

La genomica per la valorizzazione della filiera del pomodoro

INTRODUZIONE

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle colture vegetali più importanti per l'alimentazione umana, come dimostra la sua elevata produzione a livello mondiale, che include la produzione del pomodoro da consumo fresco e quella per l'ottenimento di prodotti trasformati, quali pelati, salse e cubettati. L'Italia è uno dei paesi maggiori produttori di pomodoro, essendo presente sul mercato sia del prodotto fresco che di quello trasformato. La produzione di pomodoro in Italia nell'ultimo triennio (2007-2009) ha avuto un leggero trend positivo, nonostante la forte concorrenza di paesi emergenti nel settore, quali la Cina e alcuni Paesi che si affacciano sul Mediterraneo. Per poter ampliare questo trend è cruciale valorizzare ulteriormente tutti i diversi comparti della filiera del pomodoro, dalla materia prima a tutti i prodotti trasformati da essa ottenuti. A tale scopo, tra i vari obiettivi che sono attuali per il miglioramento genetico delle varietà di pomodoro da destinare alla trasformazione industriale, la cui realizzazione può comportare un sicuro vantaggio in termini di maggior valore aggiunto dei prodotti trasformati, rientrano una più spinta diversificazione varietale, un ridotto uso di sostanze antiparassitarie per ottenere prodotti più salubri, e un incremento nel frutto di alcune sostanze che aumentano il valore nutrizionale e salutistico del pomodoro e dei suoi derivati.

Per il raggiungimento di tali obiettivi, il contributo di nuovi strumenti di genomica, che possono affiancare l'enorme patrimonio genetico disponibi-

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

le oggi per il pomodoro, è sicuramente notevole e di grossa efficacia, sia in termini di riduzione dei tempi di realizzazione che in termini di maggiori possibilità di ottenere prodotti, altrimenti non realizzabili.

Tra gli strumenti di genomica che possono favorire lo sviluppo del miglioramento genetico del pomodoro (tab. 1) vi sono un elevato numero di marcatori molecolari, molti dei quali con localizzazione nota su diverse mappe genetiche, diverse piattaforme per l'analisi trascrittomica, oltre a tutte le informazioni che giorno dopo giorno provengono dal progetto di sequenziamento del genoma di pomodoro, che vede coinvolta anche l'Italia con il sequenziamento del cromosoma 12 (Barone et al., 2008). Infine, in continua evoluzione sono anche i database e i software necessari per l'elaborazione e l'utilizzazione della crescente mole di dati che si origina dall'uso di tali risorse genomiche. Molte delle informazioni relative alle risorse genetiche e genomiche disponibili per il pomodoro sono reperibili sul sito del SOL Genomics Network, all'indirizzo <http://solgenomics.net>. Le risorse genomiche, combinate con l'uso di specifiche risorse genetiche disponibili per il pomodoro, quali popolazioni omozigoti permanenti che portano regioni specifiche di genoma di una specie selvatica nel background di una varietà coltivata, le linee di introgressione (Eshed e Zamir, 1995), sono particolarmente utili per lo studio di caratteri quantitativi e l'identificazione di geni candidati al controllo di tali caratteri (Barone et al., 2009).

Nel presente lavoro verranno riportati alcuni esempi sull'uso combinato di risorse genetiche e genomiche nel miglioramento genetico del pomodoro finalizzato a favorire lo sviluppo di una filiera di qualità per questa specie.

RISORSE GENOMICHE
Marcatori molecolari (oltre 2.500)
Mappe molecolari e fisiche
Collezioni di EST (oltre 200.000)
Librerie BAC
Piattaforme microarray
Librerie VIGS
Piattaforme TILLING
Sequenziamento BAC by BAC e Whole genome shot-gun
Database bioinformatici

Tab. 1 *Elenco delle risorse genomiche disponibili a oggi per il pomodoro*

I MARCATORI MOLECOLARI A TUTELA DELLA DIVERSIFICAZIONE VARIETALE

La necessità di diversificare il prodotto commerciale, come prodotto fresco o trasformato, nasce dalle richieste del mercato di consumatori sempre più esigenti nel gusto, più ricercato e variabile, e che sono disposti a pagare un valore aggiunto per pomodori da destinare a piatti diversi. Basti pensare alle diverse qualità organolettiche di pomodori quali il san Marzano, il pomodoro di Sorrento, o di varie tipologie di pomodorini. Nasce anche dall'esigenza degli agricoltori di coltivare varietà/ecotipi che hanno specifici requisiti per i consumatori ma che richiedono anche diverse cure colturali e maggiori costi di produzione. Pertanto, la diversificazione varietale può essere vantaggiosa per diversi settori della filiera, ma può essere promossa solamente se viene tutelata adeguatamente.

In questo contesto, si inserisce l'uso di marcatori molecolari, capaci di tracciare il DNA di una varietà/ecotipo lungo tutta la filiera. A oggi, per il pomodoro, esistono molti tipi di marcatori che possono essere utilizzati a questo scopo, tra cui marcatori AFLP, MFLP, SSR, con un elevato potere di risoluzione, oltre a un crescente numero di marcatori SNP, le cui informazioni relative sono accessibili alla comunità internazionale su diversi siti (<http://solgenomics.net>; <http://www.tomatomap.net>; <http://solcap.msu.edu>). L'uso combinato di questi diversi tipi di marcatori consente di realizzare un vero e proprio fingerprinting (fig. 1) delle varietà/ecotipi che si intende tutelare a difesa sia dei diritti dei produttori che dei consumatori. Negli ultimi anni, sono in corso di utilizzazione anche sistemi più avanzati di analisi genomica con strumenti di tipo array, che permettono di evidenziare polimorfismi in un centinaio di frammenti di DNA contemporaneamente, consentendo un'analisi di variabilità molto efficiente e rapida (Sim et al., 2009).

Naturalmente, il vero problema della tracciabilità dei prodotti trasformati è la ricerca di marcatori che possano essere ben evidenziati anche sul DNA estratto, non più dal frutto tal quale, ma da una matrice alimentare che è stata soggetta a processi di sterilizzazione ad alte temperature. Questi, infatti, causano una notevole degradazione del DNA in frammenti di piccola dimensione, sui quali può essere estremamente difficoltoso realizzare analisi molecolari affidabili. In questo caso, va effettuata una ricerca sia di un protocollo idoneo per l'estrazione del DNA su tali prodotti sottoposti al processo di trasformazione che del marcatore molecolare più adatto a identificare gli stessi polimorfismi che vengono rilevati sul prodotto fresco. Questi, nel caso del pomodoro, sono i presupposti fondamentali per potere realizzare tracciabilità dal prodotto fresco a quello trasformato. In tale contesto si inserisce l'attività

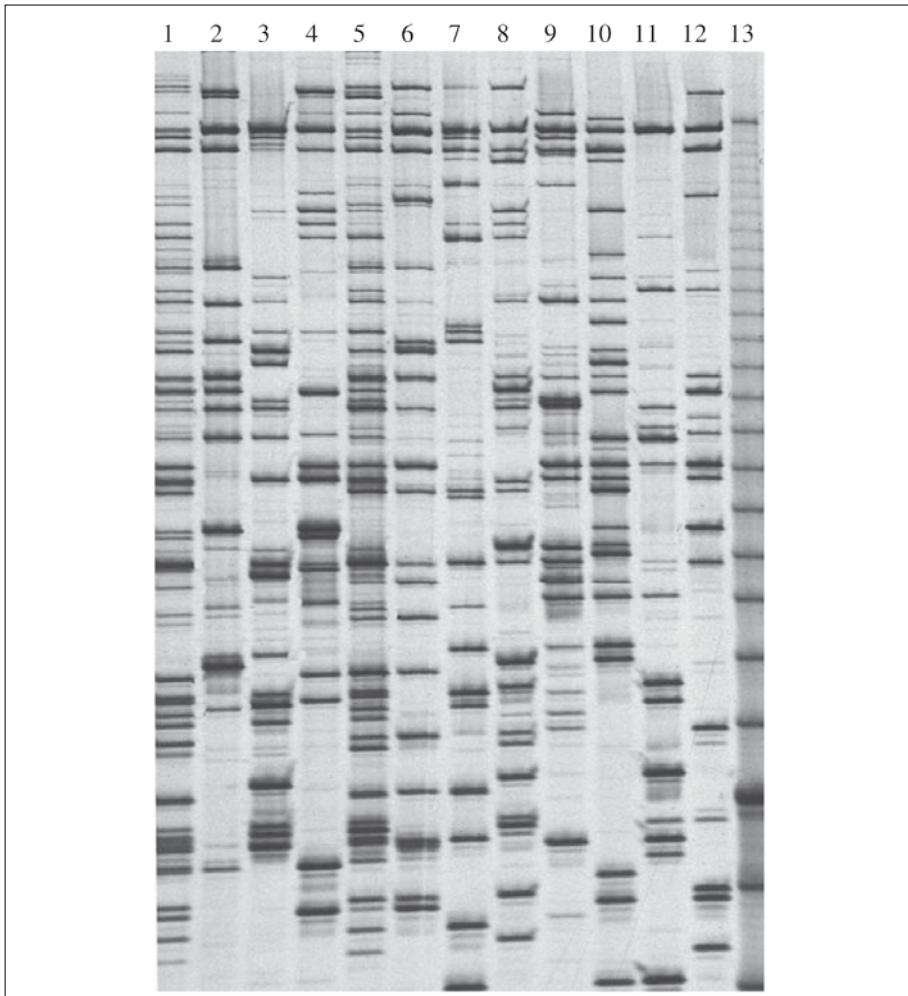


Fig. 1 *Fingerprinting di 12 varietà/ecotipi di pomodoro realizzato mediante marcatori AFLP. 1=san Marzano SQU, 2=Roma, 3= Vesuvio Foglia Riccia, 4=Pizzo AC, 5=Marmande, 6=san Marzano BATT, 7=san Marzano SCHI, 8=Parmì, 9=Sorrento ADG, 10=san Marzano Sel8, 11=Sorrento ART, 12=Vesuvio 2001, 13=Marcatore di pesi molecolari (Ercolano et al., 2008)*

di ricerca svolta nel laboratorio della Prof.ssa Rao del nostro Dipartimento, che ha individuato sia il protocollo più idoneo per l'estrazione del DNA che marcatori di tipo SSR che sono altamente ripetibili nella foglia, nel frutto e nel prodotto inscatolato della stessa varietà (Caramante et al., 2010 submitted). Pertanto, l'uso di tali marcatori oggi è consigliato per realizzare il fingerprinting delle varietà di pomodoro e per tutelare la tracciabilità della filiera.

LA SELEZIONE ASSISTITA PER L'OTTENIMENTO DI UN PRODOTTO SALUBRE

Un altro obiettivo che si può realizzare per valorizzare la qualità della filiera di pomodoro è quello di ottenere nuove varietà di pomodoro che siano maggiormente tolleranti ai diversi patogeni e parassiti che attaccano il pomodoro in tutte le fasi di sviluppo e tessuti, dalle radici al frutto, causando ingenti danni economici per le notevoli perdite di produzione. Per difendersi da questa perdita, spesso vengono utilizzati molti prodotti antiparassitari di natura chimica, che naturalmente possono causare danni alla salute dei consumatori e dei coltivatori che li usano. Pertanto, la disponibilità di varietà tolleranti può sicuramente limitare l'uso di antiparassitari, consentendo una coltivazione di un pomodoro più salubre.

Per questa specie, il lavoro di miglioramento genetico per l'ottenimento di varietà resistenti a patogeni è facilitato dalla disponibilità di una mappa densa di marcatori molecolari, sulla quale sono stati localizzati geni di resistenza a oltre 35 patogeni, dei quali 17 sono stati anche clonati e sequenziati (Arens et al., 2010). Ciò consente di costruire marcatori molecolari idonei alla selezione assistita, e cioè marcatori molecolari che identificano polimorfismi o all'interno del gene di resistenza stesso o in regioni a esso molto vicine, e che possono essere utilizzati per selezionare le piante resistenti nel corso dei programmi di incrocio finalizzati a trasferire il gene da una varietà resistente a quella suscettibile che si intende migliorare. Nel nostro laboratorio sono stati individuati marcatori molecolari per poter seguire il trasferimento di geni di resistenza a diversi patogeni (fig. 2), quali il virus TSWV, TMV, il nematode *Melodogyne incognita*, il fungo *Verticillium* e altri patogeni che attaccano il pomodoro (Barone et al., 2004; Langella et al., 2004). Tali marcatori sono stati utilizzati sia per realizzare il trasferimento di singoli geni tra una varietà e un'altra, sia per realizzare il pyramiding di più geni di resistenza nello stesso genotipo (fig 3; Barone et al., 2005). Tale attività di selezione assistita da marcatori molecolari (MAS) risulta molto efficiente anche su vasta scala, soprattutto oggi che si possono utilizzare tecnologie che consentono l'automazione di molti marcatori molecolari, facilitando tale lavoro routinario su un elevato numero di piante, come dimostra il fatto che la MAS è stata già utilizzata in pomodoro non solo da istituti di ricerca pubblici, ma anche da molte ditte sementiere per la produzione di materiale selezionato da destinare alla vendita di seme (Fooad, 2007). Pertanto, l'identificazione di un numero sempre maggiore di geni di resistenza, e di marcatori per poterli monitorare, è un obiettivo che continuamente si deve perseguire allo scopo di aumentare la salubrità del pomodoro sia per consumo fresco che destinato alla trasformazione industriale.

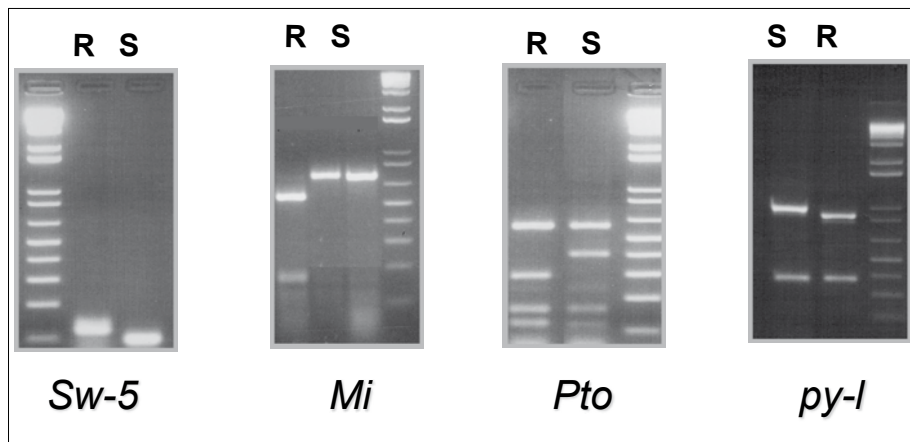


Fig. 2 Marcatori molecolari di tipo CAPS per rilevare polimorfismo tra genotipi resistenti (R) e suscettibili (S) a diversi patogeni che attaccano il pomodoro. Sw-5=gene di resistenza al Tomato Spotted Wilt Virus, Mi=gene di resistenza al nematode *Meloidogyne incognita*, Pto=gene di resistenza al batterio *Pseudomonas syringae* var. *tomato*, py-l=gene di resistenza al fungo *Pyrenochaeta lycopersici*

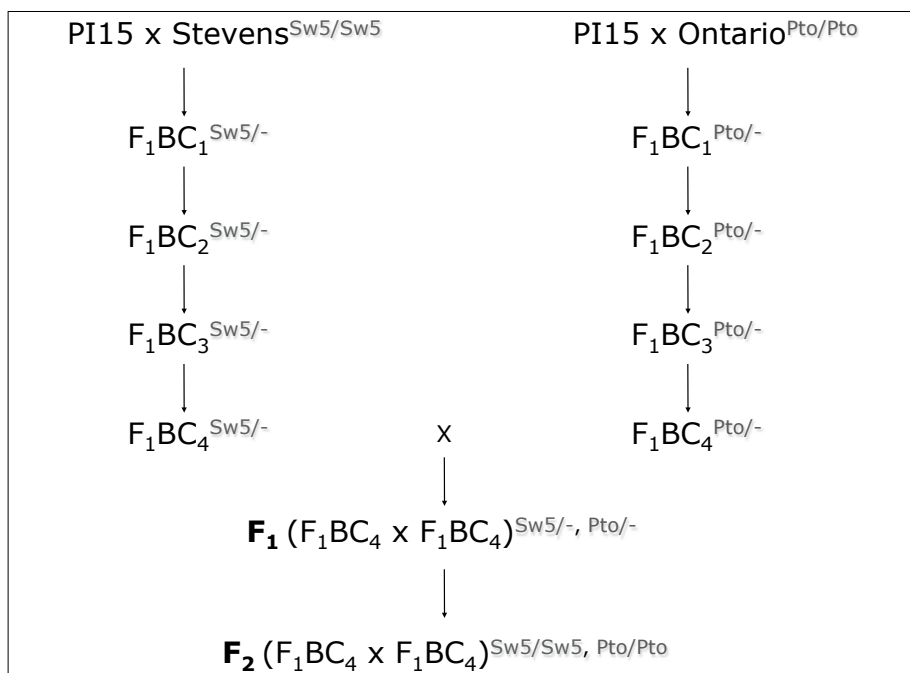


Fig. 3 Schema di incrocio proposto per realizzare il pyramiding di due geni di resistenza (Sw5 e Pto) nello stesso genotipo di pomodoro PI15 da migliorare per resistenza a patogeni (Barone e Frusciante, 2007)

L'IDENTIFICAZIONE DI GENI CANDIDATI PER UN PRODOTTO CON MIGLIORI CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI E SALUTISTICHE

Infine, negli ultimi anni grande attenzione è stata posta all'uso di alimenti che possono contribuire a migliorare gli apporti di sostanze nutrizionali alla dieta umana e animale, nonché avere proprietà benefiche per la salute umana. Il pomodoro, in particolare, rappresenta un'importante fonte di sostanze antiossidanti, quali vitamina C e fenoli, che hanno effetti protettivi contro alcune malattie croniche e degenerative; la vitamina C, inoltre, può contribuire a migliorare la tolleranza a stress, sia biotici che abiotici, e la qualità del frutto in post-raccolta.

Il lavoro per migliorare il contenuto di vitamina C nei frutti di pomodoro, così come quello di determinate sostanze fenoliche, è reso particolarmente complesso dalla natura quantitativa di questi caratteri, e cioè dal fatto che sono controllati da più geni, ciascuno con un piccolo effetto, e sono fortemente influenzati dall'ambiente. In questo contesto, è particolarmente utile, per ridurre la complessità di tale studio, combinare l'uso di risorse genomiche con specifiche risorse genetiche, che potrà consentire di realizzare schemi di selezione assistita anche per caratteri quantitativi, come proposto nella figura 4. Nel nostro laboratorio, per ricercare geni candidati al controllo del contenuto in vitamina C nelle bacche mature di pomodoro, è stata applicata tale strategia mediante l'uso di una popolazione di linee di introgressione della specie selvatica *Solanum pennellii* nel background della specie coltivata *S. lycopersicum*. Dall'analisi del contenuto in vitamina C effettuata su circa 50 linee di introgressione, ne sono state individuate due (IL7-3 e IL 12-4) con livelli più elevati di tale metabolita nella bacca matura (Di Matteo et al., 2010). Allo scopo di identificare i geni-chiave che controllano tale incremento è stata effettuata un'analisi trascrittomica mediante utilizzo di una piattaforma Combimatrix, che contiene più di 20.000 putativi geni di pomodoro. Da tale analisi, condotta sulla linea IL12-4, sono stati individuati oltre 200 geni differenzialmente espressi tra la linea ad alto contenuto di vitamina C e il controllo. Per alcuni di questi geni è stato ipotizzato un coinvolgimento nei processi di sintesi e accumulo di vitamina C nel frutto (Di Matteo et al., 2010 submitted). Questi geni sono in corso di studio con tecniche che permettono di verificarne il reale coinvolgimento nell'incrementare i livelli di vitamina C nel frutto. Quelli che verranno confermati come geni-chiave, mediante tecniche di silenziamento e/o di sovraespressione genica, saranno utilizzati per costruire marcatori molecolari idonei per la selezione assistita.

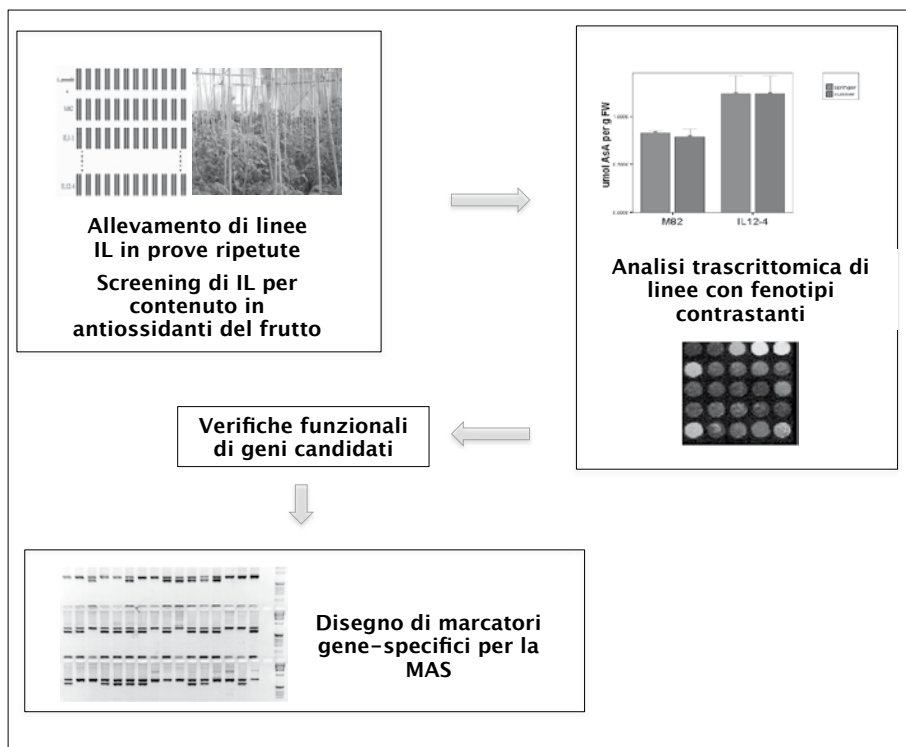


Fig. 4 Schema di breeding assistito proposto per il trasferimento di geni che controllano caratteri quantitativi, mediante uso combinato delle linee di introgressione (IL) e di una piattaforma per l'analisi trascrittomiche

Lo stesso approccio di genomica integrata è stato seguito per identificare geni per il controllo del contenuto di fenoli nel frutto, utilizzando la serie di geni differenzialmente espressi tra la linea IL7-3 e il controllo, in quanto la linea IL7-3, oltre a evidenziare un elevato contenuto di vitamina C nel frutto presenta anche un elevato contenuto di fenoli. Quest'ultimo carattere è particolarmente interessante per i derivati del pomodoro, in quanto è stato dimostrato che i composti antiossidanti di tipo flavonoidi, al contrario della vitamina C, si conservano nel prodotto trasformato, dopo avere subito il processo industriale di sterilizzazione (Capanoglu et al., 2008). Infine, schemi di incrocio tra le due linee di introgressione sono in corso di realizzazione da due anni, allo scopo di cumulare nella stessa linea migliorata sia i geni per l'aumento del contenuto di vitamina C che quelli per l'incremento dei fenoli nel frutto, sviluppando uno schema di pyramiding simile a quello proposto per i geni di resistenza a patogeni.

CONCLUSIONI

Le grosse potenzialità che gli strumenti di genomica offrono al miglioramento genetico del pomodoro sono chiaramente evidenti, grazie ai risultati che l'intera comunità scientifica e le ditte sementiere stanno ottenendo negli ultimi anni (Lippman, 2007). Tali potenzialità saranno ulteriormente rafforzate dalle informazioni derivanti dal sequenziamento del genoma di pomodoro, che sarà completato entro il 2010. Dati preliminari provenienti dal progetto internazionale di sequenziamento attualmente mettono già in evidenza mediamente nel genoma di pomodoro un gene ogni 6 kb, con dimensione media di 996 bp e presenza di 3.7 esoni per ciascun gene. Complessivamente è stato perciò stimato che il genoma di pomodoro contenga circa 40.000 geni (Mueller et al., 2009). Inoltre, un numero elevato di strumenti bioinformatici sono stati generati nell'ambito di tale progetto e questi permetteranno sia ai ricercatori che ai breeder di poter utilizzare le sequenze disponibili oggi e nel prossimo futuro. Tali informazioni porteranno, infatti, alla conoscenza dei geni, delle loro funzioni e alla loro precisa localizzazione sui cromosomi del pomodoro, requisiti fondamentali per poter costruire marcatori gene-specifici da utilizzare in programmi di selezione assistita finalizzati alla valorizzazione della filiera del pomodoro.

RINGRAZIAMENTI

Il lavoro è stato svolto grazie al contributo del Progetto Agronanotech, finanziato dal MiPAF, e del Progetto GenoPom, finanziato dal MiUR.

RIASSUNTO

L'Italia è uno dei paesi maggiori produttori di pomodoro, sia per consumo fresco che per i prodotti trasformati. Per poter incrementare ulteriormente la produzione è fondamentale valorizzare tutti i diversi comparti della filiera del pomodoro, a partire dalla realizzazione di diversi obiettivi di miglioramento genetico, finalizzati all'ottenimento di nuove materie prime. Questi possono essere realizzati con successo grazie anche all'ausilio di una vasta ricchezza di risorse genomiche oggi disponibili per il pomodoro, la cui utilizzazione viene riportata in alcuni esempi.

L'uso intensivo degli oltre 2500 marcatori molecolari descritti per il pomodoro può essere, infatti, di notevole aiuto nell'accelerare e rendere più efficiente i processi di diversificazione varietale e di ottenimento di un prodotto alimentare più salubre. Nel primo caso, infatti, le tecniche di fingerprinting molecolare sono fondamentali per identificare

ciascuna varietà/ecotipo, consentendo così di tutelare i produttori e i consumatori sulla specificità del prodotto sia da consumo fresco che trasformato. Nel secondo caso, l'uso dei marcatori molecolari associati a geni di resistenza a patogeni consente di realizzare selezione assistita per l'ottenimento di nuove varietà resistenti, che richiedono un ridotto apporto di sostanze antiparassitarie, garantendo al consumatore un alimento più salubre. Infine, viene proposto l'uso combinato di una piattaforma di trascrittomica con risorse genetiche, specificamente selezionate, per consentire il miglioramento genetico di caratteri a eredità più complessa, quali quelli legati alla qualità nutrizionale e salutistica del pomodoro.

Le strategie proposte costituiscono degli esempi delle potenzialità che la genomica offre per la valorizzazione della filiera del pomodoro: questa disciplina è in continuo sviluppo e avanzamento tecnologico, grazie anche alle informazioni che provengono dal progetto di sequenziamento del genoma del pomodoro, in corso di completamento.

ABSTRACT

Italy is one of the largest producers of tomatoes, both for fresh consumption and processed products. To further increase production is crucial to encourage all the different sectors of the tomato industry, including the realization of various genetic improvement objectives, aimed at obtaining new materials. These can be successfully realized thanks also to many genomic resources now available for the tomato, whose use is reported in some examples.

The intensive use of more than 2500 molecular markers described for the tomato can in fact be of significant help in accelerating and making more efficient the process of variety diversification and in obtaining a health food. In the first case, the molecular fingerprinting is essential to identify each variety/ecotype, thus allowing to protect both producers and consumers for the specificity of fresh and processed products. In the second case, the use of molecular markers associated to genes for resistance allow to realize assisted selection with the aim of obtaining new resistant varieties. This will reduce intake of pesticides, assuring consumers of a more healthy food. Finally, the combined use of a transcriptomic platform with selected genetic resources is proposed to realize assisted-selection even for quantitative traits, such as those related to nutritional and health quality of tomato. The proposed strategies are examples of how genomics tools can enhance improvement of the tomato industry; these tools are constantly evolving also thanks to information coming from the tomato genome sequencing project, nearing completion.

BIBLIOGRAFIA

ARENS P., MANSILLA C., DEINUM D., CAVELLINI L., MORETTI A., ROLLAND S., VAN DER SCHOOT H., CALVACHE D., PONZ F., COLLONNIER C., MATHIS R., SMILDE D., CARANTA C., VOSMAN B. (2010): *Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing*, «Theor Appl Genet», 120, pp. 655-664.

- BARONE A., LANGELLA R., ERCOLANO M.R., DI MATTEO A., MONTI L. (2004): *Strategies for pathogen resistance gene transfer in tomato with the aid of molecular markers*, in S.G. Pandalai (ed), *Recent Res Devel Genet Breeding*, 1, pp. 211-222.
- BARONE A., ERCOLANO M.R., LANGELLA R., MONTI L., FRUSCIANTE L. (2005): *Molecular marker-assisted selection for pyramiding resistance genes in tomato*, «Adv Hort Sci», 19, pp. 147-152.
- BARONE A., FRUSCIANTE L. (2007): *Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato*, in *Marker-Assisted Selection (MAS) in Crops, Livestock, Forestry and Fish: Current Status and the Way Forward*, Fao, pp. 151-164.
- 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», doi: 10.1155/2008/820274.
- BARONE A., DI MATTEO A., CARPUTO D., FRUSCIANTE L. (2009): *High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency*, «Curt Genomics», 10, pp. 1-9.
- CAPANOGU E., BEEKWILDER J., BOYACIOGLU D., HALL R., DE VOS R. (2008): *Change in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste*, «J Agric Food Chem», 56, pp. 964-973.
- DI MATTEO A., SACCO A., BARONE A. (2010): *Un approccio innovativo per l'identificazione di geni coinvolti nella sintesi della vitamina C nel frutto di pomodoro*, «I Georgofili. Quaderni», 2009, III, pp. 51-64.
- ERCOLANO M.R., CARLI P., SORIA A., CASCONI A., FOGLIANO V., FRUSCIANTE L., BARONE A. (2008): *Biochemical, sensorial and genomic profiling of traditional Italian tomato varieties*, «Euphytica», 164, pp. 571-582.
- ESHED Y., ZAMIR D. (1995): *An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTLs*, «Genetics», 141, pp. 1147-1162.
- FOOLAD M.R. (2007): *Genome mapping and molecular breeding of tomato*, «Int J Plant Genomics», Article ID 64358, 52 pages doi:10.1155/2007/64358.
- LANGELLA R., ERCOLANO M.R., MONTI L., FRUSCIANTE L., BARONE A. (2004): *Molecular marker assisted transfer of resistance to TSWV in tomato elite lines*, «J Hort Sci & Biotech», 79, pp. 806-810.
- LIPPMAN Z.B., SEMEL Y., ZAMIR D. (2007): *An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines*, «Curr Opin Genet & Dev», 17, pp. 545-542.
- MUELLER L.A., KLEIN LANKHORST R., TANKSLEY S.D., GIOVANNONI J.J., WHITE R., VREBALOV J. ET AL. (2009): *A snapshot of the emerging tomato genome sequence*, «The Plant Genome», 2, pp. 78-92.
- SIM S.-C., ROBBINS M.D., CHILCOTT C., ZHU T., FRANCIS D.M. (2009): *Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of SNP variation associated with breeding*, «BMC Genomics», 10, pp. 466-475.

