

GIUSEPPE MANDOLINO*, CHIARA ONOFRI*, BRUNO PARISI*,
MONICA STURARO*, GIOVANNI GIULIANO**, MARIA SULLI**,
SARAH FRUSCIANTE**, GIANFRANCO DIRETTO**,
GIUSEPPE REFORGIATO RECUPERO***, CONCETTA LICCIARDELLO***

Sviluppo di piante per produrre alimenti biofortificati: alcuni casi-studio

INTRODUZIONE

I vegetali che sono alla base dell'alimentazione umana contengono praticamente tutti i composti nutritivi di cui l'uomo ha bisogno per la sua sopravvivenza; oltre a queste esigenze di base, molti cibi di origine vegetale che sono comunemente presenti sulla nostra tavola, sono anche preziose riserve di molte molecole dotate di un'accertata attività benefica sulla salute e un'azione di prevenzione di diverse malattie.

Nelle società sviluppate, infatti, sono sempre più diffuse l'obesità, il diabete, i disturbi cardio-vascolari, mentre nei paesi in via di sviluppo sono ancora presenti drammatiche carenze di vitamine, di minerali, quando non si deve affrontare l'assoluta carenza di cibo (Everitt et al., 2010).

È quindi un notevole interesse dei consumatori avere consapevolezza di quali cibi sono più adatti a proteggere o mantenere un buono stato di salute, ed è un obiettivo importante del miglioramento genetico lo sviluppo delle potenzialità presenti in molti cibi tipici della nostra tavola, a partire dalla loro caratterizzazione nutrizionale, biochimica e molecolare. Il breeding è oggi un'attività sempre più "assistita" dalle conoscenze di genomica e metabolomica che si stanno accumulando con la ricerca (Saxena e Cramer, 2013; Gibney et al., 2005).

Si stima che i metaboliti presenti in natura nel regno vegetale siano oltre 200.000 (Fiehn, 2002); questa grande varietà di composti presenti nelle

* *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per le Colture Industriali, Bologna*

** *ENEA, Centro Ricerche La Casaccia, Roma*

*** *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Agricoltura e le Colture mediterranee, Acireale (CT)*

piante viene di solito suddivisa in metaboliti primari, assolutamente necessari alla sopravvivenza della pianta (es. zuccheri, aminoacidi, acidi grassi, ecc.) e metaboliti secondari che svolgono importanti ruoli nella difesa dai patogeni e dagli stress, nell'attrarre insetti impollinatori, o nel favorire la dispersione del seme, e in generale contribuiscono ad aumentare la *fitness* della pianta. Il metabolita può avere, in tessuti diversi, un ruolo primario o secondario. Ad esempio, nelle foglie il β -carotene è necessario per la fotosintesi, e quindi per la sopravvivenza della pianta e può essere quindi considerato un metabolita primario, mentre in alcuni organi di riserva della pianta, come le radici delle carote, è un metabolita secondario. Sono proprio i metaboliti secondari, a volte molto diffusi nel regno vegetale, a volte strettamente specie- o famiglia-specifici, che spesso posseggono le maggiori proprietà nutritive, farmacologicamente rilevanti, o a volte tossiche (Hounscome et al., 2008; Balandrin et al., 1985).

I metaboliti secondari vengono suddivisi in quattro grandi famiglie di composti (Goldberg, 2003):

- i fenilpropanoidi, che oltre a essere coinvolti nella difesa contro insetti e microbi e in molte caratteristiche legate al colore e al sapore, partecipano anche alla biosintesi della lignina e dei tessuti suberificati; un gruppo di fenilpropanoidi, i flavonoidi, accumulati nei vacuoli, includono gli antociani, importanti pigmenti che contribuiscono alla colorazione rossa, porpora o blu di molti fiori e frutti;
- i terpenoidi, il gruppo più comune nelle piante, costituiti da “blocchi” di unità terpeniche a cinque atomi di carbonio, e che contribuiscono all'aroma, al sapore, al colore dei frutti, e a diversi meccanismi di difesa. Fra questi vi sono oli essenziali, fitoalessine, antibiotici, ormoni come l'acido gibberellico, i brassinosteroidi, i chinoni e – particolarmente importanti sia dal punto di vista della funzione fotosintetica che da quello nutrizionale – i carotenoidi, costituiti da 40 atomi di carbonio;
- gli alcaloidi, che hanno spesso notevoli proprietà farmacologiche ma possono essere anche estremamente tossici (codeina, morfina, nicotina, ecc.);
- i glucosinolati, composti secondari contenenti zolfo, che in seguito a rottura dei tessuti, producono gli isotiocianati, potenti insetticidi naturali con notevoli possibilità applicative industriali e in agricoltura.

I vegetali sono praticamente l'unica fonte accessibile di molti di questi composti, che hanno effetti non solo nutritivi, ma di tutela della salute umana e del benessere generale; di conseguenza, la dieta dev'essere sufficientemente ricca di questi metaboliti da assicurare un corretto apporto nutrizionale.

Può valere come esempio quello dei carotenoidi: nei vertebrati i carotenoidi contenenti un gruppo β -iononico non sostituito, come α - e β -carotene e β -criptoxantina, assunti tramite la dieta, sono convertiti a retinale (vitamina A), la cui deficienza può portare a una serie di sindromi molto gravi, fra cui la cecità. L'attività di questi carotenoidi come precursori della vitamina A è stata anche alla base dei programmi di "biofortificazione" di piante alimentari molto diffuse per il β -carotene, miranti a combattere la grave carenza di questa vitamina che tuttora si registra in molti paesi in via di sviluppo. Tali programmi sono stati condotti sia tramite "breeding" classico (mais, cassava, patata dolce) o, dove non esistevano genotipi abbastanza ricchi di β -carotene (patata, riso), per via transgenica (come il "*Golden rice*" a elevato contenuto di β -carotene) (www.goldenrice.org). Altri carotenoidi, come il licopene, la luteina e la zeaxantina agiscono come antiossidanti e agenti fotoprotettori, e contribuiscono a ritardare o evitare l'insorgenza di malattie come il tumore alla prostata o la degenerazione maculare.

L'importanza nutrizionale di molti metaboliti secondari ha stimolato la ricerca genetica a identificare e sequenziare le caratteristiche dei geni chiave delle rispettive vie biosintetiche, a caratterizzarne dal punto di vista strutturale e funzionale le varianti alleliche che possono dar luogo a nuovi fenotipi di interesse salutistico e nutrizionale, e a esplorare il germoplasma, anche selvatico, delle specie di interesse agrario, alla ricerca di mutanti e genotipi di possibile valore e interesse sia scientifico che commerciale. In queste ricerche hanno svolto un ruolo fondamentale le nuove conoscenze sulle sequenze di interi genomi di specie di interesse agrario, fra cui quelle di pomodoro e patata (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011; The Tomato Genome Consortium, 2012), la cui elevata sentinella ha permesso di trasferire da una specie all'altra le conoscenze via via acquisite, o di specie arboree di notevole importanza per la nostra alimentazione, come l'arancio dolce (Xu et al., 2013). Le strette relazioni filogenetiche esistenti fra specie, per le quali era nota l'intera sequenza genomica e specie di interesse agrario non ancora sequenziate, ha permesso di individuare in queste ultime i geni coinvolti nelle vie metaboliche di sintesi dei composti secondari, sulla base della loro omologia con quelli già individuati nell'altra specie (Peters et al., 2012).

In questa rassegna, si porrà l'accento su due gruppi di composti secondari particolarmente diffusi e importanti per la produzione alimentare, e in particolare per quella tipica italiana: i carotenoidi presenti nelle bacche di pomodoro e nei tuberi di patata, e gli antociani, accumulati in quantità particolarmente elevata nei frutti dell'arancio rosso di Sicilia.

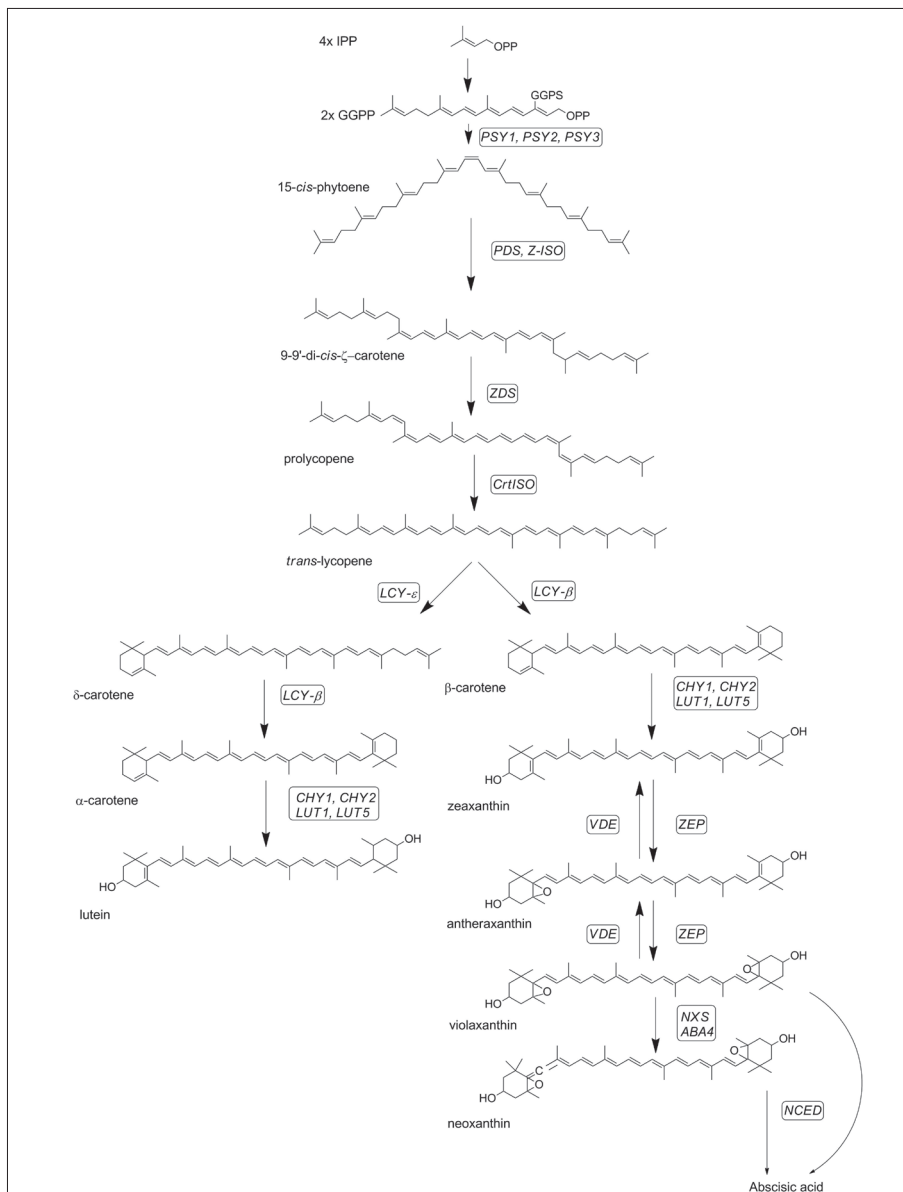


Fig. 1 Schema della via biosintetica dei carotenoidi nelle piante. IPP, isopentenilpirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato. Nei riquadri, gli enzimi che catalizzano i vari passaggi: PSY, fitoene sintasi; PDS, fitoene desaturasi; Z-ISO, 9,15,9'-tri-cis- ζ-carotene isomerasi; ZDS, ζ-carotene desaturasi; CrtISO, prolicopene isomerasi; LCY-ε, licopene ε-ciclasti; LCY-β, licopene β-ciclasti; LUT, e-carotene idrossilasi; CHY, β-carotene idrossilasi; ZEP, zeaxantina epossidasi; VDE, violaxantina depossidasi; NXS, neoxantina sintasi, NCED, 9-cis-epossicarotenoide diossigenasi

POMODORO: I MUTANTI DELLA VIA BIOSINTETICA DEI CAROTENOIDI

La bacca del pomodoro, uno degli alimenti-simbolo della dieta mediterranea, è particolarmente ricca di composti di elevato valore nutrizionale quali zuccheri semplici, diversi chinoni (terpenoidi precursori della vitamina K), aminoacidi importanti, vitamine B e C, e carotenoidi (Rick, 1978). In particolare nelle bacche di pomodoro è elevato il contenuto di licopene e β -carotene, due carotenoidi importanti per la loro attività antiossidante, ma anche, come già discusso, perché il β -carotene è un diretto precursore nella sintesi della vitamina A.

La via della biosintesi dei carotenoidi (fig. 1) nelle bacche di pomodoro è oggetto di studi da molti anni (Bartley et al., 1996), dato il forte interesse economico di questo prodotto; il pomodoro è diventata una pianta modello per questo tipo di studi (Giuliano et al., 1993; Fray et al., 1993), che negli anni precedenti venivano effettuati solo su organismi batterici. L'identificazione di una serie di mutanti con una pigmentazione alterata della bacca matura ha permesso la ricostruzione precisa dei vari *step* metabolici, e in seguito il clonaggio e il sequenziamento di quasi tutti i geni della via biosintetica, e di molte varianti alleliche ai diversi *loci* genici. Alcuni di questi mutanti, e gli effetti di singole mutazioni nella determinazione del fenotipo finale, sono illustrati nella figura 2a, nella quale sono indicate con una croce o con una freccia le mutazioni a carico di determinati passaggi della via biosintetica, a seconda che il loro effetto consista in una specifica perdita o guadagno di funzione enzimatica.

Come atteso, a molti di questi mutanti corrispondono fenotipi differenti nei colori della bacca, ma soprattutto nell'accumulo differenziale di specifici precursori o carotenoidi; le tecniche di metabolomica a elevata processività consentono oggi la caratterizzazione fine di questi mutanti ed è possibile quindi non solo confermare gli effetti previsti sulla base della natura delle mutazioni, ma anche identificare eventuali effetti pleiotropici. Una delle tecniche utilizzate presso il Laboratorio di Biotecnologie Verdi del Centro Ricerche Casaccia dell'ENEA, è la LC-PDA-MS (Liquid Chromatography – Photodiode Array – Mass Spectrometry), mediante la quale sono stati caratterizzati i livelli dei diversi carotenoidi sia nei mutanti di pomodoro, sia nel germoplasma di patata (vedi oltre). La LC-PDA-MS aggiunge alla capacità di risoluzione dell'HPLC e all'ottenimento di spettri accurati on line, la possibilità di determinare le masse molecolari dei composti. Costituisce pertanto uno degli strumenti più potenti a disposizione oggi per analisi metaboliche, che è stato in grado di identificare 47 carotenoidi diversi nella bacca

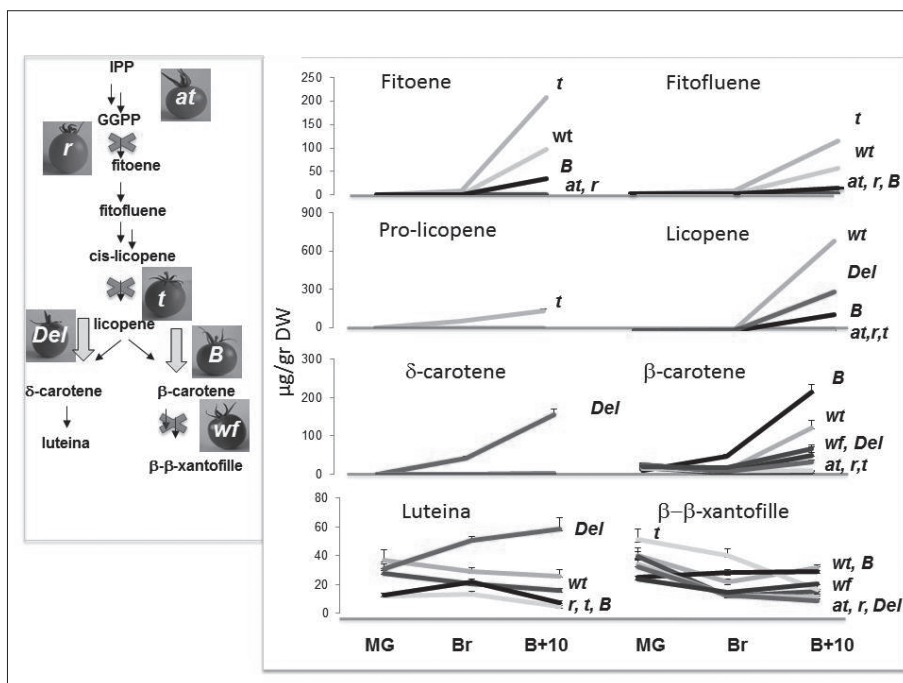


Fig. 2 Localizzazione schematica dei siti di alcune mutazioni della via biosintetica dei carotenoidi in pomodoro e analisi metabolomica delle bacche. Nel pannello 2a, schema della via biosintetica; le croci e le frecce indicano le localizzazioni di alcune mutazioni a perdita o guadagno di funzione rispettivamente: at, mutante apricot (dati non pubblicati); r, mutante yellow flesh (Fray et al., 1993); t, mutante tangerine (Isaacson et al., 2002); Del, mutante Delta (Ronen et al., 1999); B, mutante Beta (Ronen et al., 2000); wf, mutante white flower (Galpaz et al., 2006). Nel pannello 2b, esempi del profiling metabolico di alcuni mutanti mediante LC-DAD-MS a diversi stati di sviluppo della bacca.

del pomodoro (Fantini et al., 2013). I carotenoidi accumulati nella bacca di vari mutanti di pomodoro e nei genotipi *wild-type* sono stati quantificati durante la maturazione, nelle fasi “Mature Green”, “Breaker” e “Post-breaker”, verificando gli effetti della perdita o guadagno di funzione di cui i diversi mutanti sono portatori (fig. 2b). I singoli carotenoidi si accumulano in misura maggiore o minore a seconda di dove sia la perdita o il guadagno di funzione lungo la via biosintetica; nel mutante *tangerine* (t; Isaacson et al., 2002), ad esempio, che ha perso la funzione di isomerizzazione del *cis*-licopene a *trans*-licopene, a partire dalla fase di *breaker* (bacca in cui il verde comincia a virare al giallo-rosa nel 10% della superficie), si nota un maggior accumulo di tutti i metaboliti a monte della perdita di funzione (fitoene, fitofluene, *cis*-licopene),

e una carenza invece di tutti i metaboliti a valle. Da notare che il licopene è il carotenoide predominante nella bacca di pomodoro (e quello di maggior interesse salutistico); le analisi mostrano che nelle bacche dei genotipi *wild-type* il licopene è presente nella sua forma *all-trans*, mentre nel siero e nei tessuti umani, è sempre presente prevalentemente nella forma *cis*, fatto questo che suggerisce una maggiore biodisponibilità dell'isomero *cis* (Boileau et al., 2002), e quindi uno specifico valore del mutante *tangerine*, la cui mutazione porta appunto ad accumulare l'isomero *cis*, più biodisponibile. Va comunque notato che un'estensiva isomerizzazione del licopene dalla forma *all-trans* alla forma *cis* avviene nelle cellule intestinali (Richelle et al., 2010).

Altri mutanti caratterizzati per perdita o guadagno di funzione in specifici *step* della via dei carotenoidi accumulano specifici carotenoidi; il mutante *Delta* (*Del*), ad esempio, sovraesprime la licopene- ϵ -ciclasi (Ronen et al., 2002), che converte il *trans*-licopene in δ -carotene, e mostra a maturità elevati livelli di questo carotenoide e di luteina, il carotenoide immediatamente più a valle, mentre ha livelli bassi delle altre xantofille, che vengono formate nella seconda diramazione del tratto finale della via biosintetica (fig. 1 e 2a). Il mutante *Beta* (*B*, fig. 2a) sovraesprime invece una licopene- β -ciclasi (Ronen et al., 2000) e questo guadagno di funzione porta alla situazione opposta a quella discussa per il mutante *Del*, con un forte accumulo soprattutto di β -carotene (fig. 2b).

Questi esempi evidenziano come negli ultimi 20 anni siano stati individuati nel pomodoro tutti i principali mutanti della via biosintetica dei carotenoidi, e come questi siano stati caratterizzati dal punto di vista del livello e tipo dei carotenoidi accumulati (e quindi potenzialmente interessanti dal punto di vista nutrizionale). L'analisi genetica ha portato poi a individuare i geni responsabili e a studiarne le caratteristiche strutturali e funzionali. Le sequenze dei geni responsabili dei fenotipi mutanti in pomodoro hanno consentito successivamente di identificare i geni omologhi in altre specie di Solanacee, infine utilizzate come *markers* nella selezione assistita.

ARANCIO ROSSO: BIOLOGIA MOLECOLARE DI UN PRODOTTO IGP

L'arancio rosso di Sicilia (*Citrus sinensis*), coltivato esclusivamente in alcune zone delle province di Siracusa e Catania, riconducibile a un gruppo di selezioni derivate dalle varietà Tarocco, Moro e Sanguinello, ha ricevuto nel 1997, con circolare del Ministero delle Politiche Agricole, lo status di "IGP" (Indicazione Geografica Protetta). Ciò che caratterizza i frutti dell'arancio rosso di Sicilia è un marcato accumulo di pigmenti rossi nella buccia,

nella polpa, o in entrambi i tessuti. Tali pigmenti rientrano nel gruppo degli antociani, composti fenilpropanoidi accumulati nei vacuoli delle cellule dei frutti.

La ricerca genetica ha studiato in grande dettaglio i fattori che contribuiscono alla comparsa di questo prezioso fenotipo; in particolare, nel caso dei frutti dell'arancio rosso i fattori che intervengono sono sia genetici che ambientali, fatto quest'ultimo che giustifica pienamente l'adozione e il significato dell'IGP. In particolare, il CRA-ACM, con la collaborazione di alcune istituzioni italiane (Università cattolica, Fondazione di Ricerca e Cura "Giovanni Paolo II", Campobasso; Istituto Europeo di Oncologia (IEO), Milano; DISTAM, Divisione di nutrizione umana, Milano; Congenia Srl, Milano; Dipartimento di Scienze biomolecolari e biotecnologia, Università di Milano) ed estere (John Innes Center di Norwich), ha svolto negli anni una intensa attività di caratterizzazione sia del valore salutistico dei composti contenuti nel germoplasma dell'arancio pigmentato, sia dei suoi determinanti fattori genetici. Infatti, se le antocianine da un lato determinano particolari qualità attrattive del frutto per il loro colore rosso brillante, dall'altro esercitano un ruolo ancora più importante per le loro proprietà farmacologiche e antiossidanti, ancora attivamente studiate sia in modelli animali che nell'uomo. È stato evidenziato, nella letteratura medica specialistica, il ruolo di una dieta ricca in antociani dal punto di vista del controllo dell'obesità e del diabete, della prevenzione delle malattie cardiovascolari, del miglioramento delle funzioni visive e cerebrali, e di altri possibili effetti benefici ancora (Tsuda, 2012). Alcune ricerche recenti, condotte sui topi associando a una dieta particolarmente ipercalorica succo di arancio rosso, biondo o acqua, hanno messo in evidenza un interessante effetto dimagrante da ascrivere al gruppo di antociani specificamente presenti nelle arance di Sicilia (cianidine, delphinidine e peonidine) e assenti nel germoplasma biondo; l'attività antiossidante ORAC del succo proveniente dalle arance Moro, Tarocco e Sanguinello varia infatti da 1700 a 2800 μmol di Trolox-equivalenti/100 mL di succo, mentre l'attività nel succo di arance bionde (es. cvs. Navel, Valencia e Vaniglia) resta sotto i 1400 μmol di TE/100 mL. Alla forte attività antiossidante del succo dell'arancia rossa si aggiungono evidenze sperimentali su modelli animali della sua azione anti-obesità (Titta et al., 2010), mentre eventuali effetti sinergici con altri composti presenti nei frutti e il meccanismo di azione nell'organismo umano, sono ancora oggetto di studio (Titta et al., 2010; Tsuda, 2012).

Quali sono i geni che determinano l'accumulo di questi antociani nei frutti dell'arancio rosso di Sicilia e quindi così forti effetti salutistici? La ricerca genetica ha preso in considerazione sia i geni strutturali e le loro eventuali va-

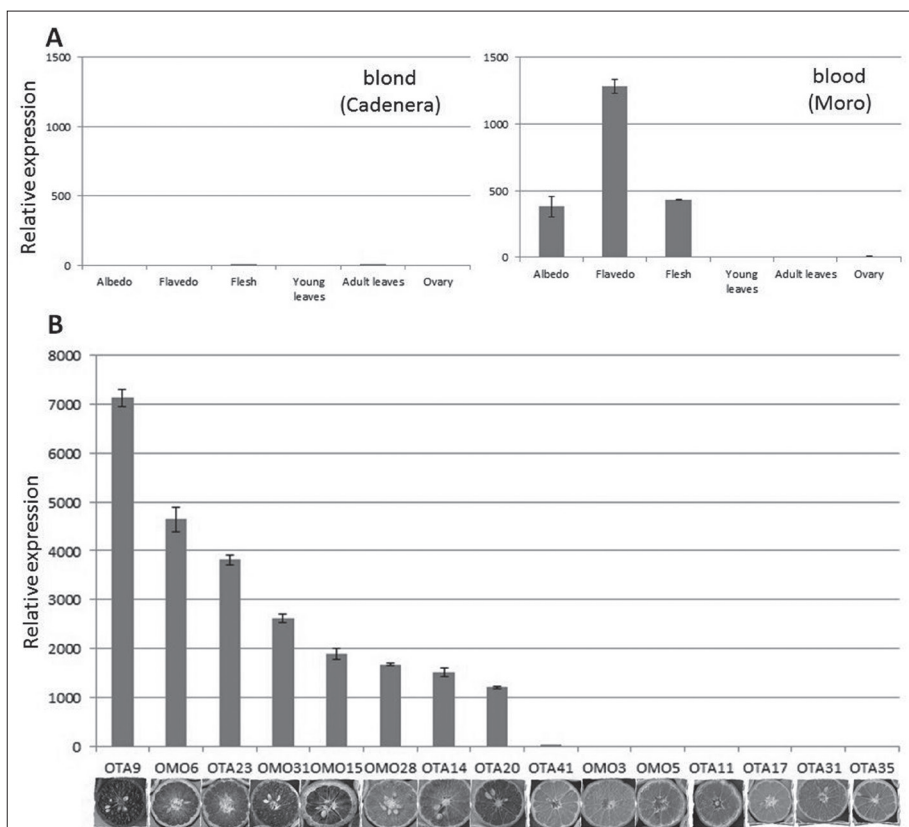


Fig. 3 A, trascrizione tessuto-specifica del gene *Ruby* nei frutti di arancio rosso; B, livelli di trascrizione del gene *Ruby* nei frutti di germoplasma di *Citrus* a diverso grado di pigmentazione.

rianti, sia i geni regolatori la cui attività potrebbe influenzare l'azione dei geni strutturali. In particolare, i livelli di trascrizione di un gene codificante per uno specifico fattore di trascrizione, chiamato *Ruby*, sono risultati correlare con l'accumulo di antocianine nelle arance rosse. Per arrivare a questo risultato, il trascritto di *Ruby* è stato verificato essere presente nei tessuti variamente pigmentati di arancio Moro, e comparato con la totale assenza nei corrispondenti tessuti delle varietà non pigmentate (fig. 3b). Inoltre, una collezione di germoplasma di *Citrus* a varie gradazioni di pigmentazione nella polpa è stata esaminata, verificando la presenza del trascritto di *Ruby* in relazione al contenuto di antociani (fig. 3b) (Butelli et al., 2012).

Per comprendere i dettagli strutturali del gene coinvolto nella determinazione della pigmentazione, il gene candidato *Ruby* è stato sequenziato in un ampio germoplasma del genere *Citrus*, comprendente il pummelo (*C. ma-*

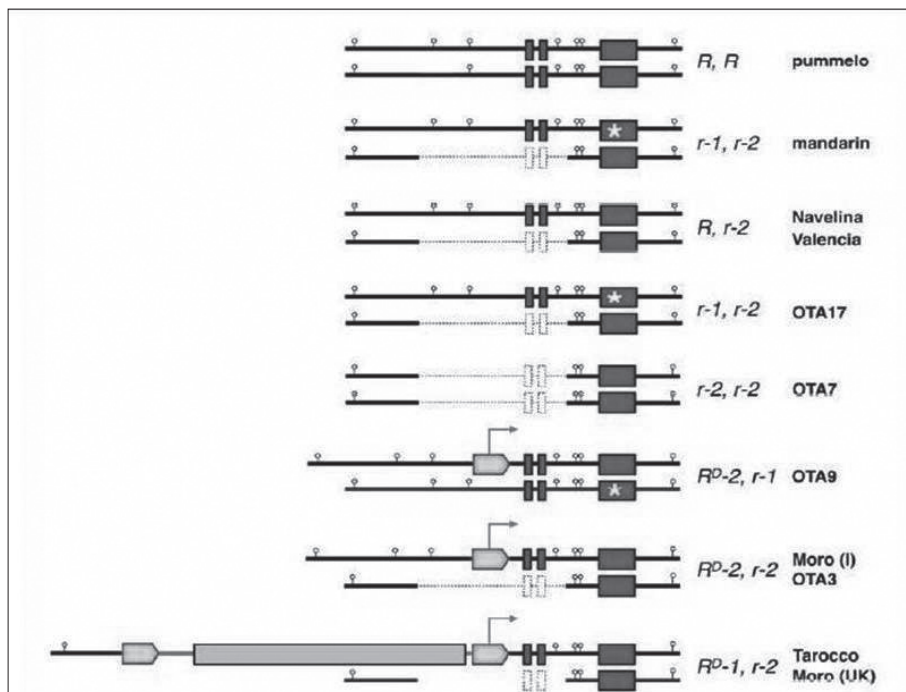


Fig. 4 Struttura fine del gene Ruby (in grigio scuro) nel germoplasma di Citrus. Gli asterischi indicano mutazioni nonsense, le parti punteggiate le delezioni, (vedi testo), le frecce rappresentano gli elementi LTR del retrotrasposone Tcs1 (in grigio chiaro). Le frecce rivolte in alto e a destra indicano il sito di inizio di trascrizione di Ruby. Figura tratta da Butelli et al. (2012)

xima) e il mandarino (*C. reticulata*), oltre che numerose varietà di arancio biondo e rosso, e le sequenze sono state confrontate. Nella regione codificante del gene *Ruby*, il lavoro di sequenziamento ha in effetti messo in luce una notevole quantità di “varianti” del gene, ma in nessun caso si poteva mettere in diretta relazione una specifica variante con il fenotipo pigmentato. Ad esempio, una variante integra del gene, priva sia di mutazioni *non senso* che di delezioni, è presente sia nel pummelo che nella varietà non pigmentata Navelina, oltre che nelle varietà Moro e Tarocco. Si è quindi ipotizzato che le forti differenze di trascrizione nel gene Ruby fossero dovute alle regioni regolatrici del gene. In effetti, il sequenziamento di queste regioni ha evidenziato un’inserzione di 5413 bp a monte del sito di inizio di trascrizione di Ruby, la cui sequenza mostra le caratteristiche di un retrotrasposone (Tcs1) *copialike*, fiancheggiato da due sequenze ripetute in tandem (LTR, *long tandem repeats*) di 501 bp alle estremità, e codificante, come tutti i retrotrasposoni attivi, proteine *Gag* e *Pol* complete e funzionanti, necessarie per la trascrizione

inversa e l'integrazione nel genoma ospite. Questo retrotrasposone (o almeno una delle sequenze LTR fiancheggianti, e per l'esattezza la 3' LTR) è sempre presente nel germoplasma pigmentato, e assente nel germoplasma biondo (fig. 4), tanto che questa particolare sequenza non è stata trovata nel recente sequenziamento dell'arancio biondo (<http://phytozome.net>). Inoltre, dal momento che le sequenze di Tcs1 identificate nel germoplasma pigmentato risultano identiche, si deve supporre che l'inserzione nel genoma dell'arancio, che ha dato origine alla linea pigmentata, sia relativamente recente (Butelli et al., 2012). In ogni caso, il sito di inizio della trascrizione del gene *Ruby* è stato individuato in una adenina 551 bp a monte del codone di inizio ATG, cadendo quindi in corrispondenza di uno degli elementi LTR del retrotrasposone Tcs1. In assenza di questo elemento, il gene *Ruby* non può essere trascritto, e il frutto risulta non accumulare antocianine, mentre in presenza delle 3' LTR, il gene *Ruby* può essere trascritto e il frutto sarà pigmentato.

Normalmente, la trascrizione dei retroelementi attivi come Tcs1 è repressa dal genoma dell'ospite, ma gli stress abiotici possono innescarla. È quello che accade anche nel caso di Tcs1 nel germoplasma pigmentato, nel quale le basse temperature (o meglio, la forte escursione termica fra giorno e notte) rappresentano l'elemento finale in grado di indurre il fenotipo tipico delle arance rosse di Sicilia (Butelli et al., 2012). Quello di questi frutti è pertanto un caso di una complessa interazione fra elementi genetici della pianta, elementi retrotrasponibili di origine virale, e specifiche condizioni climatiche, che concorrono a produrre l'accumulo degli antociani nel frutto, con tutte le potenzialità per la salute umana che ne derivano.

PATATA: BIOCHIMICA DEL COLORE DELLA PASTA

Solo recentemente le proprietà nutrizionali e salutistiche del tubero di patata (*Solanum tuberosum*) sono state pienamente riconosciute (Ezekiel et al., 2013). Oltre a una ben nota e ricca fonte di vitamina C e di sali minerali, negli ultimi anni i tuberi di patata sono stati al centro dell'attenzione anche per la loro capacità di accumulare carotenoidi e antociani. Esistono infatti nel germoplasma selvatico e coltivato di patata tutte le tonalità del colore della pasta, dal bianco quasi perfetto delle cv. Federica o Daifla e della specie selvatica *Solanum chacoense*, fino al giallo intenso delle cv. Regina e Melrose, e addirittura al giallo arancione di molte varietà diploidi di origine andina e della specie *Solanum phureja* da cui originano. Queste ultime varietà sono state riscoperte e rilanciate recentemente nella nicchia di mercato dei prodotti

“etnici” e si è assistito in anni recenti alla registrazione da parte di alcune fra le maggiori aziende sementiere di varietà diploidi, in verità poco produttive data la loro origine dalla specie selvatica *Solanum phureja*, ma dotate di caratteristiche nutrizionali interessanti, quali la capacità di accumulare nel tubero maturo elevate quantità di carotenoidi, composti la cui natura di anti-ossidanti, di precursori della vitamina A e di protettori da alcune malattie degenerative è stata discussa precedentemente (Brown et al., 2007). Nella tabella 1 sono riassunte le quantità di carotenoidi totali accumulate nei tuberi di alcune varietà di *Solanum*, rappresentative del germoplasma a pasta bianca, gialla o arancio rispettivamente; si noti come quantità particolarmente basse di carotenoidi vengano sintetizzate dalla specie selvatica *Solanum chacoense*, che produce piccoli tuberi a pasta bianca non commestibili a causa dell’elevato contenuto di glicoalcaloidi tossici.

L’interesse all’ottenimento di tuberi di patata a elevato contenuto di carotenoidi ha focalizzato l’attenzione di *breeders* e genetisti sulla possibilità di “biofortificare” i tuberi di patata (la terza coltura nel mondo come produzione) sia attraverso interventi di miglioramento genetico tradizionale, che mediante lo sviluppo di varietà transgeniche (Rosati et al., 2009).

Le patate transgeniche biofortificate sono state ottenute presso vari laboratori, fra cui il Centro Ricerche Casaccia dell’ENEA, o mediante trasformazione con geni batterici del *pathway* della biosintesi dei carotenoidi (Diretto et al., 2007a) o attraverso il silenziamento di geni come quello codificante per la licopene- ϵ -ciclasi, che favorisce l’accumulo di β -carotene e xantofille a scapito della luteina (Diretto et al., 2007b).

Tuttavia, la scarsa accettazione di prodotti transgenici da parte del consumatore, pur a fronte di una forte richiesta di cibi con caratteristiche nutrizionali e salutistiche elevate, ha indotto molti selezionatori a sviluppare varietà di patata ricche di carotenoidi mediante metodi tradizionali, e a studiare in dettaglio il germoplasma di *Solanum*, cercando di identificare gli effetti fenotipici delle varianti alleliche presenti ai diversi loci genici coinvolti, sequenziando tali varianti e associandole mediante analisi genetica all’accumulo di specifici profili di carotenoidi nei tuberi.

In questo tipo di ricerche, come già visto per il pomodoro, la determinazione del profilo di carotenoidi, mediante LC-PDA-MS, svolta presso il Laboratorio di biotecnologie verdi del Centro Ricerche Casaccia dell’ENEA, è risultata la tecnica di *metabolic profiling* d’elezione da affiancare all’analisi genetica e del germoplasma svolta presso il Centro di Ricerca per le Colture Industriali; in quest’ultimo Centro del CRA è infatti presente un’ampia collezione di varietà di patata, e vengono inoltre sviluppati nuovi cloni bioforti-

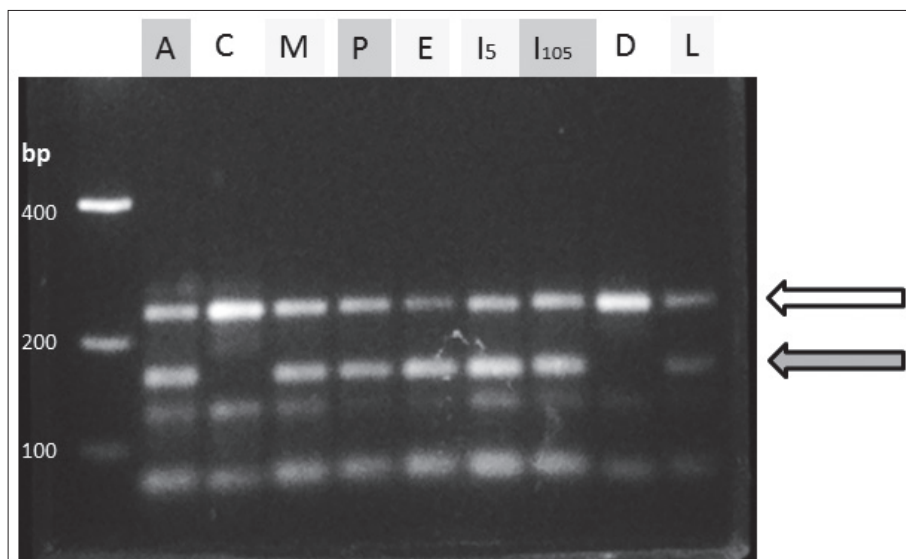


Fig. 5 Il gene *Chy2* per la β -carotene idrossilasi. Pannello A, il marcatore PCR che identifica il frammento da 163 bp specifico dell'allele 3 (anche denominato allele B) dominante, che determina l'accumulo di carotenoidi nei tuberi (freccia grigia); il frammento da 237 (freccia bianca) è diagnostico della versione recessiva del gene *Chy2* (alleli 2 o 5). Le lettere sopra l'immagine del saggio PCR si riferiscono ad alcuni genotipi a pasta bianca (C, S. chacoense; D, cv. Daifla), arancio (A, cv. Andean Sunrise; P, cv. Papa Pura, I₁₀₅, clone ISCI105/7-08) o gialla (M, cv. Mayan Gold; E, clone E60/1; I₅, cv. Melrose, L, cv. Laura).

ficati mediante miglioramento genetico tradizionale.

Il primo gene identificato come strettamente associato alla capacità di accumulare carotenoidi nei tuberi è stato il gene per la β -carotene idrossilasi 2 (*Chy2*). Questo enzima è responsabile della conversione del β -carotene in zeaxantina (fig. 1), è presente in molte varianti alleliche di cui solo una, dominante (allele 3), è sempre associata alla pasta del tubero color giallo o arancio, e quindi a un significativo accumulo di carotenoidi (Brown et al., 2006). Gli alleli recessivi finora identificati sono invece ben 10 (Wolters et al., 2010; Sturaro et al., 2012), e le varietà a pasta bianca sono omozigoti o eterozigoti per una qualsiasi combinazione di questi ultimi (gli alleli recessivi più comuni nel germoplasma bianco sono il 2 ed il 5), ma sono sempre prive dell'allele 3. La correlazione fra il livello di trascrizione del gene *Chy2* e l'accumulo di carotenoidi è stata in seguito dimostrata e confermata anche in tutte le varietà elencate in tabella 1 (Wolters et al., 2010; Sturaro et al., 2012), e sono stati sviluppati marcatori basati su saggi PCR in grado di "screenare" rapidamente materiale di *breeding* per identificare, in programmi di selezione assistita, i

	Genotipo	Specie	Ploidia	Contenuto di carotenoidi ($\mu\text{g/g DW}$)
varietà a pasta arancio	Yema de Huevo	<i>S. phureja</i>	2 n	n.d.
	Andean Sunrise	„	„	21.26 ± 1.84
	Papa Pura	„	„	29.68 ± 2.21
	ISCI 105/7-8	„	„	17.06 ± 1.29
varietà a Pasta gialla	Mayan Gold	„	„	35.25 ± 2.67
	E60	<i>S. tuberosum</i>	4 n	16.24 ± 1.81
	Fontane	„	„	15.50 ± 2.34
	Laura	„	„	30.12 ± 1.98
varietà a pasta bianca	ISCI 5/03-1	„	„	25.06 ± 1.52
	Daifla	„	„	4.74 ± 0.36
	S. chacoense	<i>S. chacoense</i>	2 n	1.74 ± 1.07

Tab. 1 Confronto del contenuto totale di carotenoidi in alcune varietà e specie di *Solanum* a diverso colore della pasta.

portatori delle varianti dominanti e recessive di questo gene-chiave per l'accumulo di carotenoidi (fig. 5).

Tuttavia il carattere dell'accumulo di carotenoidi nei tuberi è complesso e certamente diversi geni concorrono al fenotipo finale. Il *profiling* metabolico dei tuberi maturi identifica chiaramente, nel germoplasma che reca almeno una copia dell'allele dominante per la β -carotene idrossilasi 2, due diversi gruppi che si differenziano non per il contenuto di carotenoidi totali, che è piuttosto simile (tab. 1), ma per il tipo di carotenoide accumulato.

Il primo gruppo di varietà e cloni corrisponde alle varietà a pasta gialla, colore che può essere anche molto intenso. Tale colorazione è data da un accumulo di diversi carotenoidi, fra i quali la proporzione maggiore è sempre data dall'anteraxantina, con proporzioni minori ma significative di luteina, violaxantina, e infine zeaxantina e neoxantina. I carotenoidi in forma esterificata pure sono presenti in queste varietà in percentuali molto elevate, fino al

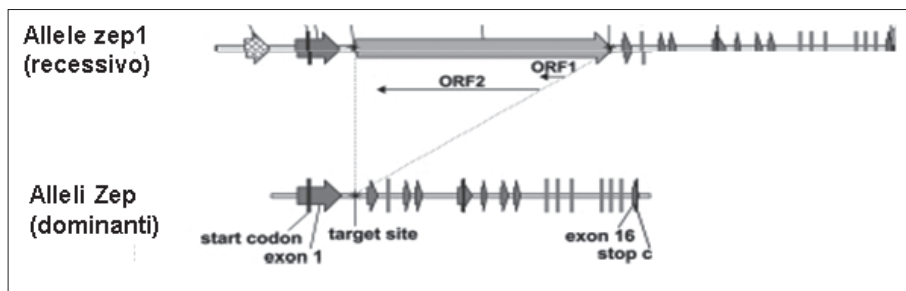


Fig. 6 Confronto fra la struttura in introni (linee orizzontali) ed esoni (frecche orientate a destra) dell'allele recessivo *zep1* caratteristico delle varietà a pasta arancio (in alto) e quella degli alleli dominanti *Zep* presenti nelle varietà a pasta gialla (in basso). Si noti la presenza di un trasposone da 4100 bp inserito nel primo introne (barra grigia spessa), e di una delezione da 49 bp nel 4° introne dell'allele *zep1*

40% dei carotenoidi totali. Il secondo gruppo, che include le varietà diploidi di origine andina derivanti dalla specie selvatica *Solanum phureja*, invece, accumulano la zeaxantina in quantità nettamente superiore a tutti gli altri carotenoidi (oltre il 75%), ed è questa caratteristica che conferisce loro il colore della pasta arancione. Oltre alla zeaxantina, sono presenti piccole quantità di luteina e anteraxantina, e pochi esteri.

Quali sono i determinanti genetici che provocano questa netta differenziazione? Abbiamo visto che il gene *Chy2* è responsabile solo della capacità di accumulare carotenoidi o meno, ma non determina lo specifico profilo di carotenoidi accumulati.

Recenti ricerche indicano che il gene che maggiormente determina la proporzione di zeaxantina sul totale dei carotenoidi (che differenzia il gruppo di varietà a pasta gialla da quelle a pasta arancio) è *ZEP*, che codifica la zeaxantina epossidasi, l'enzima che converte la zeaxantina nelle altre xantofille (violaxantina, neoxantina, ecc.). Anche in questo caso, la presenza di un allele "difettivo" per questo enzima, denominato *zep1*, è sufficiente, se presente allo stato omozigote, a provocare un accumulo di zeaxantina e quindi una carenza di tutti i carotenoidi a valle (Wolters et al., 2010). È interessante notare che anche nella determinazione del fenotipo "arancio" nella pasta dei tuberi (alta zeaxantina) è coinvolto un trasposone (fig. 6). Le analisi di sequenza sull'allele *zep1* infatti hanno messo in luce la presenza di un elemento trasponibile di 4.102 bp inserito nel primo introne e di una delezione di 49 bp nel quarto introne del gene *Zep*. Le ipotesi correnti suggeriscono che il trasposone alteri il "processamento" (splicing) e quindi la maturazione del trascritto primario (Wolters

et al., 2010). Tutte le varietà di colore arancio appartenenti al gruppo dei genotipi andini diploidi, sono omozigoti per l'allele *zep1*, e questo spiega il forte accumulo di zeaxantina in questi genotipi, mentre tutte le varietà a pasta gialla hanno almeno una copia delle varianti dominanti *Zep*, prive di trasposone, che vengono correttamente trascritte, consentendo così all'enzima di "smaltire" la zeaxantina nei carotenoidi a valle. È anche da notare che la elevata proporzione di zeaxantina, se è un carattere interessante dal punto di vista nutrizionale, è però associata anche a un grosso difetto tecnologico dei tuberi: una scarsissima dormienza, che fa sì che i tuberi delle varietà a pasta arancio siano del tutto inadatti a una prolungata conservazione, dal momento che germogliano molto rapidamente. Questa caratteristica negativa è dovuta al fatto che fra i prodotti finali di degradazione dei carotenoidi c'è anche l'acido abscissico (ABA, fig. 1), responsabile della dormienza delle gemme, e il blocco metabolico a livello della zeaxantina nei tuberi a pasta arancio ha come conseguenza, oltre alla scarsità dei carotenoidi a valle della zeaxantina, anche bassissimi livelli di ABA nei tuberi (Rosati et al., 2009).

Recenti ricerche sembrano anche indicare che non tutti gli alleli *Zep* dominanti (ne esistono almeno una dozzina) siano ugualmente associabili a una zeaxantina epossidasi perfettamente funzionale. La varietà che il Centro di Ricerca per le Colture Industriali del CRA ha recentemente iscritto al registro, Melrose, ha infatti 4 diversi alleli *Zep* dominanti (*Zep2/Zep3/Zep4/Zep5*), ma l'analisi genetica e il *profiling metabolico* della sua progenie da autofecondazione indicano che, associata alla segregazione degli alleli in diverse combinazioni, viene modulata anche la proporzione di zeaxantina accumulata, suggerendo che l'effetto fenotipico dei diversi alleli non sia, come ritenuto fino a oggi, del tutto equivalente, e indicando nuove strade per il *breeding* di varietà ad alta proporzione di zeaxantina, ma comunque capaci di produrre tuberi con un buon grado di dormienza.

CONCLUSIONE

I casi-studio sopra descritti mostrano come la ricerca genetica, supportata dall'avanzamento delle conoscenze sulle sequenze genomiche delle specie di interesse nutrizionale, e dallo sviluppo delle tecnologie di analisi dei composti in essi contenuti, abbia potuto negli ultimi anni arrivare a una comprensione dei determinanti genetici e ambientali e delle caratteristiche nutrizionali di molte specie che entrano nella nostra dieta quotidiana. Ab-

biamo anche cercato di descrivere come alcune importanti caratteristiche di questi prodotti siano associabili a specifiche mutazioni o varianti alleliche in pochi geni, e infine che alcuni elementi trasponibili giocano un ruolo importantissimo nel modellare il genoma delle specie agrarie, generando variabilità per caratteristiche legate al valore nutrizionale e alle proprietà salutistiche del prodotto finale.

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni lo sviluppo di nuove varietà di piante coltivate si è sempre più basato sull'accumularsi di conoscenze riguardanti i geni responsabili dei caratteri che conferiscono alle colture un elevato valore aggiunto, nutrizionale, salutistico o industriale.

I casi-studio che vengono presentati riguardano tre importanti colture: il pomodoro, l'arancio e la patata.

Nel pomodoro, sono noti da tempo numerosi mutanti con perdita o guadagno di funzione in diversi passaggi enzimatici della via biosintetica dei carotenoidi, composti a elevato valore nutrizionale e salutistico presenti in abbondanza nella bacca (ad esempio il licopene). Tali mutanti hanno fenotipi specifici, determinati dall'accumulo dei carotenoidi a valle e/o a monte del punto in cui si trova la funzione enzimatica mutata. Oltre ad aver costituito un importante strumento per la comprensione della via di sintesi dei carotenoidi, questi mutanti hanno un potenziale valore nutrizionale e costituiscono la base per molte innovazioni varietali.

L'arancio rosso, un importante prodotto IGP italiano, è tale essenzialmente perché un gene regolatore-chiave della biosintesi degli antociani (i composti che accumulandosi nel frutto conferiscono il caratteristico colore rosso) è presente in tutto il germoplasma dell'arancio, ma solo nella varietà rosse reca un elemento genetico trasponibile "aggiuntivo"; tale elemento conferisce al gene la possibilità di essere trascritto (anche con il concorso di basse temperature notturne), attivando così i geni strutturali per la biosintesi delle antocianine.

Infine, la varietà di colore della pasta dei tuberi di patata, già da tempo sfruttata dai *breeder*, e dovuta anche in questo caso all'accumulo di alcuni carotenoidi nei tuberi, è stata studiata a livello genetico, consentendo di capire che alcuni geni-chiave che controllano la via biosintetica dei carotenoidi sono presenti nel germoplasma in numerose varianti alleliche, e che la presenza o combinazione di alcuni di questi alleli in specifici *loci* genici, determina l'accumulo (pasta gialla o giallo-arancio) o la mancanza (pasta bianca) di carotenoidi nel tubero.

I casi studio presentati evidenziano quindi sia l'importanza della ricerca genetica per la comprensione dei tratti che conferiscono valore nutrizionale a un alimento, sia la necessità del mantenimento e dello studio del più ampio germoplasma possibile, allo scopo di introgredire caratteri e alleli utili nel corso del miglioramento genetico.

ABSTRACT

Development of plants for the production of biofortified food. Three cases. The increasing knowledge of the structure and function of the genes conferring to cultivated plants a high nutritional, health and qualitative value, is strongly influencing the development of new varieties. The cases of tomato, blood orange and potato are presented here.

In tomato, several genotypes have been identified as gain- or loss-of-function mutants at different enzymatic steps of the carotenoid biosynthetic pathway; carotenoids, such as lycopene, have a high nutritional and health value, and tomato berries are particularly rich in these compounds, especially lycopene. The identified mutants have often specific phenotypes, determined by the accumulation of carotenoids down- or upstream of the point where the mutated function is located. The analysis of these mutants not only represented an important tool for the understanding of the biosynthetic pathway of carotenoids, but also have the potential for the development of new varieties nutritionally improved.

Blood orange, an important Italian IGP product, has this specific phenotype due to a key regulator gene in the anthocyanins biosynthetic pathway. This gene is always present in orange germplasm, but only in blood orange is also present a portion of a transposable genetic element, conferring to the gene the possibility to be effectively transcribed, activating the downstream structural genes for the biosynthesis of anthocyanins and leading to the "blood" phenotype.

The variability in the color of potato tubers, already well known and exploited by breeders, is due to accumulation of carotenoids in the tuber flesh. This variability has been studied from the genetical point of view, leading to the discovery in potato germplasm of several allelic variants for some key genes involved in carotenoid biosynthesis; the presence or combination of these alleles at specific loci determines the accumulation in the yellow or orange flesh of the tubers of selected carotenoids, and therefore its potential nutritional value.

The cases presented here highlight the importance of genetic research for understanding the traits conferring nutritional and health value to the food; besides, it is underlined the importance of the maintenance and thorough analysis of as wide as possible germplasm, with the aim to discover and introgress useful alleles in the cultivated plants.

BIBLIOGRAFIA

- BALANDRIN M.F., KLOCKE J.A., WURTELE E.S., BOLLINGER W.H. (1985): *Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials*, «Science», 228, pp. 1154-1160.
- BARTLEY G.E., SCOLNIK P.A., GIULIANO G. (1996): *Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants*, «Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biology», 45, pp. 287-301.
- BOILEAU T.W.M., BOILEAU A.C., ERDMAN Jr. J.W. (2002): *Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene*, «Exp. Biol. Med.», 227, pp. 914-919.
- BROWN C.R., KIM T.S., GANGA Z., HAYNES K., DE JONG D., JAHN M., PARAN I., DE JONG W. (2006): *Segregation of total carotenoid in high level potato germplasm and its relationship to beta-carotene hydroxylase polymorphism*, «Am. J. Potato Res.», 83, pp. 365-372.

- BROWN C.R., CULLEY D., BONIERBALE M., AMORÓS W. (2007): *Anthocyanin, carotenoid content, and antioxidant values in native South American potato cultivars*, «Hort Science», 42, pp. 1733-1736.
- BUTELLI E., LICCIARDELLO C., ZHANG Y., LIU J., MACKAY S., BAILEY P., REFORGIATO-RECUPERO G., MARTIN C. (2012): *Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges*, «The Plant Cell», 24, pp. 1242-1255.
- DIRETTO G., AL-BABILI S., TAVAZZA R., PAPACCHIOLI V., BEYER P., GIULIANO G. (2007a): *Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway*, «PLoS ONE», 2, pp. e350.
- DIRETTO G., WELSCH R., TAVAZZA R., MOURGUES F., PIZZICHINI D., BEYER P., GIULIANO G. (2007b): *Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers*, «BMC Plant Biol.», 7, pp. 11.
- EVERITT A.V., HEILBRONN L.K., LE COUTEUR D.G. (2010): *Food intake, life style aging and human longevity*, in: *Calorie restriction, aging and longevity*, Everitt, Rattan, Le Couteur and Cabo (eds.), Springer, Netherlands, pp. 15-42.
- EZEKIEL R., SINGH N.K., SHARMA S.K., KAUR A. (2013): *Beneficial phytochemicals in potato: A review*, «Food Research International», 50, pp. 487-496.
- FANTINI E., FALCONE G., FRUSCIANTE S., GILIBERTO L., GIULIANO G. (2013): *Dissection of Tomato Lycopene Biosynthesis through Virus-Induced Gene Silencing*, «Plant Physiol.», 163, pp. 986-998.
- FIGHN O. (2002): *Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes*, «Plant Mol. Biol.», 48, pp. 155-171.
- FRAY R.G., GRIERSON D. (1993): *Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression*, «Plant Mol. Biology», 22, pp. 589-602.
- GALPAZ N., RONEN G., KHALFA Z., ZAMIR D., HIRSCHBERG J. (2006): *A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus*, «The Plant Cell», 18, pp. 1947-1960.
- GIBNEY M.J., WALSH M., BRENNAN L., ROCHE H.M., GERMAN B. et al. (2005): *Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges*, «Am. J. Clin. Nutr.», 82, pp. 497-503.
- GIULIANO G., BARTLEY G.E., SCOLNIK P.A. (1993): *Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development*, «The Plant Cell», 5, pp. 379-387.
- GOLDBERG G. (2003): *Plants: diet and health. The report of a British nutrition foundation task force*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 347 p.
- HIRSCHBERG, J. (2001): *Carotenoid biosynthesis in flowering plants*, «Curr Opin Plant Biol.», 4, pp. 210-218.
- HOUNSOME N., HOUNSOME B., TOMOS D., EDWARD-JONES G. (2008): *Plant metabolites and nutritional quality of vegetables*, «J. of Food Science», 73, pp. R48-R65.
- ISAACSON T., RONEN G., ZAMIR D., HIRSCHBERG J. (2002): *Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants*, «The Plant Cell», 14, pp. 333-342.
- KRINSKY N.I., JOHNSON E.J. (2005): *Carotenoid actions and their relation to health and disease*, «Molecular Aspects of Medicine», 26, pp. 459-516.
- PETERS S.A., BARGSTEN J.W., SZINAY D., VAN DE BELT J., VISSER R.G., BAI Y., DE JONG H. (2012): *Structural homology in the Solanaceae: analysis of genomic regions in support of synteny studies in tomato, potato and pepper*, «Plant J.», 71, pp. 602-614.
- RICHELLE M., SANCHEZ B., TAVAZZI I., LAMBELET P., BORTLIK K., WILLIAMSON G.

- (2010): *Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects*, «British Journal of Nutrition», 103, pp. 1800-1807.
- RICK CM (1978): *The Tomato*, «Sci. Amer.», 239, pp. 76-87.
- RONEN G., COHEN M., ZAMIR D., HIRSCHBERG J. (1999): *Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta*, «Plant J.», 17, pp. 341-351.
- RONEN G., CARMEL-GOREN L., ZAMIR D., HIRSHBERG J. (2000): *An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 97, pp. 11102-11107.
- ROSATI C., DIRETTO G., GIULIANO G. (2009): *Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects*, «Biotechnology and Genetic Engineering Reviews», 26, pp. 151-174.
- SAXENA A., CRAMER C.S. (2013): *Metabolomics. A potential tool for breeding nutraceutical vegetables*, «Adv. in Crop Sci. and Technol.», 1, pp. e106.
- STURARO M., ONOFRI C., DIRETTO G., SULLI M., GIULIANO G., PARISI B., MANDOLINO G. (2012): *Genetic analysis of tuber flesh colour in potato*, Abstracts of the SOL2012 – 9th Solanaceae Conference, Neuchâtel (CH), August 26-30, p. 134.
- THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2011): *Genome sequence and analysis of the tuber crop potato*, «Nature», 475, pp. 189-197.
- THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012): *The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution*, «Nature», 485, pp. 635-641.
- TITTA L., TRINEI M., STENDARDO M., BERNIAKOVICH I., PETRONI K., TONELLI C., RISO P., PORRINI M., MINUCCI S., PELICCI P.G., RAPISARDA P., REFORGIATO RECUPERO G., GIORGIO M. (2010): *Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice*, «Int. J. Of Obesity», 34, pp. 578-588.
- TSUDA T. (2012): *Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies*, «Mol. Nutrition & Food Research», 56, pp. 159-170.
- XU Q., CHEN L.-L., RUAN X., CHEN D., ZHU A., CHEN C., BERTRAND D., JIAO W.-B., HAO B.-H. ET AL. (2013): *The draft genome of sweet orange (Citrus sinensis)*, «Nature Genetics», 45, pp. 59-66.
- WOLTERS A-M.A., UITDEWILLIGEN J.G.A.M.L., KLOOSTERMAN B.A., HUTTEN R.C.B., VISSER R.G.F., VAN ECK H.J. (2010): *Identification of alleles of carotenoid pathway genes important for zeaxanthin accumulation in potato tubers*, «Plant Mol. Biol.», 73, pp. 659-671.