riscontrato un QTL per contenuto in AsA nella IL 7-3. L'identificazione di alcuni QTL diversi, riportata in altri lavori, è probabilmente dovuta ai differenti sistemi di allevamento (pieno campo e serra, e tra questi ultimi in suolo o in vaso) e ambienti pedoclimatici. Infatti, come riportato da Toor et al. (2006) il contenuto di AsA nel frutto di pomodoro, come molti altri caratteri quantitativi, è fortemente influenzato dall'ambiente e presenta una tipica distribuzione a campana, con valori quindi che possono mostrare ampia variabilità.

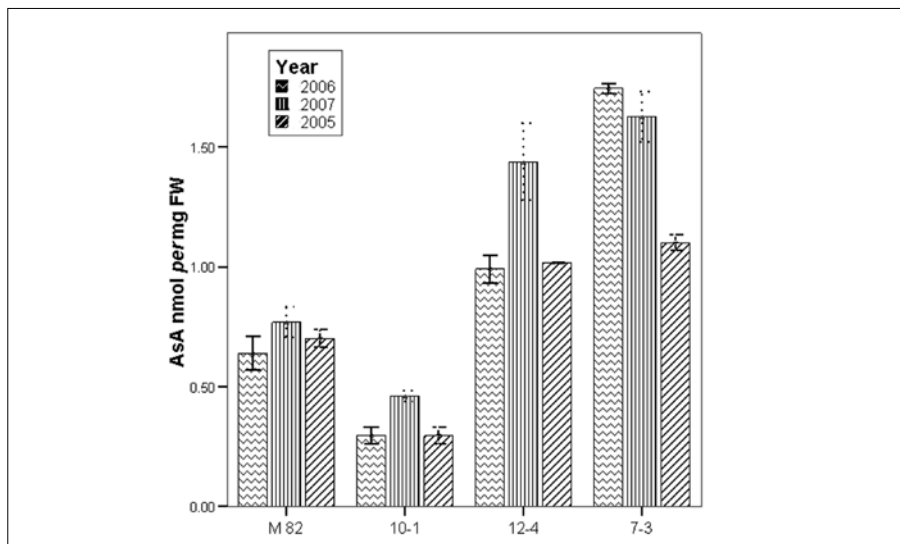


Fig. 2 Contenuto di AsA nel frutto di tre IL selezionate dopo tre anni consecutivi di analisi rispetto al controllo M82. *: linee significativamente differenti dal controllo ($0,01 < P < 0,05$)

Analisi trascrittomic

L'analisi trascrittomic comparativa delle tre linee IL 7-3, IL 12-4 e IL 10-1 rispetto al controllo M82 ha permesso l'identificazione rispettivamente di 260, 253 e 239 trascritti differenzialmente espressi, distinti in sovraespressi e sottoespressi in funzione del rapporto tra l'intensità del segnale di ibridazione della IL e quello del controllo M82. In particolare, nella IL 7-3 su 260 trascritti totali 132 sono sovraespressi e 128 sottoespressi, nella IL 10-1 92 trascritti sovraespressi e 147 sottoespressi, e nella IL 12-4 61 sovraespressi e 192 sottoespressi (tab. 1).

L'analisi dei dati di trascrittomic attraverso il software BLAST2GO ha consentito l'annotazione e la categorizzazione automatica dei trascritti differenzialmente espressi e quindi l'assegnazione di una potenziale funzione in base ai 3 diversi vocabolari di Gene Ontology (GO), e cioè Funzione Molecolare (MF), Processo Biologico (BP) e Componente Cellulare (CC). Nella figura 3 è riportato il risultato di tale categorizzazione. Si può notare che nell'ambito della categorizzazione per CC in tutte e tre le linee IL il maggior numero di trascritti, dopo la categoria non classificati (unknown), afferisce alla categoria mitocondri e plastidi, entrambi coinvolti nella sintesi e nell'ac-

IBRIDAZIONI	TRASCritti TOTALI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI	TRASCritti SOVRAESPRESSI ¹	TRASCritti SOTTOESPRESSI ²
IL 7-3 vs. M 82	260	132	128
IL 12-4 vs. M 82	253	61	192
IL 10-1 vs. M 82	239	92	147
¹ rapporto IL/M82>1			
² rapporto IL/M82<1			

Tab. 1 Numero di trascritti differenzialmente espressi tra ciascuna IL e il controllo M82 (dati medi delle ibridazioni del 2007 e 2008)

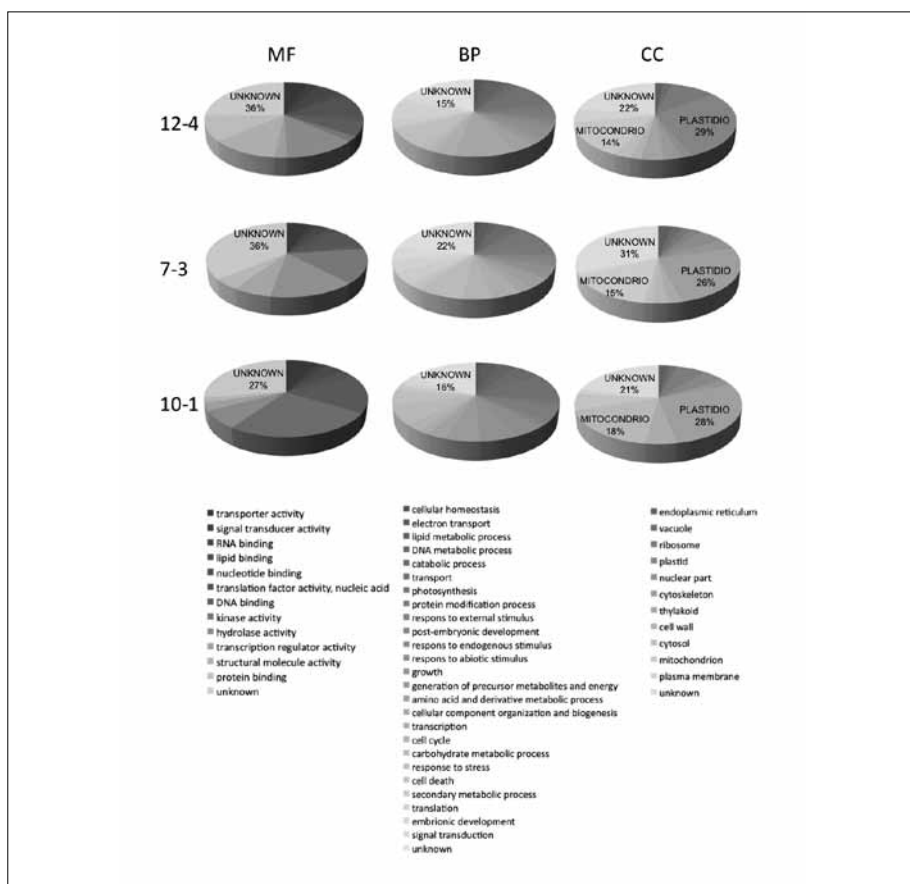


Fig. 3 Categorizzazione mediante BLAST2GO dei trascritti differenzialmente espressi ottenuti dall'analisi microarray delle linee IL 12-4, IL 7-3, IL 10-1. MF = Funzione Molecolare, BP = Processo Biologico, CC = Componente Cellulare

cumulo dell'AsA in pianta. In generale, il numero di trascritti con funzione non ancora nota è variato da un minimo di 15% nel caso della linea IL12-4 per la categoria BP a un massimo di 36% per la linea IL7-3 per la categoria MF. Per tutti gli altri trascritti si potrà, quindi, attribuire una potenziale funzione, che può consentire di formulare delle ipotesi su quali e quanti geni candidati alla sintesi dell'AsA possono essere identificati. Tale funzione dovrà essere convalidata con opportune analisi funzionali che possono o meno confermare le ipotesi fatte (McGrath et al., 2005).

Da uno studio preliminare sui trascritti a funzione nota o putativamente nota, si evince che un dato rilevante per l'identificazione di geni candidati per il controllo del contenuto di AsA nelle 3 linee di introgressione potrebbe essere dedotto dall'analisi dei trascritti comuni e diversi tra le tre IL. In particolare, confrontando tutti i trascritti condivisi e non (fig. 4), risulta che 2 sono comuni a tutte le IL analizzate; inoltre considerando la divisione in sottoespressi e sovraespressi, entrambi sono sottoespressi. Dieci trascritti sono condivisi tra le IL 7-3 e IL 12-4, di cui 2 sovraespressi e 7 sottoespressi, altri dieci sono condivisi tra le IL 12-4 e IL 10-1, di cui 6 sovraespressi e 3 sottoespressi e, infine, 28 trascritti sono condivisi tra le IL 7-3 e IL 10-1, di cui 10 tra i sovraespressi e 10 tra i sottoespressi. Di tutti questi trascritti comuni, sarà particolarmente interessante indagare la funzione di quelli che hanno uno stesso andamento (sovraespressione o sottoespressione) nei due genotipi che portano a un incremento del contenuto di acido ascorbico, perché potrebbero rappresentare geni chiave per la sintesi e l'accumulo di tale metabolita nel frutto di pomodoro. Inoltre, sono presenti 10 trascritti con andamenti diversi a seconda del genotipo (tab. 2). In particolare, 7 trascritti sono sottoespressi nella IL 7-3 e sovraespressi nella IL 10-1 e viceversa 1 è sovraespresso in IL 7-3 e sottoespresso in IL 10-1. Inoltre, 2 trascritti sono sottoespressi nella IL 12-4 e sovraespressi sia nella IL 7-3 e che nella IL 10-1. Potrebbero essere interessanti quelli di andamento opposto tra le linee con QTL positivo (IL 7-3 e IL 12-4) e la linea con QTL negativo (IL 10-1). Anche questi trascritti, infatti, potrebbero essere di aiuto per capire se ci sono geni chiave nel pathway di sintesi della vitamina C, la cui sovra- o sottoespressione nelle linee con QTL positivi, e l'espressione con andamento opposto nella linea con QTL negativo, possono giustificare l'incremento e la riduzione di vitamina C nelle linee in esame.

Finora, un'analisi più approfondita dei trascritti differenzialmente espressi nella linea IL 12-4 rispetto al controllo M82 ha portato a ipotizzare che ci sia un coinvolgimento del metabolismo dell'etilene nel regolare la maggiore sintesi della vitamina C in tale genotipo e che la degradazione di alcune

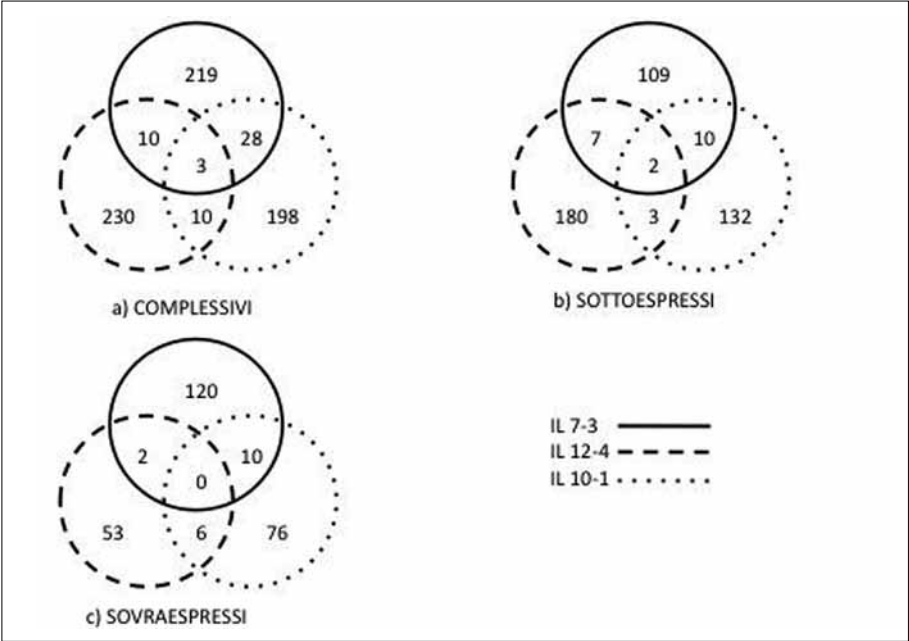


Fig. 4 *Trascritti differenzialmente espressi nelle IL 7-3, IL 10-1 e IL 12-4 rispetto al controllo M82. a) trascritti totali; b) trascritti sottoespressi e c) trascritti sovraespressi*

TRASCritto	IL 7-3	IL 10-1	IL 12-4
8	-	+	
61	-	+	
116	-	+	
209	-	+	
312	-	+	
466	-	+	
500	-	+	
647	+	-	
762		+	-
832	+		-

Tab. 2 *Sovraespressione (+) o sottoespressione (-) di alcuni trascritti differenzialmente espressi nelle tre linee IL studiate mediante analisi microarray*

componenti della parete cellulare possa fornire i precursori per tale sintesi (Di Matteo et al., 2008). Inoltre, analisi preliminari condotte sui trascritti differenzialmente espressi nella linea IL 7-3 fanno supporre, anche in questa linea, il coinvolgimento dell’etilene nel regolare la maggiore sintesi della

vitamina C. In entrambi i casi, tale ipotesi andrà comunque confermata mediante analisi funzionali con piante trasformate e o mediante la tecnica del silenziamento genico.

In conclusione, l'approccio innovativo proposto nel presente lavoro ha consentito di identificare un numero elevato di trascritti e /o putativi geni, il cui reale coinvolgimento nella sintesi e accumulo della vitamina C nel frutto di pomodoro va confermato. Tale approccio, quindi, ha fornito uno strumento di analisi per caratteri quantitativi, che si è dimostrato particolarmente efficace nell'individuare alcuni geni tra quelli che maggiormente possono influenzare il carattere da migliorare per l'ottenimento di nuove varietà da immettere sul mercato, e sui quali potranno essere costruiti marcatori molecolari utili per la selezione assistita.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i prof. Mario Pezzotti e Massimo Delledonne dell'Università di Verona per la preziosa collaborazione nell'allestimento del chip Combi-matrix di pomodoro. Il lavoro è stato svolto grazie al contributo del Progetto Agronanotech, finanziato dal MiPAF e del Progetto GenoPom, finanziato dal MiUR.

RIASSUNTO

Il pomodoro rappresenta un'importante fonte di antiossidanti, vitamine e minerali, e ciò è di notevole interesse per la salute umana. Infatti, recentemente è stato dimostrato che metaboliti secondari quali l'acido ascorbico (AsA o vitamina C) hanno un effetto protettivo contro alcune malattie croniche e degenerative. Il lavoro di "breeding" mirato all'ottenimento di varietà con migliori caratteristiche qualitative è tuttavia complicato dalla complessità genetica dei caratteri oggetto di studio, per la maggior parte dovuti all'azione congiunta di molti geni (QTL, Quantitative Trait Loci). Oggi, per il pomodoro sono disponibili numerose risorse genetiche e genomiche che possono facilitare il lavoro d'identificazione di QTL e dei geni candidati al controllo di caratteri quantitativi. Scopo del presente lavoro è l'identificazione di potenziali QTL e geni candidati coinvolti nel controllo del contenuto di AsA nel frutto di pomodoro, mediante un approccio che combina l'uso di risorse genetiche e genomiche. Sono state identificate 3 linee di introgressione di *S. pennellii*, 2 con un elevato contenuto di AsA e una con un basso contenuto. Per effettuare un'analisi trascrittomico l'RNA estratto da tali linee è stato ibridato su un chip COMBIMATRIX. È stato così identificato un set di trascritti differenzialmente espressi nelle tre linee che potrà essere utilizzato per identificare i geni candidati al controllo del contenuto di AsA nel frutto di pomodoro.

ABSTRACT

Tomato fruit is precious source of nutritional compounds, among which ascorbic acid (AsA), that can help to protect against human diseases, such as cancer and cardiovascular ones. In addition, in plants it plays a crucial role as co-factor, antioxidant and precursor. In order to increase AsA content in fruit a deep understanding on the genetic control of its synthesis and storage is required. The purpose of the present work was to identify QTLs and candidate genes, which can increase AsA content in tomato fruit, with the final aim of pyramiding them into cultivated varieties. The approach used was to combine tomato introgression lines with the transcriptomic analysis that allows to investigate the expression level of thousand of genes contemporarily. Fifty *S. pennellii* introgression lines were screened for AsA content in fruit during three years and three of them were selected since they significantly differed from the cultivated genotype M82 over all the three years. Two of them showed a higher AsA content, one a lower content. Total RNA was extracted from fruit and hybridized on the Combimatrix 90k TomatArray 1.0. A group of over-expressed and under-expressed probes in the three ILs *vs.* M82 comparison were found. Using a bioinformatic approach, many differentially expressed tentative consensus (TCs) were also annotated and classified according to the Gene Ontology vocabulary. This selected collection of TCs will be useful to better investigate the genetic control of mechanisms leading to an increased AsA content in tomato fruit.

BIBLIOGRAFIA

- ALBA R., PAYTON P., FEI Z., MCQUINN R., DEBBIE P., MARTIN G.B., TANKSLEY S.D., GIOVANNONI J.J. (2005): *Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development*, «Plant Cell.», 11, pp. 2954-65.
- BARONE A., CHIUSANO M.L., ERCOLANO M.R., GIULIANO G., GRANDILLO S., FRUSCIANTE L. (2008): *Structural and functional genomics of tomato*, «Intl J Plant Genomics», pp. 1-12, doi 10.1155/2008/820274.
- BARONE A., DI MATTEO A., CARPUTO D., FRUSCIANTE L. (2009): *High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency*, «Curr Genomics», 10, pp. 1-9.
- CONESA A., GÖTZ S., GARCÍA-GÓMEZ J.M., TEROL J., TALÓN M., ROBLES M. (2005): *Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research*, «Bioinformatics», 21, pp. 3674-3676.
- DAVEY M.W., KEULEMANS J. (2004): *Determining the potential to breed for enhanced antioxidant status in Malus: mean inter- and intravarietal fruit vitamin C and glutathione contents at harvest and their evolution during storage*, «J Agric Food Chem», 52, pp. 8031-8038.
- DAVEY M.W., VAN MONTAGU M., INZE D., SANMARTIN M., KANELIS A., SMIRNOFF N., BENZIE IJJ., STRAIN JJ., FAVELL D., FLETCHER J., ET AL. (2000): *Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*, «J Sci Food Agric», 80, pp. 825-860.
- DEMMING-ADAMS & ADAMS (2002): *Antioxidants in photosynthesis and human nutrition*, «Science», 298, pp. 2149-53.

- DI MATTEO A., SACCO A., PEZZOTTI M., DELLEDONNE M., FERRARINI A., FRUSCIANTE L., BARONE A. (2008): *Transcriptomic comparative analysis for tomato fruit quality traits through the Combimatrix technology*, «5th Solanaceae Genome Workshop» Cologne (Germany), 12-16 October 2008, p. 289
- ESHED Y., ZAMIR D. (1994): *A genomic library of Lycopersicon pennellii in L. esculentum: a tool for fine mapping of genes*, «Euphytica», 79, pp. 175-178.
- FAOSTAT (2005): FAOSTAT statistics division. *FAOSTAT/Food and Agriculture Organization of the United Nations*, «Vol. 2007».
- FRUSCIANTE L., CARLI P., ERCOLANO MR., PERNICE R., DI MATTEO A., FOGLIANO V., PELLEGRINI N. (2007): *Antioxidant nutritional quality of tomato*, «Mol. Nutr. Food Res.», 51 (5), pp. 609-617.
- GRIFFITHS A., BARRY C., ALPUCHE-SOLIS A.G. AND GRIERSON D. (1999): *Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening*, «J. Exp. Bot.», 50 (335), pp. 793-798.
- KAMPFENKEL K., VAN MONTAGU M., INZE D. (1995): *Effects of Iron Excess on Nicotiana plumbaginifolia Plants (Implications to Oxidative Stress)*, «Plant Physiol», 107, pp. 725-735.
- KUZNIAK E., SKLODOWSKA M. (2005): *Fungal pathogen-induced changes in the anti-oxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants*, «Planta», 222, pp. 192-200.
- LIPPMAN Z.B., SEMEL Y., ZAMIR D. (2007): *An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines*, «Curr Opin Genetics & Dev.», 17, pp. 545-552.
- MALACRIDA C., VALLE E.M., BOGGIO S.B. (2006): *Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom*, «Physiol Plant», 127, pp. 10-15.
- MCGRATH K.C., DOMBRECHT B., MANNERS J.M., SCHENK P.M., EDGAR C.I., MACLEAN D.J., SCHEIBLE W.R., UDVARDI M.K., KAZAN K. (2005): *Repressor- and Activator-Type Ethylene Response Factors Functioning in Jasmonate Signaling and Disease Resistance Identified via a Genome-Wide Screen of Arabidopsis Transcription Factor Gene Expression*, «Plant Physiol», 139, pp. 949-959.
- MINIC Z., JAMET E., SAN-CLEMENTE H., PELLETIER S., RENOU J.P., RIHOUEY C., OKINYO D., PROUX C., LEROUGE P., JOUANIN L. (2009): *Transcriptomic analysis of Arabidopsis developing stems: a close-up on cell wall genes*, «BMC Plant Biol», 9, pp. 1-6.
- MUCKENSCHNABEL I., GOODMAN BA., WILLIAMSON B., LYON GD., DEIGHTON N. (2002): *Infection of leaves of Arabidopsis thaliana by Botrytis cinerea: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products*, «J Exp Bot», 53, pp. 207-214.
- RASKIN I., RIBNICKY D.M., KOMARNYTSKY S., ILIC N., POULEV A., BORIJUK N., BRINKER A., MORENO D.A., RIPOLI C., YAKOBY N., O'NEAL J.M., CONRWELL T., PASTOR I., FRIDLENDER B. (2002): *Plants and human health in the twenty-first century*, «Trends in Biotechnol», 20 (12), pp. 522-531.
- ROUSSEAU M.C., JONES C.M., ADAMS D. (2005): *QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using Lycopersicon pennellii introgression lines*, «Theor. Appl. Genet.», 111, pp. 1396-1408.
- SAEED A.I., SHAROV V., WHITE J., LI J., LIANG W., BHAGABATI N., BRAISTED J., KLAPA M., CURRIER T., THIAGARAJAN M., ET AL. (2003): *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*, «Biotechniques», 34, pp. 374-378.
- SCHAUER N., SEMEL Y., ROESSNER U., GUR A., BALBO I., CARRARI F., PLEBAN T., PEREZ-MELIS A., BRUEDIGAM C., KOPKA J., WILLMITZER L., ZAMIR D., FERNIE A.R. (2006):

- Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement*, «Nat Biotechnol», 24, pp. 447-454.
- TANKSLEY S.D. (1993): *Mapping polygenes*, «Ann Rev Gen», 27, pp. 205-233.
- TOOR R.K., SAVAGE G.P., LISTER C.E. (2006): *Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes*, «J Food Compos Anal», 19, pp. 1-10.